



**PANTOPRAZOL ETKİN MADDESİNİN
FARMASÖTİK PREPARATLARDA FARKLI
ANALİTİK YÖNTEMLERLE MİKTAR TAYİNİ**

Tuba YERKAYA

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU

Yüksek Lisans Tezi – 2018

**T.C
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PANTOPRAZOL ETKİN MADDESİNİN FARMASÖTİK
PREPARATLARDA FARKLI ANALİTİK
YÖNTEMLERLE MİKTAR TAYİNİ**

Tuba YERKAYA

**Analitik Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU**

**ERZURUM
2018**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

**PANTOPRAZOL ETKİN MADDESİNİN FARMASÖTİK
PREPARATLARDA FARKLI ANALİTİK YÖNTEMLERLE
MİKTAR TAYİNİ**

Tuba YERKAYA

Tez Savunma Tarihi : 28.12.2018

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi M. Fatih POLAT (Erzincan Binali Yıldırım Üniv.)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Duygu ARIKAN
Enstitü Müdürü

Yüksek Lisans Tezi
ERZURUM - 2018

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	V
ÖZET	VI
ABSTRACT.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Peptik Ülser.....	4
2.2. Proton Pompa İnhibitörleri	5
2.3. Pantoprazol Etkin Maddesi	6
2.3.1. Pantoprazol Etkin Maddesinin Farmakolojik Özellikleri	6
2.3.2. Pantoprazol Etkin Maddesinin Farmakokinetik Özellikleri	7
2.3.3. Pantoprazol Etkin Maddesinin Diğer PPI'ler ile Karşılaştırılması.....	7
2.3.4. Pantoprazol Etkin Maddesini İçeren Ticari Preparatlar ve İçerikleri	8
2.4. Pantoprazol Etkin Maddesinin Analizi için Analitik Yöntemler	8
2.5. Spektroskopik Yöntemler	18
2.5.1. Spektroskopi	19
2.5.2. Elektromanyetik Işın.....	19
2.5.3. Işının Absorpsiyonu	19
2.5.3.1. Atomik Absorpsiyon.....	20
2.5.3.2. Moleküler Absorpsiyon	20
2.5.4. Lambert-Beer Kanunu	21
2.5.5. UV-GB Absorbsiyon Spektrofotometresi.....	21

2.5.6. UV-GB Spektroskopisinin Kullanım Alanları.....	23
2.6. Elektrokimyasal Yöntemler	23
2.6.1. Voltametrik Yöntemler ve Voltametri.....	23
2.6.1.1. Voltametrde Elektrot Reaksiyon Çeşitleri	26
2.6.1.2. Voltametrde Mekanizma Çeşitleri.....	27
2.6.2. Polarografi	28
2.7. Elektroanalitik Yöntemlerin Kullanım Alanları	30
2.8. Kemometri Yöntemi	30
2.8.1. Deneysel Tasarım	31
2.8.1.1. Merkezi Kompozit Tasarım.....	31
2.9. Yöntem Geliştirme ve Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon).....	33
2.9.1. Yöntem Geliştirme.....	33
2.9.2. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)	33
3. MATERYAL VE METOT.....	35
3.1. Deneyde Kullanılan Materyaller.....	35
3.1.1. Kimyasal Maddeler.....	35
3.1.2. Cihazlar ve Araçlar	35
3.2. Deneyde Kullanılan Yöntemler	36
3.2.1. Spektrofotometrik Yöntem Şartları	36
3.2.2. Polarografik Yöntem Şartları.....	36
3.3. Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	36
3.3.1. Pantoprazolün Stok, Standart ve Kalite Kontrol Çözeltileri.....	36
3.3.2. Spektrofotometri ve Polarografi Yöntemlerinde Kullanılan Tampon Çözeltilerin Hazırlanması	37
3.4. Spektrofotometrik Yöntemin Optimum Koşulların Belirlenmesi	38

3.4.1. Pantoprazolün Maksimum Absorbans Gösterdiği Dalga Boyunun Belirlenmesi	39
3.5. Polarografik Yöntemin Optimum Koşulların Belirlenmesi	39
3.6. Analitik Yöntem Validasyonu	39
3.7. Tablet Çözeltilerinin Hazırlanması	43
4. BULGULAR.....	45
4.1. UV-GB Absorpsiyon Spektrofotometri Yöntemi	45
4.1.1. Pantoprazolün Absorbans Şiddetine Çözücü ve pH'nın Etkisi	45
4.1.2. Pantoprazolün Belirlenmesinde UV-GB Absorpsiyon Spektrofotometri Yönteminin Optimum Koşullarının Merkezi Kompozit Tasarım Yöntemi ile Belirlenmesi	46
4.1.3. UV-GB Absorpsiyon Spektrofotometri Yönteminin Geçerlilik Testi (Validasyonu).....	50
4.2. Polarografi Yöntemi	56
4.2.1. Dönüşümlü ve Doğrusal Taramalı Polarografi Yöntemleri ile Çalışma Potansiyel Aralığının ve Tarama Hızının Belirlenmesi	56
4.2.2. Dönüşümlü ve Doğrusal Taramalı Polarografi Yöntemleri ile Pantoprazolün Adsorpsiyon Özelliğinin Belirlenmesi.....	60
4.2.3. Doğrusal Taramalı Polarografi Yöntemi ile Pantoprazolün Belirlenmesinde Pik Akımı ve Pik Potansiyeline pH'nın Etkisi.....	61
4.2.4. Doğrusal Taramalı Polarografi Yöntemi ile Pantoprazolün Belirlenmesinde Tampon Değişiminin Etkisi.....	61
4.2.5. Dönüşümlü Polarografi Yöntemi ile Pantoprazolün Elektrokimyasal Davranışının Belirlenmesi	62
4.2.6. Kare Dalga Polarografi (SWP) Yöntemi	63

4.2.6.1. Kare Dalga Polarografi (SWP) Yönteminin Geçerlilik Testi (Validasyonu)	63
4.2.7. Diferansiyel Puls Polarografi (DPP) Yöntemi.....	69
4.2.7.1. Diferansiyel Puls Polarografi (DPP) Yönteminin Geçerlilik Testi (Validasyonu).....	70
5. TARTIŞMA.....	77
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	94
KAYNAKLAR	95
EKLER	102
EK-1 ÖZGEÇMİŞ	102
EK-2 ETİK KURUL ONAY FORMU	103

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma, Sayın Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU yöneticiliğinde Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir.

Çalışmam süresince bilgi, görüş ve desteklerini esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU başta olmak üzere, tez konumun belirlenmesinde ve yürütülmesinde beni yönlendiren desteğini, yakın ilgisini ve değerli bilgisini esirgemeyen değerli danışman hocam, Sayın Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU'na, çalışmalarım sırasında emeği geçen ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Bilal YILMAZ'a ve Sayın Arş. Gör. Dr. M. Emrah YAMAN'a, hayatımın her aşamasında her türlü maddi ve manevi desteğini esirgemeyen aileme ve her zaman koşulsuz yanımda olan değerli eşime teşekkür ederim.

Tuba YERKAYA

ÖZET

Pantoprazol Etkin Maddesinin Farmasötik Preparatlarda Farklı Analitik Yöntemlerle Miktar Tayini

Amaç: Bir proton pompa inhibitörü olan pantoprazol etkin maddesinin farmasötik preparatlarda belirlenmesi için kemometrik tekniklerden deneysel tasarım ile yöntem şartları belirlenen yeni bir UV-GB absorpsiyon spektrofotometri, SWP ve DPP yöntemlerinin geliştirilmesi, geçerlilik testlerinin yapılması ve ilaç analizlerinde bu yöntemlerin kullanılabilirliğinin sağlanması amaçlanmaktadır.

Materyal ve Metot: Pantoprazolün UV-GB absorpsiyon spektrofotometri yönteminde deney koşulları merkezi kompozit tasarım yöntemi ile optimize edildi ve 294 nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü. SWP ve DPP yöntemlerinde ise pik akımları -740 mV'da ölçüldü ve yöntem şartları optimize edildi. Geliştirilen her üç yöntemin geçerlilik testleri yapıldı ve yöntemler farklı farmasötik preparatlardan pantoprazolün belirlenmesi için kullanıldı.

Bulgular: UV-GB absorpsiyon spektrofotometri, SWP ve DPP yöntemlerinin sırasıyla 2.5-30 µg/mL, 5-60 µg/mL ve 5-60 µg/mL derişim aralığında doğrusal; gün içi ve günlerarası yapılan deneyler sonucu $\leq \%3.52$, $\leq \%3.65$ ve $\leq \%3.44$ %BSS değerleri ile kesin ve ≤ 1.26 , ≤ 1.66 ve ≤ 0.60 BH değerleri ile doğru olduğu belirlendi. Yöntemlerin LOQ değerleri ise sırasıyla 2.16 µg/mL, 1.20 µg/mL ve 0.90 µg/mL olarak tespit edildi.

Sonuç: Geliştirilen bu yöntemler ile pantoprazol içeren üç farklı farmasötik preparatta (Pandev, Panref ve Protonex) pantoprazol miktar tayini yapıldı. Elde edilen analiz sonuçları istatistiksel olarak karşılaştırıldı (F-hesap: 2.011, F-cetvel: 0.05 (3,24) : 3.27, $F_{\text{hesap}} < F_{\text{cetvel}}$ olduğundan $P > 0.05$) ve her üç yöntemin rutin analizlerde kullanılabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Merkezi kompozit tasarım, pantoprazol, polarografi, UV-GB absorpsiyon spektrofotometri.

ABSTRACT

Quantitative Determination of Pantoprazole Effective Substance in Pharmaceutical Preparations by Different Analytical Methods

Aim: It is aimed to develop and validate a new UV-VR absorption spectrophotometer, SWP and DPP methods via chemometric techniques to determine the concentration of proton pump inhibitor, pantoprazole, in pharmaceutical preparations and monitoring the availability of these methods in drug analysis.

Material and method: In the UV-VR absorption spectrophotometry method of pantoprazole, the experimental conditions were optimized by the central composite design method and the absorbance was measured at the wavelength of 294 nm. In the SWP and DPP methods, peak currents were measured at -740 mV and the process conditions were optimized. The validity tests of all three methods were performed and the methods were used to determine pantoprazole from different pharmaceutical preparations.

Results: UV-VR absorption spectrophotometry, SWP and DPP methods were linear at 2.5-30 µg/mL, 5-60 µg/mL and 5-60 µg/mL concentration range; within and between-day experiments were found to be accurate with RSD values of $\leq 3.52\%$, $\leq 3.65\%$ and $\leq 3.44\%$, and with RE values of ≤ 1.26 , ≤ 1.66 and ≤ 0.60 , respectively. The LOQ values were 2.16 µg/mL, 1.20 µg/mL and 0.90 µg/mL, respectively.

Conclusion: Pantoprazole content of three different pharmaceutical preparations (Pandev, Panref, Protonex) containing pantoprazole were determined by these developed methods. Obtained results were compared statistically (F_{calculus} : 2.011, F_{ruler} : 0.05 (3,24): 3.27, $F_{\text{calculus}} < F_{\text{ruler}}$, $P > 0.05$). It is claimed that all three methods could be used for routine analysis.

Keywords: Central composite design, pantoprazole, polarography, UV-VR absorption spectrophotometry.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BH	: Bağıl Hata
BSS	: Bağıl Standart Sapma
DCE	: Damlayan Civa Elektrot
DKE	: Doymuş Kalomel Elektrot
DPP	: Diferansiyel Puls Polarografi
GİS	: Gastrointestinal Sistem
GK	: Geri Kazanım
HP	: Helicobacter Pylori
LOD	: Gözlenebilme Sınırı
LOQ	: Tayin Alt Sınırı
PPI	: Proton Pompa İnhibitörü
SWP	: Kare Dalga Polarografi
UV-GB	: Ultraviyole Görünür Bölge

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Pantoprazolün kimyasal yapısı	6
Şekil 2.2. Bir spektrofotometre cihazı diyagramı	22
Şekil 2.3. Üç elektrot içeren bir voltametri sistemi	24
Şekil 2.4. Voltametride kullanılan potansiyel uyarma sinyalleri.....	25
Şekil 2.5. A) Tersinir B) Yarı tersinir C) Tersinmez bir reaksiyon için alınan dönüşümlü voltamogram	28
Şekil 2.6. Tipik bir polarografi hücresi.....	29
Şekil 4.1. 10 µg/mL pantoprazol çözeltisinin UV-GB absorpsiyon spektrumu.....	46
Şekil 4.2. Fosfat tampon çözeltisi derişimi ve pH'nın bir fonksiyonu olarak absorbansın yüzey cevap eğrileri	49
Şekil 4.3. Pantoprazolün (2.5, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 µg/mL) standart çalışma çözeltilerinin UV-GB absorbans spektrumları.....	51
Şekil 4.4. UV-GB absorpsiyon spektrofotometri yöntemi ile pantoprazolün (2.5, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 µg/mL) 0.08 M fosfat tampon (pH 11.3) çözeltisi ortamında elde edilen kalibrasyon eğrisi	52
Şekil 4.5. 10 µg/mL ve 15 µg/mL derişimlerde Pandev ilaç çözeltisinin UV-GB absorbans spektrumu.....	55
Şekil 4.6. 10 µg/mL ve 15 µg/mL derişimlerde Panref ilaç çözeltisinin UV-GB absorbans spektrumu.....	55
Şekil 4.7. 10 µg/mL ve 15 µg/mL derişimlerde Protonex ilaç çözeltisinin UV-GB absorbans spektrumu.....	56

Şekil 4.8. Asetat tampon (pH 5.0) çözeltisinin (A) ve asetat tampon (pH 5.0) çözeltisi içinde hazırlanan 50 µg/mL pantoprazol çözeltisinin (B) dönüşümlü polarogramı.	57
Şekil 4.9. 50 µg/mL pantoprazolün 0.25M asetat tampon (pH 5.0) çözelti ortamında elde edilen tarama hızına karşı doğrusal taramalı pik akım grafiği	59
Şekil 4.10. 50 µg/mL pantoprazolün 0.25M asetat tampon (pH 5.0) çözelti ortamında elde edilen tarama hızının kareköküne karşı doğrusal taramalı pik akım grafiği.....	59
Şekil 4.11. 50 µg/mL pantoprazolün 0.25M asetat tampon (pH 5.0) çözelti ortamında elde edilen tarama hızının logaritmasına karşı doğrusal taramalı logaritmik pik akım grafiği	60
Şekil 4.12. Pantoprazolün (5, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 µg/mL) standart çalışma çözeltilerinin kare dalga polarogramları	64
Şekil 4.13. SWP yöntemi ile pantoprazolün (5, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 µg/mL) 0.25 M asetat tampon (pH 5.0) çözelti ortamında elde edilen kalibrasyon eğrisi.....	64
Şekil 4.14. 20 µg/mL, 40 µg/mL ve 50 µg/mL derişimlerde Pandev ilaç çözeltisinin kare dalga polarogramı	68
Şekil 4.15. 20 µg/mL, 40 µg/mL ve 50 µg/mL derişimlerde Panref ilaç çözeltisinin kare dalga polarogramı	68
Şekil 4.16. 20 µg/mL, 40 µg/mL ve 50 µg/mL derişimlerde Protonex ilaç çözeltisinin kare dalga polarogramı	69
Şekil 4.17. Pantoprazolün (5, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 µg/mL) standart çalışma çözeltilerinin diferansiyel puls polarogramları	70

Şekil 4.18. DPP yöntemi ile pantoprazolün (5, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 µg/mL) 0.25

M asetat tampon (pH 5.0) çözelti ortamında elde edilen kalibrasyon

eğrisi..... 71

Şekil 4.19. 20 µg/mL, 40 µg/mL ve 50 µg/mL derişimlerde Pandev ilaç çözeltisinin

diferansiyel puls polarogramı 74

Şekil 4.20. 20 µg/mL, 40 µg/mL ve 50 µg/mL derişimlerde Panref ilaç çözeltisinin

diferansiyel puls polarogramı 74

Şekil 4.21. 20 µg/mL, 40 µg/mL ve 50 µg/mL derişimlerde Protonex ilaç

çözeltisinin diferansiyel puls polarogramı 75

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>TabloNo</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. Pantoprazolün belirlenmesi için faktörler ve belirlenen aralıklar.....	38
Tablo 3.2. Uygulanan merkezi kompozit tasarım kapsamındaki deneyler	38
Tablo 4.1. Pantoprazolün (10 µg/mL) absorbans şiddetine çözücü ve pH'nın etkisi	46
Tablo 4.2. Merkezi kompozit tasarım kapsamında yapılan deneyler sonucunda bulunan yanıt değerleri	47
Tablo 4.3. Matematiksel quadropik modelin ANOVA analiz sonuçları.....	48
Tablo 4.4. Oluşturulan y denklemleri ve Design Expert 8 programından yararlanılarak çözülen denklemler	48
Tablo 4.5. Pantoprazolün merkezi kompozit tasarım yöntemi ile analizi sonucu bulunan optimum değerler	49
Tablo 4.6. Teorik ve deneysel absorbans değerleri.....	50
Tablo 4.7. UV-GB absorpsiyon spektrofotometri yöntemi ile pantoprazol için elde edilen kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri	52
Tablo 4.8. UV-GB absorpsiyon spektrofotometri yöntemi ile pantoprazol için elde edilen günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri	53
Tablo 4.9. UV-GB absorpsiyon spektrofotometri yöntemi kullanılarak farmasötik preparatlara katım yapılan pantoprazol çözeltilerinin geri kazanım değerleri	54
Tablo 4.10. Pantoprazolün UV-GB absorpsiyon spektrofotometri yöntemi ile belirlenen kararlılık (stabilite) değerleri	54
Tablo 4.11. Pantoprazol içeren farmasötik prepatların UV-GB absorpsiyon spektrofotometri yöntemi ile miktar tayini	56

Tablo 4.12. Pantoprazolün farklı tarama hızlarında alınan doğrusal taramalı polarogramlarının pik akım ve pik potansiyel değerleri	58
Tablo 4.13. SWP yöntemi ile pantoprazol için elde edilen kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri.....	65
Tablo 4.14. SWP yöntemi ile pantoprazol için elde edilen günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri	65
Tablo 4.15. SWP yönteminde pik akım ve pik potansiyelinin tekrarlanabilirliği ve yeniden üretilebilirliği.....	66
Tablo 4.16. SWP yöntemi kullanılarak farmasötik preparatlara katım yapılan pantoprazol çözeltilerinin geri kazanım değerleri.....	67
Tablo 4.17. Pantoprazol içeren farmasötik preparatların SWP yöntemi ile miktar tayini	69
Tablo 4.18. DPP yöntemi ile pantoprazol için elde edilen kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri.....	71
Tablo 4.19. DPP yöntemi ile pantoprazol için elde edilen günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri	72
Tablo 4.20. DPP yönteminde pik akım ve pik potansiyelinin tekrarlanabilirliği ve yeniden üretilebilirliği.....	72
Tablo 4.21. DPP yöntemi kullanılarak farmasötik preparatlara katım yapılan pantoprazol çözeltilerinin geri kazanım değerleri.....	73
Tablo 4.22. Pantoprazol içeren farmasötik prepratların DPP yöntemi ile miktar tayini	75
Tablo 4.23. Farmasötik preparatlarda pantoprazolün belirlenmesi için uygulanan yöntemlerin birbirleriyle karşılaştırılması.....	76

1. GİRİŞ

Gastrointestinal sistemin (GİS) iç yüzeyinde saldırgan faktörlerin (mide asidi ve sindirim enzimleri) etkisiyle meydana gelen açık yaralar, peptik ülser olarak adlandırılır ve bulundukları bölgeye göre gastrik, duodenal veya özofageal ülserler diye sınıflandırılırlar. Peptik ülserlere özgü semptomların başında epigastrik ağrı gelir. Hastalar sağ veya sol epikondriyumda lokalize bir ağrıdan yakınır. Gastrik ve duodenal ülserleri sebep oldukları bu ağrıların farklı karakteri ile birbirlerinden ayrılırlar. Peptik ülser tanısı için mide-duodenal grafileri genellikle ilk tercih edilenlerdir. Ancak şiddetli yakınmalara rağmen radyolojik yollarla tespit edilemeyen ve GİS kanamasının mevcut olduğu vakalarda ve mide kanseri riskinin ekarte edilmesi gereken durumlarda endoskopik incelemeler uygulanır. Endoskopik girişim ile alınan doku örnekleri patolojik açıdan değerlendirilerek kesin tanı konulabilir.

Peptik ülserlere bağlı belirtilerin yatıştırılması ve ülserli alanların iyileştirilmesi için ilk seçenek olarak mide asit salgısının inhibisyonu ve buna bağlı olarak da pepsin inaktivasyonu hedeflenir. Bu sayede birçok vakada iyileşme sağlanmakta ve iş gücü kaybı önlenabilmektedir. Günümüzde gastrik asit salgısının inhibisyonu amacıyla en çok tercih edilen ilaçlar benzimidazol türevi ilaçlardır. Proton pompası inhibitörü (PPI) olarak adlandırılan ve zayıf bazik yapıda olan pantoprazol ve bu grupta yer alan diğer ilaçlar H^+ iyonunu lümene pompalayan ve HCl oluşumunu sağlayan pompanın çalışmasını geri dönüşümsüz olarak inhibe ederler.

Pantoprazol, seçici ve geri dönüşümsüz üçüncü proton pompa inhibitörü olup, duodenal ve gastrik ülserlerinde midede üretilen asit miktarını azaltarak gastroözofageal reflü, peptik ülser, *Helicobacter Pylori* (HP) enfeksiyonu ve diğer gastrik ilişkili bozuklukların iyileşmesini sağlayan bir ilaç etkin maddesidir.

Peptik ülser tedavisinde ilaç tedavisinin önemli bir yeri vardır. Farmakolojik preparatlar çeşitli kalite kontrollerinden geçmesine rağmen uygulandığında etkisi yetersiz kalabilir. Bu yüzden farmasötik preparatlarda ve biyolojik ortamlarda etkin maddelerin ya da diğer maddelerin miktar analizi, teşhisi ve belirlenmesi veya ilaç imalat ve piyasa kontrolleri sırasında ilaç etkin maddelerinin analizi bilimsel açıdan önemlidir. Bu kalitatif ve kantitatif analizlerde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden birisi ultraviyole (UV) ve görünür bölgede (GB) meydana gelen absorpsiyonu temel alan UV-GB absorpsiyon spektroskopisidir. Bu yöntem sadelik, çok yönlülük, hız, doğruluk ve maliyet etkinliği açısından ilaç analizlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Diğer yöntem ise damlayan civa elektrodun (DCE) kullanıldığı bir voltametri tekniği olan polarografi yöntemi olup bu yöntem ile etkin maddenin yanında kompleks bir karışım olsa dahi etkin bir maddenin analizi girişim olmaksızın yüksek hassasiyette yapılabilmektedir. Bu yöntemin diğer avantajları ise; ucuz olması, kolay uygulanabilir olması ve analitlerin ön saflaştırma işlemlerine ihtiyaç duyulmadan analizi yapılabilmesidir.

Verimi yüksek deneysel çalışmalar, deneysel tasarım ve kantitatif değerlendirme yöntemlerine dayanmaktadır. Bu yöntemler kemometri adı verilen matematiksel modeller veya tasarımlar ile uygulanabilir. Merkezi kompozit tasarım yöntemi deneysel tasarım yöntemlerinden biridir. Avrupa birliğinin getirdiği normlar çerçevesinde çevrenin daha az kirlenmesine neden olan daha ekonomik analitik yöntemlerin geliştirilmesinde merkezi kompozit tasarım yöntemi sıklıkla başvuru bir yöntemdir.

İlaç etkin madde analizlerinde yöntem seçimi ve geliştirilmesi yapıldıktan sonra yöntemin uygulanabilir olduğunu göstermek için belirleyicilik/seçicilik, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, duyarlılık limiti, geri kazanım, sağlamlık/dayanıklılık, örneklerin stabilitesi gibi parametreleri içeren geçerlilik testleri (validasyon) yapılmalıdır. Daha

sonra belirlenen yöntemin uygulanabilir olduğu, gerçek numunelerde (farmasötik preparatlar ve biyolojik sıvılar) ilaç etkin maddelerinin analizi yapılarak gösterilebilir.

Literatürde, etkin madde olarak seçilen pantoprazolün farmasötik preparatlarda tek başına ve kombine dozaj formlarında belirlenmesine yönelik doğrudan veya kompleks oluşumu esasına dayalı spektrofotometri, türev spektrofotometri, ve voltametri yöntemleri geliştirilmiştir. Ancak merkezi kompozit tasarım ile optimum koşullarının belirlendiği UV-GB absorpsiyon spektrofotometri ve polarografi yöntemleri ile pantoprazolün farmasötik preparatlarda belirlenmesine yönelik ve bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada, pantoprazolün farmasötik preparatlarda miktar tayini için UV-GB absorpsiyon spektrofotometri ve polarografi yöntemlerinin geliştirilmesi, deneysel koşulların merkezi kompozit tasarım yöntemi ile optimize edilmesi ve geçerlilik testlerinin yapılması amaçlanmaktadır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Peptik Ülser

Peptik ülser veya ülser canlıların epitel dokusunda meydana gelen bir tür hastalık veya yara olarak adlandırılır. GİS'in iç yüzeyi besinlerin sindirimini sağlayan saldırgan faktörler (mide asidi, pepsin gibi sindirim enzimleri ve safra asitleri) tarafından zarar görmesini engelleyecek şekilde hassas bir denge gözetilerek tasarım edildiğinden bu faktörler normal şartlar altında GİS mukozasında hasara ve dolayısıyla ülserasyonlara sebep olmamaktadır. Ancak yukarıda bahsedilen hassas dengenin saldırgan faktörler lehine bozulması bu faktörlerin mukozaya temasına, mukoza bütünlüğünün bozulmasına ve dolayısıyla peptik ülserlere neden olmaktadır. Peptik ülserler yerleşim yerlerine göre gastrik, duodenal ve özofageal ülserler olarak adlandırılmaktadırlar. Mide fundusundan pilora kadar mide dokusunda gelişen peptik ülserler gastrik ülser, oniki parmak bağırsağında gelişenler duodenal ülser, yemek borusunda meydana gelenler ise özofageal ülserlerdir. Peptik ülser hastalarının büyük kısmında (%60-80) etiyolojik faktör bilinmemektedir. Ülserin meydana gelmesindeki en önemli etkenin mide asidi üretiminde meydana gelen artış olmasına rağmen HP mikroorganizması ile enfeksiyonun da etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca psikolojik ve fiziksel stres de ülser etiyolojisinde önemli bir yere sahiptir.¹ Dünyada peptik ülser çok sık görülen yaygın bir hastalıktır. Her ırk ve her iki cinsten de sık görülür. Fakat bu hastalığa erkekler kadınlara göre iki kat daha sık yakalanmaktadır. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) tarafından yapılan en son araştırma (2010) verilerine göre, ülkemizde 15 yaş ve üzeri bireylerde en fazla görülen ilk beş hastalıktan biri olan mide ülseri %9.6 ile küçümsenmeyecek bir paya sahiptir ve kadınlardaki görülme oranının erkeklerden yüksek olduğu gözlenmektedir. Peptik ülserin en sık görülme yaş aralığı ise 20-60 yaş arasındır. Peptik ülser genellikle epigastrik ağrı ile belirti verir. Fakat ülser çeşidine göre ağrıların

karakteri değişmektedir. Bulantı, kusma, şişkinlik gibi belirtiler gastrik ülserlerde daha belirgin yakınma oluşturlar. Buna rağmen peptik ülser vakalarının yaklaşık %10'u asemptomatik seyreder ve ilk defa perforasyon veya kanama ile belirti verirler. Peptik ülser tanısı genellikle radyolojik yollarla tespit edilebilir fakat kesin tanı endoskopik girişim ile alınan doku örnekleri patolojik açıdan değerlendirilerek konulabilir.

Peptik ülserlere bağlı belirtilerin yatıştırılması ve ülserli alanların iyileştirilmesi için ilk seçenek olarak mide asit salgısının inhibisyonu ve buna bağlı olarak da pepsin inaktivasyonu hedeflenir. Bu amaçla PPI'ler, H₂ reseptör blokerleri ve antiasitler kullanılır ve bu şekilde birçok vakada iyileşme sağlanarak iş gücü kaybı önlenir. Günümüzde peptik ülserin iyileşmesinde en çok PPI olarak adlandırılan benzimidazol türevi ilaçlar tercih edilmektedir.¹

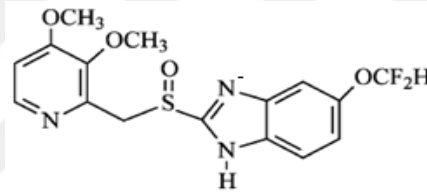
2.2. Proton Pompa İnhibitörleri

Peptik ülserlere zemin hazırlayan en önemli saldırgan faktörlerden olan mide asidi (hidroklorik asit, HCl), midenin fundus bölgesinde yer alan paryetal hücreler tarafından üretilir ve mide lümenine salgılanır. HCl üretimini bloke etmek, mide asiditesini düşürmek ve dolayısıyla peptik ülser vakalarını azaltmak maksadıyla birçok ilaç geliştirilmiş ve kullanıma sunulmuştur. Mide asidi üretimini en iyi şekilde bloke eden ilaçlar, benzimidazol türevi PPI'dir. Bu inhibitörler, paryetal hücrelerdeki proton pompasında bulunan H⁺ veya K⁺ ile stimüle edilen ATPaz'ı inhibe ederek mide asiditesini düşürür. Bu bağlamda PPI'ler, hücre içinde karbonik anhidraz reaksiyonu ile oluşan H⁺'nın mide lümenine pompalamasını dolayısıyla gastrik lümende HCl oluşumunu engelleyerek etki gösterirler. Ayrıca PPI'ler peptik ülser oluşumunda önemli rol oynadığı bilinen HP üzerinde gastrik mukozaya infiltre olan polimorfnükleer lökositlere bağlanarak antibakteriyel etkinlik gösterir. Bu şekilde PPI'lerin gösterdikleri antiinflamatuvar etkinliğinin de ülser tedavisine katkı sağladığı düşünülmektedir.²

Bu PPI'ler içerisinde tedaviye ilk sunulan omeprazoldür (1988). Daha sonraları rabeprazol, esomeprazol, pantoprazol, lansoprazol ve deksrabeprazol gibi üyeler onay alarak gruba katılmış ve modern tıbbın hizmetine sunulmuştur. Pantoprazol aynı farmakolojik grupta yer alan diğer grup üyelerinden bir takım üstünlüklere sahiptir.

2.3. Pantoprazol Etkin Maddesi

Pantoprazol, 5-(difluorometoksi)-2-[(3,4-dimetoksi-2-piridil) metil sülfonil] 1H-benzimidazol yapısında olup, 382.165 g/mol molekül ağırlığına sahiptir. Kapalı formülü ise $C_{16}H_{14}F_2N_3O_4S^-$ şeklindedir (Şekil 2.1). Pantoprazol, oda sıcaklığında katı hal formunda, normal şartlar altında görünüşü beyaz renkli ve kokusuz toz halindedir. Erime noktası 130°C'dir. Etanol ve suda çözünür.



Şekil 2.1. Pantoprazolün kimyasal yapısı

2.3.1. Pantoprazol Etkin Maddesinin Farmakolojik Özellikleri

Pantoprazol H^+ , K^+ -ATPaz enzimini inhibe ederek midedeki HCl salgısını baskılar. İnhibisyon doz bağımlı olup, bazal HCl sekresyonunu ve gıda alımıyla stimule olan asit sekresyonunu baskılar.³ Bütün PPI'lerin ve pantoprazolün proton pompaları açlık durumunda %5 oranında aktif iken gıda alımı sonrası bu aktiflik %70'lere ulaştığından sabahları ilk öğünden en az 20-30 dakika önce alınmaları tavsiye edilir.⁴ Genellikle 20 ve 40 mg'lık dozları kullanılır. Ülser ve gastromzofajiyal reflü vakalarının çoğunda belirtiler iki hafta içerisinde baskılanır. Pantoprazolün hem oral hem de intravenöz uygulanması ile aynı etkinlik oluşturulabilir.⁵ Ayrıca pantoprazol etkin maddesi H^+ , K^+ -ATPaz enzimi ile reseptör distalinde etkileştiği için gastrin ve histamin gibi gastrik asit sekresyon stimülatörlerinden etkilenmezler.⁶

2.3.2. Pantoprazol Etkin Maddesinin Farmakokinetik Özellikleri

Absorbsiyon: Pantoprazol, genellikle mide pH'sından etkilenmemesi için sodyum seksihidrat ($C_{16}H_{14}F_2N_3NaO_4S \cdot 1.5H_2O$) tuzu halinde hazırlanır ve gecikmeli salım yapan tabletlerden bağırsak ortamında salıverilir. Pantoprazolün tek oral doz uygulanması sonrası plazma doruk derişimine ulaşma zamanı 2.5-4 saat arasında olup biyoyararlanımı %77 civarındadır. Pantoprazolün gıdalarla birlikte kullanımı intestinal emilimi geciktirebilir ancak emilime uğrayan miktarı etkilemez.^{3,7}

Dağılım: Pantoprazolün dağılım hacmi 0.15 L/kg ve klirensi 0.1 L/saat.kg'dır. Pantoprazolün tekrarlayan dozlarıyla farmakokinetik profili değişmez. Pantoprazol, plazma proteinlerine, başta albumin olmak üzere % 90 oranında bağlanır.^{3,7}

Metabolizasyon: Pantoprazol, büyük ölçüde karaciğerde sitokrom P450 (CYP450) enzim sistemi ile farmakolojik olarak inaktif metabolitlerine metabolize edilir. Ana metabolik yolak CYP2C19 ile demetilasyon ve bunu takip eden sülfasyondur. Minör metabolik yolak ise CYP3A4 izoenzimleri ile oksidasyondur.^{3,7}

İtrah (Eliminasyon): Pantoprazolün eliminasyonu karaciğer stokrom enzimleri tarafından gerçekleşir. Çok az kısmı ise değişmeden böbreklerden atılır. İlaç etkin maddesinin metabolitleri ise %71'i böbreklerden ve %18'i safra yolu ile vücuttan atılır. Metabolizasyona uğramamış pantoprazol idrarda bulunmaz.^{3,7}

2.3.3. Pantoprazol Etkin Maddesinin Diğer PPI'ler ile Karşılaştırılması

Pantoprazol, diğer PPI'lere göre paryetal hücrelere çok iyi yayılır ve burada hızlı ve güçlü etkinlik gösterir. Karaciğerde daha az oksidatif metabolitlerine dönüşür ve diğer ilaçlarla farmakokinetik etkileşmeye girme riski daha düşüktür. Pantoprazol ayrıca etkinliğini azaltmadığı ve kardiyovasküler olay riskinin artmasına sebep olmadığı için klopidoğrel ile eş zamanlı kullanımına müsaade edilen iki PPI'den biridir (diğeri Rabeprazol'dür).^{8,9}

2.3.4. Pantoprazol Etkin Maddesini İçeren Ticari Preparatlar ve İçerikleri

1. **Enterik kaplı tabletler:** Abpax 40 mg (Nobel Sağlık), Arinna 20-40 mg (Tripharma), Gastblok 40 mg (Umut İlaç), Pandev 20-40 mg (Deva), Panocer 40 mg (ILKO), Panref 20-40mg (Biyofarma), Pandactive 20-40 mg (Pharmactive), Panthec 20-40 mg, (Sanovel), Penzol 40 mg (Pensa İlaç), Protech 20-40 mg (Drogsan), Protinum 20-40 mg (Ali Raif), Protonex 20-40 mg (Abdi İbrahim), Pulcet 40 mg (Nobel İlaç), Ulcoreks 40 mg (Bilim İlaç), Ulsepan 40 mg (World Medicine).

2. **IV enjektabl Toz İçeren 1 Flakonlar:** Gastrol-L 40 mg (Mustafa Nevzat), Pandev 40 mg (Deva), Pantonix 40 mg (Koç İlaç), Progas 40 mg (Defarma), Protaz 40 mg (Avicenna), Ulsepan 40 mg (World Medicine).

2.4. Pantoprazol Etkin Maddesinin Analizi için Analitik Yöntemler

Kumar ve ark.¹⁰, pantoprazolün saf formda ve farmasötik katı dozaj formunda belirlenmesi için spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Su içerisindeki pantoprazolün 292 nm dalga boyunda maksimum absorbands gösterdiği gözlenmiştir. Yöntemin 0.9998 korelasyon katsayısı değeri ile 5-70 µg/mL derişim aralığında doğrusal ve % 99'dan fazla geri kazanım değeri ile doğru olduğu bildirilmiştir. Yöntemin pantoprazolün farmasötik katı dozaj formunda belirlenmesi için uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Shinde ve ark.¹¹, pantoprazolün saf halde ve farmasötik katı dozaj formlarında belirlenebilmesi için spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Pantoprozolün suda 289 nm dalga boyunda maksimum absorbsiyon gösterdiği belirlenmiştir. Yöntemin doğrusal olduğu derişim aralığı 3-21 µg/mL ve korelasyon katsayısı 0.997 olarak bulunmuştur. Gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin alt sınırı (LOQ) değerlerinin sırasıyla 1.89 ve 2.98 olduğu tespit edilmiştir. Farmasötik dozaj formlarında pantoprozal sodyumun yüzde geri kazanımının değerlerinin, % 99.7 ile % 100.8 arasında

değişmekte olduğu belirtilmiştir. Gün içi ve günlerarası bağıl standart sapma (% BSS) değerleri sırasıyla 1.40 ve 1.53'dür. Önerilen yöntemin rutin kalite kontrol uygulamalarında kullanılması için uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Pandya ve ark.¹², farmasötik dozaj formlarında pantoprazolün belirlenmesi için bir spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Yöntem, ortamın pH'sının değiştirilmesiyle indüklenen spektral değişikliklere dayandırılmıştır. Referans hücrede 0.1 N HCl ve örnek hücrede 0.1 N NaOH içerisindeki pantoprazolün spektrumu alınarak fark absorbansları ölçülmüştür. Bunlar sırasıyla pozitif ve negatif absorbansla 296 nm ve 319 nm dalga boyunda iki karakteristik pik göstermiştir. Pantoprazolün kalibrasyon eğrisinin 5-25 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu (korelasyon katsayısı 0.997) bulunmuştur. Yöntem için LOD değeri 0.0954, LOQ değeri 0.2891 ve farmasötik dozaj formlarından yüzde geri kazanım değeri % 99.06 olarak tespit edilmiştir. Yöntemin saf ve farmasötik dozaj formundaki pantoprazolün belirlenmesi için uygulanabilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Adepu ve ark.¹³, flurbiprofen ve pantoprazolün farmasötik kombine dozaj formunda birlikte belirlenmesinde spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Flurbiprofen ve pantoprazolün spektral özelliklerini incelemek için çözücü olarak fosfat tamponu (pH 6.8) seçilmiştir. Maksimum dalga boyları flurbiprofen için 230 nm, pantoprazol için 270 nm olarak ölçülmüştür. Bu yöntemde flurbiprofen ve pantoprazol için yöntemin 10-100 mg/mL derişim aralığında (korelasyon katsayısı 0.998) doğrusal olduğu belirlenmiştir. Yöntemin LOD ve LOQ değerleri her iki madde için sırasıyla 4.2 ve 3.7, LOQ değerleri ise 9.3 ve 8.4 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca farmasötik kombine dozaj formunda flurbiprofen ve pantoprazol için geri kazanım yüzdeleri sırasıyla 99.6 ve 99.46 olarak bulunmuştur. Yöntemin her iki maddeyi içeren kombine tablet formülasyonlarının analizi için kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Kumar ve ark.¹⁴, saf formda ve farmasötik dozaj formunda, naproksen sodyum ve pantoprazol sodyumun birlikte belirlenmesi için spektrofotometri yöntemi geliştirmişlerdir. Spektrofotometrik yöntemde çözücü olarak 0.1 M NaOH kullanılmıştır. Sırasıyla 232 nm ve 291 nm dalga boylarında ölçülen absorbans değerleri ile naproksen sodyum ve pantoprazol sodyumun ikili karışım içerisinde analiz edilebilmesi için eşitlikler oluşturulmuş ve çözümleri gerçekleştirilmiştir. Yöntemin kalibrasyon eğrilerinden elde edilen sonuçlarına göre, her iki ilaç etkin maddesi için 2-10 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu ve korelasyon katsayılarının 0.995'den büyük olduğu tespit edilmiştir. Pantoprazol sodyum için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.0042 µg/mL ve 0.0129 µg/mL, naproksen sodyum için ise 0.011 µg/mL ve 0.0042 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Naproksen sodyum için geri kazanım değeri % 100.03, pantoprazol sodyum için ise % 100.2 olarak belirlenmiştir. Yöntemin farmasötik dozaj formlarında naproksen sodyum ve pantoprazol sodyum belirlenmesi için uygulanabilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Chosla ve ark.¹⁵, farmasotik dozaj formlarında levosulpirid ve pantoprazolün birlikte belirlenmesi için birinci türev spektroskopi yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde sıfır geçiş tekniği kullanılarak pantoprazol için metanolde 269 nm dalga boyunda, levosulpirid için ise 249 nm dalga boyunda birinci türev değerleri ölçülerek her iki analit birlikte analiz edilmiştir. Yöntemin her iki analit için 10-50 µg/mL derişim aralığında doğrusal (pantoprazol için korelasyon katsayısı > 0.9929 ve levosulpirid için korelasyon katsayısı > 0.9948) olduğu bildirilmiştir. LOD ve LOQ değerleri ise pantoprazol için 0.69 ve 2.06 µg/mL, levosulpirid için 0.58 ve 1.69 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Gün içi ve günlerarası yapılan deneyler sonucu, yöntemin sırasıyla pantoprazol ve levosulpirid için sırasıyla % 0.40-1.10 ve % 0.36-1.05 % BSS değerleri ile kesin ve 0.77-1.50 ve 0.60-1.35 bağıl hata (BH) değerleri ile doğru olduğu

belirlenmiştir. Sonuç olarak geliştirilen yöntemin pantoprazol ve levosulpirid birlikte farmasötik dozaj formunda belirlenmesi için uygulanabilir olduğu gösterilmiştir.

Patil ve ark.¹⁶, farmasötik dozaj formlarında pantoprazolün belirlenmesi için üç farklı spektrofotometri (UV-GB, birinci türev spektrofotometri ve eğri altındaki alan) yöntemi geliştirmişlerdir. Her üç yöntemin çalışma çözeltileri metanol ile hazırlanmıştır. UV-GB absorbans spektrumunda 290 nm, birinci türev spektrumunda 282 nm ve eğri altındaki alan 286-296 nm dalga boyu aralığında ölçülmüştür. Her üç yöntem için sırasıyla doğrusal derişim aralığı, 5-35 µg/mL (korelasyon katsayısı 0.999934), 10-100 µg/mL (korelasyon katsayısı 0.999973), 5-40 µg/mL (korelasyon katsayısı 0.99996) olarak; LOD değerleri, 0.15, 0.35 ve 0.1 µg/mL olarak ve LOQ değerleri 0.45, 1.05 ve 0.30 µg/mL olarak bulunmuştur. Her üç yöntem de valide edilmiş olup pantoprazolün farmasötik dozaj formunda belirlenmesi için uygulanabilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Phadtare ve ark.¹⁷, tablet dozaj formunda bulunan pantoprazolün belirlenmesine yönelik spektrofotometrik yöntemler geliştirmişlerdir. Pantoprazolün metanol ile hazırlanan çözeltisinin 267 nm dalga boyunda UV-GB absorbansı (A yöntemi), 258 nm dalga boyunda birinci türev spektrumu (B yöntemi) ve 262-271 nm dalga boyu aralığında eğri altındaki alanı (C yöntemi) alınarak yöntemler gerçekleştirilmiştir. Her üç yöntem için doğrusal derişim aralığı 2-10 µg/mL olarak (korelasyon katsayıları sırasıyla 0.99973, 1.000 ve 0.9997) bulunmuştur. A, B ve C yöntemleri için sırasıyla; LOD değerleri 0.0008, 3.3 ve 0.0006, LOQ değerleri ise 0.0026, 10 ve 0.002 olarak tespit edilmiştir. Yüzde geri kazanım değerlerinin de her üç yöntem için % 99.50-100.05 arasında olduğu belirtilmiştir. Yöntemlerin, tablet dozaj formunda pantoprazolün belirlenmesi için uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Suslu ve ark.¹⁸, tablet dozaj formunda bulunan pantoprazolün belirlenmesine yönelik UV-GB ve birinci türev spektrofotometri yöntemleri geliştirmişlerdir. Pantoprazolün metanol-su (1:9 h/h) karışımında, 295 nm UV-GB absorbans spektrumu ve 303 nm dalga boyunda birinci türev spektrumu alınmıştır. UV-GB ve birinci türev spektrofotometri yöntemlerinin sırasıyla 2.50-80 µg/mL ve 0.5-70 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu belirlenmiştir. LOD değerleri sırasıyla 2.31 ve 0.69 µg/mL, LOQ değerleri ise 0.5 µg/mL ve 0.15 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Her iki yönteminde gün içi ve günlerarası % BSS değerleri % 2'den küçük olduğu ve sırasıyla ve % 101.77 ve % 101.28 geri kazanım değerlerine sahip olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak her iki yöntemin de tablet dozaj formundaki pantoprazolün tayininde uygulanabilir olduğu gösterilmiştir.

Kakde ve ark.¹⁹, farmasötik preparatlarda pantoprazol ve domperidon birlikte belirlenmesine yönelik bir spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde, 0.1M HCl çözeltisinde domperidonun absorbans göstermediği 331 nm dalga boyunda pantoprazol ve 284 nm ve 364.5 nm dalga boyları arasındaki fark alınarak domperidon tespit edilmiştir. Yöntemin her iki analit için 10-50 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu bildirilmiştir. Gün içi ve günlerarası yüzde geri kazanım değerleri sırasıyla pantaprazol için $\geq$ % 99.83 ve domperidon için $\geq$ % 99.48 olarak tespit edilmiş ve yöntemin rutin kalite kontrol uygulamalarında kullanılabileceği belirtilmiştir.

Baraka ve ark.²⁰, saf halinde ve farmasötik dozaj formunda pantoprazol sodyum belirlenmesi için spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Pantoprazol sodyum 2,4-dinitrofluorobenzen ile nükleofilik substitusyon reaksiyonu yoluyla sarı renkli ürüne dönüştürülmüş ve maksimum absorbans borat tamponunda (pH 10.5) 431 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Yöntemin doğrusallığı 10-50 µg/mL derişim aralığında belirlenmiştir (korelasyon katsayısı 0.999). LOD değeri 1.85 µg/mL ve LOQ değeri

5.53 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Yöntem için farmasötik dozaj formundan geri kazanım değeri % 99.15'dir. Önerilen spektrofotometrik yöntemin, pantoprazolün farmasötik formülasyonda belirlenmesine yönelik rutin kalite kontrol uygulamalarında kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Basavaiah ve ark.²¹, saf halde ve farmasötik formülasyonlarda pantoprazol sodyum sesquihidrat belirlenmesinde iki ayrı spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Reaktif olarak metil turuncu (A yöntemi) ve indigo karmini (B yöntemi) boyar maddeleri ve N-bromosuccinimide (NBS) kullanılmıştır. Yöntemler, asit ortamında pantoprazol sodyum sesquihidrata fazla miktarda NBS eklenmesini ve bunu takiben tepkimemiş oksidanın, belirlenmiş miktarda metil turuncu veya indigo karmin boyar maddeleri ile reaksiyona sokulması suretiyle absorbands ölçümüne dayandırılmıştır. A yöntemi için 520 nm ve B yöntemi için 610 nm dalga boyunda absorbands ölçülmüştür. Her iki yöntemde de, reaksiyona giren NBS miktarı pantoprazol sodyum sesquihidrat ile orantılı olup, ölçülen absorbsiyonun pantoprazol sodyum sesquihidrat derişimi ile doğrusal olarak arttığı bulunmuştur. A ve B yöntemleri için sırasıyla derişim aralığı 0.1–2.0 µg/mL ve 0.5–6.0 µg/mL olarak ve korelasyon katsayıları 0.9959 ve 0.9985 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca her iki yöntem için LOD değerleri 0.02 µg/mL ve 0.08 µg/mL, LOQ değerleri ise 0.06 µg/mL ve 0.25 µg/mL olarak bildirilmiştir. Geçerlilik testleri yapılan yöntemin, pantoprazolün farmasötik formülasyonlarda belirlenmesine yönelik analizlerinde uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Basavaiah ve ark.²², oksidimetrik reaktif olarak permanganat kullanılarak pantoprazol sodyumun titrimetrik ve spektrofotometrik belirlenmesi için yöntemler geliştirmişlerdir. Titrasyon yönteminde, H₂SO₄ ortamında pantoprazol sodyum aşırı permanganat ile reaksiyona sokulduktan sonra arta kalan permanganat, standart demir

(II) çözeltisi ile geri titre edilmiştir. Reaksiyona girmemiş permanganat miktarından pantoprazol sodyum miktarı tespit edilmiştir. Spektrofotometri yönteminde ise, H_2SO_4 ortamında pantoprazol sodyumun aşırı miktarda permanganat ile reaksiyonu sonucu arta kalan permanganatın 545 nm dalga boyunda maksimum absorbansının ölçülmesi ile pantoprazol miktarı belirlenmiştir. Titrimetri ve spektrofotometri yöntemleri için derişim aralığı sırasıyla, 1.0-7.0 $\mu g/mL$ ve 15.0-150.0 $\mu g/mL$ olarak tespit edilmiştir. Spektrofotometri yönteminin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.73 $\mu g/mL$ ve 2.21 $\mu g/mL$ olarak bulunmuştur. Ayrıca yöntemin kesinliği bağıl standart sapma ile verilmiş olup günüçi ve günlerarası % BSS değeri 3.09'dan küçük olarak bulunmuştur. Yöntemin doğruluğu ise bağıl hata ile verilmiş olup günüçi ve günlerarası % BH değerinin 3.5'den küçük olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, her iki yöntemin farmasötik preparatlarda pantoprazol sodyumun belirlenmesinde uygulanabileceğı belirtilmiştir.

Moustafa ²³, geri dönüşümsüz iki PPİ olan lansoprazol ve pantoprazol sodyum seskihidrat için yük transfer kompleks oluşumuna dayalı üç farklı spektrofotometrik yöntem geliştirmiştir. Bu PPİ ilaç etkin maddeleri n-donor olduğunda, p-alıcısı olarak 2,3-dikloro-5,6-disiyano-1, 4-benzokinon (DDQ) (birinci yöntem) ve s kabul edicisi olarak da iyot (ikinci yöntem) kullanılmıştır. Üçüncü bir yöntem olarak da üçlü kompleks oluşumuna bağılı olarak eozin ve bakır ile kompleks oluşumu sağlanmıştır. Lansoprazol ve pantoprazol sodyum seskihidratın kompleksleşme renkli ürünleri, DDQ için 457 nm dalga boyunda (A yöntemi), iyot için 293nm ve 359 nm dalga boyunda (B yöntemi) ve üçlü kompleks oluşumu için 549 nm dalga boyunda (C yöntemi) absorbans gösterdiği belirlenmiştir. Lansoprazol için A, B ve C yöntemlerinin sırasıyla 10-90 $\mu g/mL$, 1.48-6.65 $\mu g/mL$ ve 3.69-16.61 $\mu g/mL$ derişim aralığında doğrusal olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca lansoprazol için yüzde geri kazanım değerleri DDQ için % 99.63, iyot için % 99.71, % 99.18 ve üçlü kompleks için % 99.76; % BSS değerleri ise

%0.11, %0.24, %0.13 ve %0.36 olarak bulunmuştur. Aynı şekilde pantoprazol sodyum seskuhidrat için, yöntemlerin sırasıyla doğrusal olduğu derişim aralıkları 10-60 µg/mL, 17.7-141.6 µg/mL ve 4.3-25.9 µg/mL ve yüzde geri kazanımları DDQ için % 99.51, iyot için % 98.97,% 99.84 ve üçlü kompleks için % 99.46 ve % BSS değerleri ise %0.53, %1.21, %0.65 ve %0.81olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak her üç yöntemin, lansoprazol ve pantoprazolün farmasötik formülasyonlarının analizine uygulanabilir olduğu bildirilmiştir.

Reddy ve ark.²⁴, saf formda ya da farmasötik formülasyonlarda bromokrezol yeşili kullanılarak pantoprazolün belirlenmesine yönelik bir spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Yöntemde, asidik ortamda bromokresol yeşili kullanılarak pantoprazol iyon-çift kompleksleri oluşturulmuş ve bu kompleksler kloroform ile ekstrakte edilmiştir. Ekstrakte edilen komplekslerin 420 nm dalga boyunda absorbensları belirlenmiştir. Çözelti ortamına 100 µg/mL derişimdeki pantoprazolden 0.5- 2.5 mL aralığında eklenerek yöntemin kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Yöntemin kesinliği ise % BSS ile verilmiş olup günüçi ve günlerarası % BSS değerinin % 2'den küçük olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, yöntemin pantoprazolün farmasötik tayini için uygulanabilir olduğu belirtilmiştir.

Devi ve Basavaiah²⁵, farmasötik preparatlarda pantoprazol sodyum seskuhidrat belirlenmesi için iki farklı spektrofotometri yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemler, demir (III) klorürün nötr ortamda pantoprazol sodyum seskuhidrat ile indirgenmesine ve daha sonra açığa çıkan Fe⁺²'nin 1, 10-fenantrolin (A yöntemi) veya 2,2-bipiridil (B yöntemi) ile kompleks oluşturması temeline dayandırılmıştır. Her iki yöntemde de kırmızı renkli kompleksler oluşturulmuş olup A ve B yöntemleri için sırasıyla 510 nm ve 520 nm dalga boylarında absorbens ölçülerek pantoprazol sodyum seskuhidrat miktarı tespit edilmiştir. A ve B yöntemlerinin sırasıyla 0.25-4.0 µg/mL (korelasyon katsayısı 0.9586)

ve 2.5-50 µg/mL (korelasyon katsayısı 0.999) derişim aralığında doğrusal, gün içi ve günlerarası yapılan deneyler sonucu ≤ 2.52 ve ≤ 2.18 % BSS değerleri ile kesin ve ≤ 3.52 ve ≤ 3.18 BH değerleri ile doğru olduğu belirlenmiştir. LOD ve LOQ değerleri ise A yöntemi için 0.04 µg/mL ve 0.12 µg/mL, B yöntemi için 0.32 µg/mL ve 0.97 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Önerilen yöntemlerin saf halde ve tabletlerde pantoprazol sodyum seskuihidratın analizi için uygulanabilir olduğu belirtilmiştir.

Devi ve ark.²⁶, farmasötik preparatlarda pantoprazol sodyum seskuihidrat belirlenmesi için spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Yöntem nötral ortamda permanganatla pantoprazol sodyum seskuihidratın kahverengi ürün oluşumuna dayandırılmıştır. Oluşturulan bu renkli ürün için maksimum absorbans değeri 350 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Yöntem 2.5-40.0 µg/mL derişim aralığında doğrusaldır (korelasyon katsayısı 0.998). Pantoprazol sodyum seskuihidrat için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.49 ve 1.47 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Güniçi ve günlerarası BH değerinin %2'den daha küçük ve buna karşılık gelen kesinlik değerinin ise (% BSS) %2.5'den daha küçük olduğu tespit edilmiştir. Tabletten geri kazanım değerleri ise % 104.27 ile % 111.80 arasında değiştiği ve standart sapmasının % 1.04-1.48 olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, yöntemin pantoprazolün tayininde uygulanabilir olduğu belirtilmiştir.

Syed ve Syeda²⁷, omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, rabeprazol ve esomeprazolün farmasötik preparatlarda belirlenmesi için spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Yöntem, omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, rabeprazol ve esomeprazolün demir (III) ile tepkimeye sokulması ve sonrasında 720-730 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon ile prusya mavisi ürünü veren ferrisiyanür ile nötr koşullardaki reaksiyona dayandırılmıştır. Belirtilen PPI'ler için sırasıyla maksimum absorbans gösterdikleri dalga boyları 720 nm, 730 nm, 720 nm, 720 nm ve 725nm;

yöntemin doğrusal olduğu derişim aralıkları 80-2800, 200-3600, 200-4000, 200-3200 ve 200-3200 ng/mL; korelasyon katsayıları 0.9853, 0.9925, 0.9844, 0.9921 ve 0.9899 olarak tespit edilmiştir. Yöntemin, farmasötik preparatlarda beş PPI'nin belirlenmesi için uygulanabilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Erk²⁸, farmasötik dozaj formlarında ve insan plazmasında, camısı karbon elektrot kullanarak pantoprazolün belirlenmesi için diferansiyel puls voltametri yöntemi geliştirmiştir. Pantoprazol için en iyi voltametrik cevap, Britton-Robinson tampon çözeltisinde (pH 5.0), camısı karbon elektrotta, 20.0 mV/s tarama hızında ve 50.0 mV puls şiddetinde elde edilmiştir. Yöntemin farmasötik dozaj formlarından pantoprazolün belirlenmesi için, 6.0×10^{-6} – 8.0×10^{-4} M (korelasyon katsayısı 0.9996) derişim aralığında doğrusal olduğu tespit edilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 4.0×10^{-7} M ve 9.0×10^{-7} M olarak bulunmuştur. Yöntemin farmasötik praparatlardan ve plazmadan sırasıyla geri kazanımları % 99.7- % 100.4 ve % 97.7- % 101.6 olarak tespit edilmiştir. Yöntemin farmasötik dozaj formlarında ve insan plazmasında pantoprazolün belirlenmesi için uygulanabilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Abeer ve Gehad²⁹, saf form, ilaç formülasyonları ve biyolojik sıvılarda pantoprazol sodyumun belirlenmesi için voltametrik yöntem geliştirmişlerdir. Pantoprazol sodyumun elektrokimyası davranışı, Britton-Robinson elektrolitinde (pH 8.0) camısı karbon elektrotta siklik voltametri, diferansiyel puls ve kare dalga voltametri teknikleriyle incelenmiştir. Pantoprazol sodyum için 833 mV'da difüzyon kontrollü geri dönüşümsüz anodik oksidasyon piki elde edilmiştir. Diferansiyel puls voltametri ve kare dalga voltametri için sırasıyla oksidasyon pik akımlarının doğrusal derişim aralıkları 0.5-7.5 μ M (korelasyon katsayısı 0.999) ve 0.675-4.375 μ M (korelasyon katsayısı 0.992) olarak bulunmuştur. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla diferansiyel puls voltametri için 0.0318 ve 0.106 μ M, kare dalga voltametri için 0.0076 ve 0.2535 μ M olarak

belirlenmiştir. Pantoprazol sodyumun diferansiyel puls voltametri ve kare dalga voltametri için geri kazanım değerleri, sırasıyla farmasötik dozaj formlarında % 98.95-99.79, % 98.64-99.55 aralığında; insan idrarında % 99.75-100.1, % 99.9-100.2 aralığında tespit edilmiştir. Yöntemlerin pantoprazol sodyumun farmasötik dozaj formlar ve insan idrarında belirlenmesi için uygulanabilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Altınoç ve Suslu³⁰, farmasötik preparat ve insan plazmasından pantoprazolün belirlenmesi için kare dalga voltametrik yöntem geliştirmişlerdir. Pantoprazol sodyumun elektrokimyasal davranışı, Britton-Robinson elektrolitinde (pH 5.0) Ag/AgCl'ye karşı DCE kullanılarak kare dalga voltametri yöntemiyle incelenmiştir. Pantoprazolün pik akımları -987 mV'da ölçülmüştür. Pantoprazolün farmasötik preparatta belirlenmesi için yöntemin doğrusal olduğu derişim aralığı 0.15-25.23 µg/mL (korelasyon katsayısı 0.9999) olarak tespit edilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.048 µg/mL ve 0.15 µg/mL olarak; geri kazanım ve % BSS değerleri sırasıyla 102.599 ve %1.87 olarak bulunmuştur. Pantoprazolün insan plazmasında belirlenmesi için yöntemin doğrusal olduğu derişim aralığı 0.20–6.67 µg/mL (korelasyon katsayısı 0.9997)'dir. Ayrıca LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.098 µg/mL ve 0.20 µg/mL günüçi ve günlerarası derişim değerleri 0.32, 3.81 ve 5.71 µg/mL'dir. Yöntemin, pantoprazolün farmasötik formülasyonda ve insan plazmalarında belirlenmesi için uygulanabildiği sonucuna varılmıştır.

2.5. Spektroskopik Yöntemler

Spektroskopik yöntemler; inorganik ve organik bileşiklerin kalitatif ve kantitatif tayinlerinde yaygın olarak kullanılmalarının yanında, molekül yapılarının aydınlatılması alanında da sıklıkla başvurulmuş atomik spektroskopi ve moleküler spektroskopiye dayanan analitik yöntemler grubudur.³¹

2.5.1. Spektroskopi

Spektroskopi, madde ile elektromanyetik radyasyonun etkileşimini inceleyen bir bilim dalıdır. Bir numune içerisindeki molekül, iyonların veya atomların, bir enerji seviyesinden diğer enerji seviyesine geçişleri sırasında dönme, titreşimsel ve elektronik enerji seviyelerinde olan değişiklikler ile absorblanan veya yayılan ışının, ölçülmesi ve yorumlanmasına spektroskopi denir.³²⁻³³

2.5.2. Elektromanyetik Işın

Elektromanyetik ışın/radyasyon uzayda çok büyük hız ile hareket eden ve değişik formlar alabilen bir enerji türüdür. Elektromanyetik ışınma iki karaktere sahiptir. Bunlar, dalga ve tanecik karakterleri olup birbirini tamamlayan unsurlardır. Elektromanyetik ışınma, hem elektrik alan hem de manyetik alan vektörüne sahiptir. Bu iki alan vektörü sinüsoidaldır ve radyasyonun yayılma yönüne ve birbirlerine diktir. Bir ışının madde ile olan ilişkisi, bu iki alan vektörü ile olur.³²

Elektromanyetik ışınmanın dalga boyu, periyodu, frekansı, hızı, dalga sayısı, dalgaların çakışması, kırınımı (difraksiyon), kırılması, yansımaları, saçılması, polarizasyonu elektromanyetik ışınmanın dalga özelliği ile açıklanan olaylardır. Fotoelektrik olay, ışının emisyonu, absorpsiyonu ve durulma süreçleri, kimyasal türlerin enerji durumları, elektromanyetik radyasyonun tanecik özelliği ile açıklanmaktadır.³⁴

2.5.3. Işının Absorpsiyonu

Farklı dalga boylarında radyasyon içeren bir ışın demeti, saydam veya şeffaf ortamdan geçirildiğinde bazı dalga boylarının kaybolmasına ışının absorpsiyonu denir.³⁴ Absorpsiyonla ışının sahip olduğu enerjisi, etkileştiği ortamdaki atom, iyon moleküllerine aktarılır ve bu enerjiyi absorpladıklarında uyarılmış olurlar. Uyarılmış atom, iyon veya molekül 10^{-8} - 10^{-9} saniye kadar yaşar ve sonra absorpladığı ışının enerjisini geri vererek tekrar sahip olduğu eski haline ya da temel haline döner. Bu

dönüş genellikle aradaki enerji farkının ısı olarak geri verilmesidir. Madde bu sırada az da olsa ısınır. Maddelerin temel hali ile uyarılmış hali arasındaki enerji farkı birbirinden farklıdır. Bu yüzden maddelerin kendine has absorpsiyon spektrumları vardır. Absorpsiyon spektrumu atomik absorpsiyon ve moleküler absorpsiyon olarak ikiye ayrılır.³⁵

2.5.3.1. Atomik Absorpsiyon

Atomik absorpsiyon, temel halde bulunan veya gaz halindeki atomların UV ve GB'deki ışını absorblaması temeline dayanır. Atomik absorpsiyon, sadece atomdaki elektronların (bir veya daha fazla) üst enerji seviyelerine yükseldiği elektronik bir süreçte gözlenir. Işınlardan atomlar tarafından absorblanmasında sadece elektronik geçişler vardır.³⁵

2.5.3.2. Moleküler Absorpsiyon

Molekölün düşük enerjili atomik ve moleküler orbitallerinin, UV, GB ve infrared ışınları (IR) ile daha yüksek enerjili orbitallere çıkarılması sonucunda gerçekleşir. Birden fazla atom içeren moleküllerde gözlenen absorpsiyon spektrumları, atomlarda gözlenen spektrumlara göre oldukça karmaşıktır. Çünkü moleküllerde bulunan enerji seviyesi, tek başına atomlarda bulunan enerji seviyesinden fazladır. Moleküller, ışınla uyarıldıklarında gerçekleşen kuantlanmış üç tip geçiş vardır. Bunlar elektronik geçişler ve ışın ile oluşturulabilen titreşim ve dönme geçişleridir.

$$E_{Toplam} = E_{elektronik} + E_{titreşim} + E_{dönme}$$

Bu enerjiler arasındaki büyüklük sırası; $E_{elektronik} > E_{titreşim} > E_{dönme}$ şeklindedir. Burada $E_{elektronik}$, moleküldeki bağ oluşturan birkaç elektronun enerji seviyesinden kaynaklanır. Elektronik geçişler, dalga boyları 200-800 nm arasında olan UV-GB ışınlarıyla meydana gelir. $E_{titreşim}$, moleküler türlerde bulunan çok sayıdaki atomlar arası titreşimlerin toplam enerjisini gösterir. Titreşim geçişleri, dalga boyları 1000-1500 nm

arasında olan IR ışınlarıyla meydana gelir. $E_{dönme}$ ise, molekül içinde çeşitli dönme hallerinden oluşan enerjidir. Dönme geçişleri, dalga boyları 10000-100000 nm arasında olan IR ışınlarıyla meydana gelir.

Elektromanyetik ışın ile uyarılan bir atom, iyon veya molekülün uyarılma ömrü çok kısadır. Uyarıldıktan sonra molekül temel hale ışımalı veya ışımasız geçişler ile döner. Işımasız geçişler; iç dönüşüm, sistemler arası geçiş ve titreşimsel durulmadır. Işımalı geçişler; floresans ve fosforesanstır.^{32,34}

2.5.4. Lambert-Beer Kanunu

Bir molekül tarafından absorbe edilen ışının cinsi ve miktarı, molekülün yapısına ve ışın ile etkileşen molekül sayısına bağlıdır. Işın ile molekül arasındaki bu etkileşim *Lambert-Beer kanunu* ile ifade edilir.

Beer kanununa göre, bir çözelti içinden geçen ve çözelti tarafından absorplanan ışın miktarı, çözeltinin derişimi ile; Lambert'e göre ise bir çözeltiden geçen ışın demetinin miktarı ışının aldığı yol ile logaritmik olarak orantılıdır. Bu iki açıklamaya bağlı olarak aşağıdaki bağıntı yazılabilir;

$$A = \log P_0/P = a.b.c$$

Burada orantı katsayısı (a), absorpsiyon katsayısı veya absorbtivite olarak adlandırılır. Birimi L/g cm'dir. Derişim molar olarak alındığında orantı katsayısı olarak ϵ yazılır ve molar absorblama katsayısı veya molar absorptivite olarak adlandırılır. Birimi L/mol cm'dir.³⁶

2.5.5. UV-GB Absorbsiyon Spektrofotometresi

UV-GB absorbsiyon spektrofotometre, elektromanyetik ışının dalga boyunun bir fonksiyonu olarak numunenin absorbans ya da geçirgenliğini ölçmek için kullanılan bir cihazdır. UV-GB absorbsiyon spektrofotometreleri 110 nm ile 1000 nm arasında değişen dalga boylarında çalışırlar. Bir UV-GB absorbsiyon spektrofotometrisi beş

bileşenden oluşur. Bunlar; ışın kaynağı, numune hücresi, monokromatör, dedektörü ve sinyal işlemcisi (Şekil 2.2). Cihazda bulunan bu kısımlara ilaveten mercekler, aynalar, ışın bölücüler ve giriş ve çıkış slitleri vardır.



Şekil 2.2. Bir spektrofotometre cihazı diyagramı

1. Işın Kaynakları: UV ve GB’de sürekli ışın kaynakları olarak döteryum, tungsten hidrojen ve ksenon lambaları kullanılır.

2. Dalga Boyu Seçiciler (Monokromatörler): Işın kaynağının sağladığı polikromatik ışını, monokromatik ışına dönüştüren düzeneklerdir. Monokromatörler spektral taramaları yapabilmek için tasarlanmış gereçlerdir. Yapılarında slitler, mercekler, pencereler, optik ağ veya prizmaları içerirler. Prizmalarda monokromatik ışın eldesi, farklı dalga boylarındaki ışının prizmaya girişinde ve çıkışında farklı oranlarda kırılmasından kaynaklanır. Bu amaçla Corno ve Littrow prizmalar kullanılır.

3. Numune Kapları: Hücre veya küvet olarak adlandırılan numune kapları da, çalışılan dalga boyu aralığındaki ışınlar için geçirgen olmalıdır. Spektrofotometrelerde kuvars veya erimiş silis, corex camı, silikat, plastik, sodyum klorür kristalleri kullanılır.

4. Dedektörler: Maddenin ışın kaynağından gelen ışın şiddetini ölçmesi amacıyla kullanılan düzeneklerdir. UV görünür bölgede fotovoltajik, fototüp ve fotoçoğaltıcı dedektörler kullanılır. Bu dedektörlerin duyarlı oldukları dalga boyu aralıkları farklıdır.

5. Sinyal İşlemcileri ve Göstergeler: Dedektörden alınan elektrik sinyalini yükselten, sinyali doğru akımdan alternatif akıma değiştirebilen, sinyalin faz değişimini

sağlayabilen ve sinyaldeki istenmeyen birleşikleri uzaklaştırabilen elektronik bir düzeneştir.

Spektrofotometreler yapılarına göre tek ışınlı ve çift ışınlı olmak üzere iki kısma ayrılır. Tek ışın yollu spektrofotometrelerde absorpsiyon ve % geçirgenlik ölçmek için önce numune bölmesine referans madde konularak alet ve referans hücreye göre sıfırlanır. Daha sonra numune hücresi konur ve ölçüm yapılır. Çift ışın yollu spektrofotometrelerde, örnek ve çözücüden aynı anda geçen ışın demetleri, dedektör üzerine yerleştirilmiş olan dönebilen bir ışık bölücü yardımıyla, ardı ardına gönderilerek tek seferde absorpsiyon veya % geçirgenlik ölçülebilir.^{34,37,38}

2.5.6. UV-GB Spektroskopisinin Kullanım Alanları

UV-GB spektroskopisi, kalitatif analiz, kantitatif analiz, fotometrik titrasyonlar, moleköl ağırlığı tayini, asit-baz denge sabitlerinin bulunması, kompleks formüllerinin ve kompleks oluşum sabitlerinin bulunmasında kullanılır.

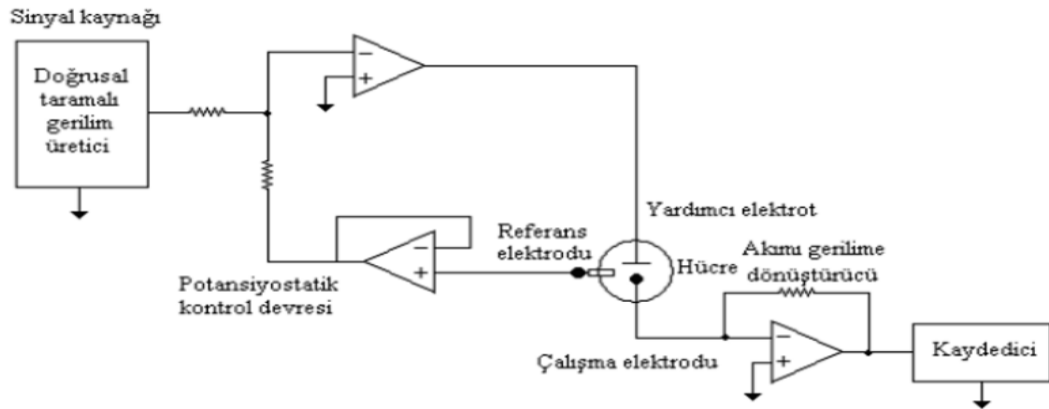
2.6. Elektrokimyasal Yöntemler

Elektrokimya, maddenin elektrik enerjisiyle etkileşimi sonucunda meydana gelen fiziksel veya kimyasal değişimlerini ve ayrıca kimyasal enerjinin elektrik enerjisine dönüşümünü inceleyen bir bilim dalıdır. Elektrokimyasal yöntemlerde elektrot çözelti ortamına elektriksel etki uygulanmaktadır ve bu etki sonucunda ortamın verdiği yanıt incelenmektedir. Elektrokimyanın temelleri yükseltgenme /indirgenme reaksiyonlarına dayanmaktadır. Bu temele dayanan birçok analitik yöntem vardır. Bu yöntemler yükseltgenme/indirgenme titrimetrisi, potansiyometri, kulometri, elektrogravimetri ve voltametriyi içerir.³⁹

2.6.1. Voltametrik Yöntemler ve Voltametri

Voltametrik yöntemler, akım, direnç, iletkenlik, potansiyel ve elektrik miktarının değişim ile değişimini inceleyen elektroanalitik yöntemlerin alt birimidir. Bu

yöntemlerin bazılarında potansiyel sabit tutularak, bazılarında ise potansiyel farklı şekillerde değiştirilerek madde miktarlarına göre oluşan akım miktarları incelenir. Voltametri, bir çalışma (indikatör) elektrotunun polarize olduğu şartlarda akımın, uygulanan potansiyelin fonksiyonu olarak ölçülmesinden yararlanılarak, analit hakkında bilgi veren bir grup elektroanalitik yöntemdir. Voltametri, elektrokimyasal bir hücrede, polarize olan çalışma elektrotu ile referans elektrotu arasına uygulanan potansiyel değerinin zamanla değiştirilerek, ortaya çıkan akımın ölçülmesine dayanmaktadır. Bu ölçme işlemi, üç elektrot içeren elektrokimyasal hücrelerde çalışma elektrotu ile karşıt elektrot, iki elektrot içeren hücrelerde ise çalışma elektrotu ile referans elektrotu arasında bir potansiyostat yardımı ile ölçülür. Potansiyele karşı ölçülen akımın grafiğe geçirilmesiyle voltamogramlar elde edilir.³⁹

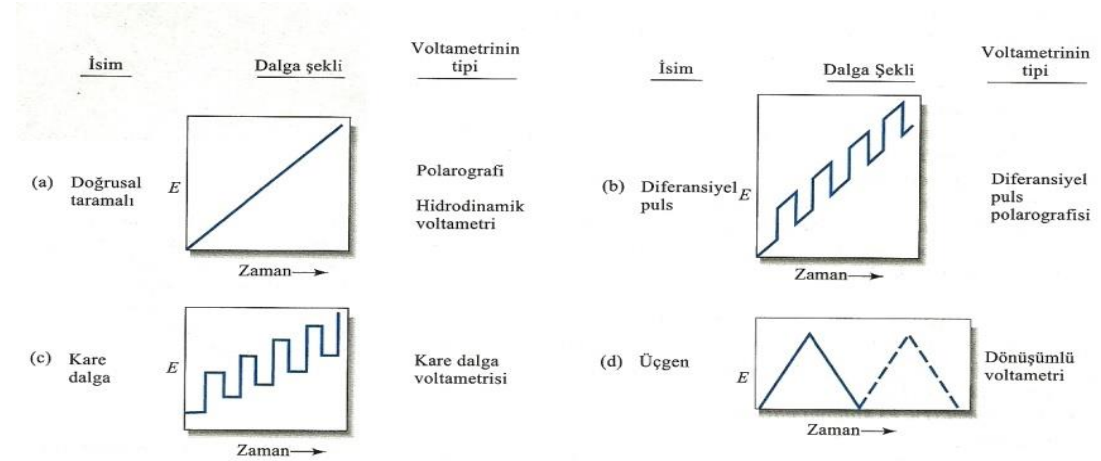


Şekil 2.3. Üç elektrot içeren bir voltametri sistemi

Şekil 2.3’de doğrusal taramalı voltametrik ölçümler için kullanılan basit bir sistem görülmektedir. Hücre, analit ve elektrolitin aşırısını ihtiva eden destek elektrolit adı verilen çözeltiye daldırılmış üç elektrottan oluşmaktadır. Bu üç elektrottan biri zamanla potansiyeli doğrusal olarak değişen ve polarize olabilen mikroelettrot yani çalışma elektrotudur. Bu elektrotun polarize olma eğilimini artırmak için boyutları küçük tutulur. Bunlar, genellikle teflon veya Kel-F gibi içine bir bağlantı teli yerleştirilmiş olan inert bir malzemeden yapılmış bir çubuğa preslenerek tutturulmuş

olan küçük düz iletken disklerdir. Bu iletken platin veya altın gibi inert bir metal; pirolitik grafit, camsı karbon, elmas, karbon nanotüpü, karbon pastası, karbon elyaf gibi bir karbon formu; ya da, kalay veya indiyum oksit gibi bir yarı-iletken; veya bir civa filmi ile kaplanmış bir metal veya civa olabilir. İkinci elektrot, deney süresince incelenen çözeltinin bileşiminden etkilenmeyen ve sabit kalan potansiyele sahip kalomel elektrot veya Ag/AgCl bir referans elektrottur. Üçüncü elektrot ise, elektriğin kaynaktan çözelti yardımıyla mikroelevtröta aktarımını sağlayan helezon şeklinde bir platin tel karşıt elektrottur. Sinyal kaynağı, değişen R direnciyle seri bağlı bir bataryadan oluşan değişken güç kaynağıdır. ^{40(s.665-666)}

Voltametrیده bir mikroelevtröt içeren elektrokimyasal hücreye değiştirilebilir potansiyel uyarma sinyali uygulanır. Bu uyarma sinyali yöntemin temelini teşkil eden karakteristik akım cevapları oluşturur. Voltametrیده en çok kullanılan dört uyarma sinyali doğrusal taramalı, kare dalga, diferansiyel puls ve üçgen dalgadır. Bu uyarma sinyalleri Şekil 2.4'te verilmiştir.



Şekil 2.4. Voltametrیده kullanılan potansiyel uyarma sinyalleri

Klasik voltametrik uyarma sinyali doğrusal taramadır, burada hücreye uygulanan dc potansiyeli (2 ya da 3 V'dan fazla) zamanın fonksiyonu olarak doğrusal bir şekilde artırılır ve bu sırada hücrede oluşan akım, zamanının (ve dolayısıyla uygulanan potansiyelin) fonksiyonu olarak kaydedilir. Puls tipi uyarma sinyallerinde akımlar,

pulsaların ömrü süresince, çeşitli anlarda ölçülür. Üçgen şeklindeki uyarmada potansiyel, başlangıçta bir maksimuma doğrusal olarak artar ve aynı mutlak sayısal verimle orijinal değerine doğrusal olarak azalarak iki değer arasında üçgen şeklinde devreder. Bu işlem zamanın bir fonksiyonu olarak kaydedilen akımla defalarca tekrarlanır.^{40(s.673)}

2.6.1.1. Voltametrde Elektrot Reaksiyon Çeşitleri

Elektroaktif türlerin elektrokimyasal oksidasyonu veya redüksiyonu elektrot-çözelti ara yüzeyinde çok ince bir çözelti tabakasında (~30 nm) gerçekleşir. Bu nedenle çözüldiden elektrot yüzeyine reaksiyona giren türlerin sürekli olarak aktarımı gerekir. Ox (oksidant-yükseltgen) bir madde elektron aktarımıyla Red (redüktant-indirgen) maddesine dönüşmesi ile elektrot-çözelti ara yüzeyinde bazı olaylar meydana gelir. Bunlar, Ox maddesinin çözüldiden elektrot yüzeyine taşınması (difüzyon (rasgele hareket) veya konveksiyon (karıştırma) veya migrasyon (göç). Ox maddesinin elektrot yüzeyinde indirgenmesi için elektrot aktarımı ve oluşan Red maddesinin çözültiye taşınması olaylarıdır.

Bir elektrot reaksiyonu sonucu oluşan ürün kararlı olmayabilir. Bu durumda, elektroaktif maddenin elektron transferiyle oluşturduğu kararsız ara ürün kimyasal reaksiyonla ürüne dönüşebilir. Ayrıca adsorpsiyon kontrollü reaksiyonlar gerçekleşebilir. Adsorpsiyon; çözültide bulunan molekül ve iyonların elektrotun yüzeyine farklı yollarla tutunmasıdır. Adsorpsiyon sonucu elektrot yüzeyine bağlanan iyon ve moleküller ile elektrot yüzeyi arasında farklı türde bağlar oluşmaktadır. Elektrot yüzeyine adsorbe olan türler yüksüz organik moleküller, metal katyonlar, inorganik türler şeklinde bulunabilmektedirler. Difüzyon dikkate alınarak türetilen ve dönüşümlü voltamogramdaki pik akımını veren Randles-Sevcik eşitliğinden ($I_p = 2,69 \cdot 10^5 \cdot n^{3/2} \cdot A D_0^{1/2} C_0 v^{1/2}$), log i_p ve log v arasında, eğimi 0.5 olan bir doğru elde edilir. Burada I_p : pik akımı (A), D_0 : Ox türünün difüzyon katsayısı (cm^2/s) v : Tarama hızı (V/s), C_0 : Ox

türünün ana çözelti derişimi (mol/cm^3)'dir. Maddenin elektrot yüzeyinde adsorpsiyonu söz konusu ise, bu bağıntıdan ve dolayısıyla 0.5'den sapmalar meydana gelir ve genellikle bu durumda grafiklerin eğimi 0.5'den büyük olur.⁴¹

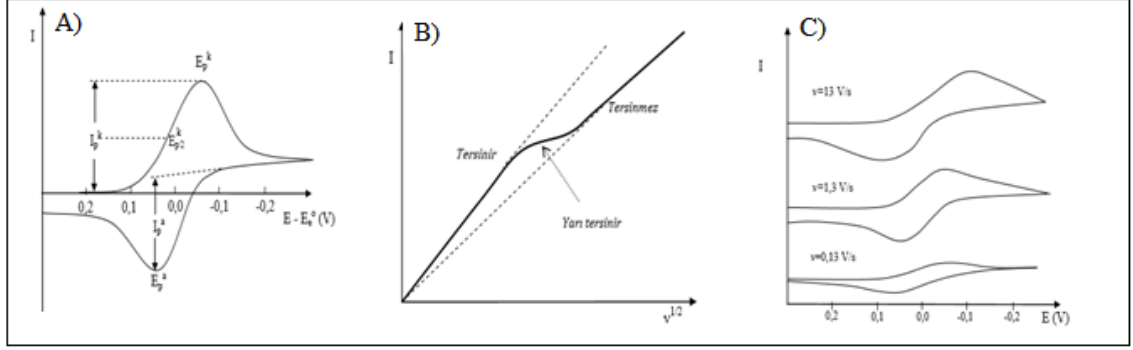
2.6.1.2. Voltametrinde Mekanizma Çeşitleri

Voltametrinde mekanizma çeşitleri, tersinir, yarı tersinir ve tersinmez olarak üçe ayrılır. Tersinir reaksiyonlarda yüzeyde elektron aktarım hızlı gerçekleşmektedir (Şekil 2.6A). Bir tepkime yavaşsa ve potansiyel tarama hızı arttırılırsa tepkimede kararsız hal difüzyonu artar. Dönüşümlü voltametri çalışmalarından yararlanılarak bir tepkimenin tersinir olup olmadığının belirlenmesinde; $E_{pk}-E_{pa}= 59/n \text{ mV}$ veya $E_p-E_p/2= 57/n \text{ mV}$ olması, $i_{pa} / i_{pk}= 1$ olması, E_p 'nin, $i_p/v^{1/2}$ 'nin ve dalga şeklinin tarama hızı ile değişmemesi kriterleri kullanılır. Bu kriterler sağlanıyorsa tepkimenin tersinir olduğu söylenebilir.

Yarı tersinir reaksiyonlarda akım, difüzyon hızı ve elektron aktarım hızı ile birlikte kontrol edilir. Redoks çiftinin elektrot yüzeyindeki derişimlerinin değişmesinde difüzyon ve kinetik olaylarının her ikisi de etkilidir. Bu sebeple difüzyon ve kinetik eşitlikleri birlikte çözülür. Bu tür mekanizmalarda sistem tersinir ve tersinmez mekanizmalar arasında davranış sergiler (Şekil 2.6B). Bir tepkimenin yarı-tersinir olduğunun belirlenmesinde de dönüşümlü voltametri çalışmalarından elde edilen verilerden yararlanılır. Bu amaçla, $i_p/v^{1/2}$ tarama hızına bağlı olmaması, $i_{pa} / i_{pk}= 1$ olması, E_{pk} 'nin tarama hızı ile değişmesi (bu değişme genellikle tarama hızının artması ile negatif değerlere kayma yönündedir.), $E_{pk}-E_{pa}$ farkının düşük tarama hızlarında 59/n'e yaklaşması gibi kriterler incelenir. (Yüksek tarama hızlarında bu değerden daha büyüktür ve tarama hızı ile artar.)

Elektrokimyasal olarak bir elektrot tepkimesinin tersinmez olduğunu dönüşümlü voltametri çalışmalarında ters tarama yönünde herhangi bir pikin gözlenmemesi gösterir

(Şekil 2.5C). Ayrıca sistemin tersinmez olduğu; $E_{pa} - E_{pk} > 59/n$ mV veya $E_p - E_p/2 = 48/n$ mV olması, E_p tarama hızı ile değişmesi gibi kriterler ile belirlenir. Tarama hızı arttırıldıkça anodik pikler daha anodik potansiyele, katodik pikler ise daha katodik potansiyele kaymaktadır.⁴¹



Şekil 2.5. A) Tersinir B) Yarı tersinir C) Tersinmez bir reaksiyon için alınan dönüşümlü voltamogram

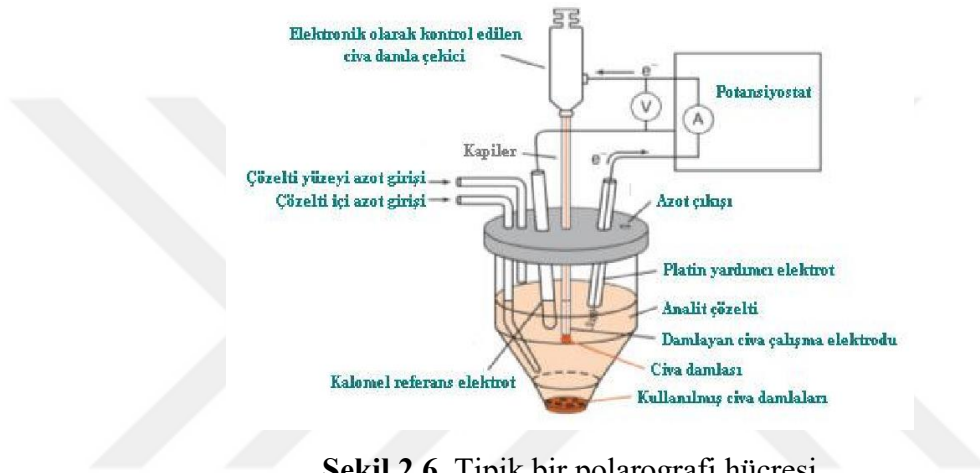
2.6.2. Polarografi

Damlayan civa (Hg) elektrotun çalışma elektrotu olarak kullanıldığı voltametrik yöntem polarografi denir. Bu yöntemde, civa çalışma elektrotuna zamanla doğrusal olarak değişen bir gerilim programı uygulanarak elektroaktif maddelerin davranışları incelenir. Polarografik yöntemde elde edilen cevap eğrisine polarogram denir. Civa inert bir metaldir ve üzerinde suyun indirgenerek hidrojen gazı oluşumu için gerekli olan indirgenme gerilimi oldukça büyüktür. Bu özelliğinden dolayı civa elektrotunun indirgenme bölgesindeki çalışma aralığı oldukça geniştir ve birçok indirgenme tepkimesini incelemek için kullanılabilir. Bununla beraber civa +0.40V'da doymuş kalomel elektrot (DKE) yükseltgenmeye başladığından daha pozitif gerilimlerde çalışmak mümkün olmamaktadır. Polarografik yöntemin çalışma aralığı +0.40 V ile -1.80 V (DKE) arasındadır.^{40(s.680-682)}

Polarografik yöntemde çalışma, karşılaştırma, ve karşıt elektrotları içeren üç elektrotlu sistemler kullanılır. Çalışma elektrotu olarak damlayan civa elektrotu (DCE),

genel olarak karşıit elektrot olarak platin tel ve karşılaştırma elektrotu olarak da DKE kullanılır. Polarografide, DCE'de, iç çapı 0.03-0.05 mm olan bir mikroelettrotta, bir civa damlası cam bir kapiler borudan akarak büyür ve belli bir büyüklüğe geldiğinde koparak düşer.

Polarografinin çalışma prensibi; elektroaktif bir madde içeren çözeltide çalışma ve karşılaştırma elektrotları arasına zamanla doğrusal olarak değişen bir gerilim uygulanırken çalışma elektrotu ile karşıit elektrot arasından akım ölçülür.(Şekil 2.6)



Şekil 2.6. Tipik bir polarografi hücresi

Civa elektrotu diğer elektrotlarla karşılaştırıldığında birçok avantaja sahiptir. Bunlar; her yeni damla ile sürekli yeni bir yüzey oluşturulabilmesi, tekrarlanabilir civa damlaları ile tekrarlanabilir akımların elde edilebilmesi, negatif potansiyellerde kullanılabilmesi, geniş bir potansiyel aralığında uygulanabilmesi, birçok metalin civanın yüzeyinde indirgenerek civa ile birlikte amalgam oluşturabilmesi ve önceki işlemlerden kalan istenmeyen safsızlıkların civa yüzeyinden uzaklaştırılabilmesidir. Bu avantajlarının yanında, bu elektrotların civanın kolayca yükseltgenmesi nedeniyle anodik sınırın küçük olması ve civanın sağlık açısından olumsuz etkisi gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Ancak yapılan çalışmada polarografinin sayılan sakıncaları yanında avantajları çalışılan potansiyel aralığında ve çalışma şartları göz önüne alındığında göz ardı edilebilir.

Damlayan elektrotlardaki difüzyon akımı, yani polarografik dalgayı oluşturan difüzyon akımı İlkoviç denklemi ile verilir. ⁴⁰

$$I = 607nFD^{1/2}m^{2/3}t^{1/6}C$$

Ortalama akım I (μA), damla ömrü t (saniye), kapilerden cıvanın akış hızı m (mg/s), analitin difüzyon katsayısı D (cm²/s), analit konsantrasyonu C (milimol/litre)

2.7. Elektroanalitik Yöntemlerin Kullanım Alanları

Elektroanalitik yöntemler, kalitatif ve kantitatif analizler, elektrot reaksiyon mekanizmalarının belirlenmesi, oksidasyon basamağı, sitokiyometri, reaksiyon hızı ve yük transferinin belirlenmesi, kütle aktarımı ve adsorbsiyon olaylarının incelenmesi, standart elektrot potansiyellerinin belirlenmesi, kimyasal ve elektrokimyasal reaksiyon denge sabitlerinin belirlenmesi, difüzyon katsayılarının belirlenmesi, elektrot yüzey alanlarının tespiti, korozyon çalışmaları, organik veya inorganik materyallerinin ince filmlerinin oluşturulması, elektrokimyasal polimerizasyon, enerji üretimi ve elementlerin geri kazanımı kullanım alanlarına sahiptir.

2.8. Kemometri Yöntemi

Kemometri; gelişen bilgisayar, yazılım, istatistik ve uygulamalı matematik gibi alanların birlikte kullanımıyla, özellikle analitik kimyada kompleks sistemlerin çözümüne yönelik oluşturulan, kimyasal verilerin işlenmesini kapsayan bir kimya bilim dalıdır. Kemometrik yöntemler, kimyasal verilere etki eden parametreleri, bu parametrelerin etkisinin ne ölçüde olduğunu ve parametreler arasındaki etkileşim miktarlarını belirlemek amacı ile geliştirilmiştir. Kemometri, tanımlayıcı ve açıklayıcı istatistik, sinyal işleme, modelleme, deneysel tasarım, optimizasyon, kalibrasyon, sınıflandırma, yapı tanıma, yapay akıl yöntemleri, bilgi ve sistem kuramı, resim işleme gibi kavram ve uygulama konularından oluşmaktadır. Kemometri analitik kimya (biyoloji, tıp, sanayi vb), organik kimya, fizikokimya, mühendislik, istatistik

(matematik) olmak üzere birçok bilim dalında programlama ve hesaplama bilim dallarında kullanılmaktadır.^{42,43}

Kemometrik uygulamalar, kompleks hesaplamalar içerir. Hesaplamalar için bilgisayar programlarına ihtiyaç vardır. Kemometrik yöntemlerin hesaplamalarında genellikle Design Expert, MATLAB ve EXCEL gibi programlar kullanılmaktadır.⁴⁴

2.8.1. Deneysel Tasarım

Bir analiz için deneysel tasarım oluşturulmasında sıklıkla kullanılan faktör, yanıt ve seviye gibi birçok terim vardır. Deney sonucunu etkileyen değişkenlere faktör denilmektedir. Elde edilen sonuç, yanıt ve faktörlerin aldığı değerler seviye olarak adlandırılmaktadır. Sıcaklık, pH, derişim gibi kontrol edilebilen değişken faktörler olduğu gibi deneyi yapan kişilerden kaynaklanan farklılıklar gibi kontrol edilemeyen faktörlerde vardır. Deneyin tasarımında bu kontrol edilemeyen faktör etkilerinin en aza indirilmesi oldukça önemli bir basamaktır. Kontrol edilemeyen faktörlerin dikkate alınabilmesi için randomizasyon (randomization) tekniği kullanılabilir ve böylece konu dışı değişkenlere karşı önlem alınmış olur.

Deneysel tasarımın kimyasal verilere uygulanma sebepleri; deneysel sonucu etkileyen en önemli faktörlerin neler olduğu, incelenmesi ve optimize edilmesi gereken faktörlerin hangileri olduğu sorularına yanıt bulmak ve zaman ve maliyet tasarrufu yapmaktır. En sık kullanılan kemometrik deneysel tasarım yöntemleri full faktöriyel, fraksiyonel faktöriyel, Placket Burman ve merkezi kompozit tasarımıdır. Her bir faktörün optimum koşulları bulunmak istendiğinde, yaygın olarak merkezi kompozit tasarım yöntemi uygulanır.⁴⁴

2.8.1.1. Merkezi Kompozit Tasarım

Merkezi kompozit tasarım, full faktöriyel veya fraksiyonel faktöriyel ve star tasarımın kombinasyonudur. Merkezi kompozit tasarımda deney sayısı aşağıdaki eşitlik

kullanılarak belirlenir.

$$\text{Deney sayısı} = 2^k + 2k + 1 \quad (k:\text{faktör sayısı})$$

2^k , full faktöriyel yada fraksiyonel faktöriyel tasarımdaki deney sayısını, $2k$ star tasarım deney sayısını ve 1'de orta seviyedeki deney sayısını belirtmektedir. Merkezi kompozit tasarım yöntemiyle: faktörlerin etkisi ve faktörler arasındaki etkileşim incelenebilir, tekrarlanan deneyler ile deneysel hatanın olup olmadığının anlaşılabilir, her bir faktörün parabolik etkileri incelenebilir ve optimum koşullar bulunabilir.

Merkezi kompozit tasarımda deneysel hataların belirlenebilmesi için, orta seviyede 4-6 kez tekrar deneyi yapılır. Faktör sayısı ile deney sayısı değişmektedir. Merkezi kompozit tasarım yöntemi ile deneysel tasarım tablosu oluşturulurken kodlanmış şu değerler kullanılır; 2^k 'daki seviyeler (-1) ve (+1), 2^k 'dakiler $\pm\alpha$ ve 1'deki seviye (0) olarak alınır. Merkezi kompozit tasarımda star noktalar (k) dairesel ve ortagonal olmak üzere iki şekilde hesaplanabilir. 2 faktör için star değerleri aşağıdaki gibidir;

$$\text{Dairesel tasarımda; } \alpha = \pm 1.414$$

Star değerleri çalışma aralığındaki alt ve üst sınırları belirir ve star seviyelerinde faktörlerin aldığı değerler aşağıdaki eşitlikle hesaplanır:

$$\alpha = \pm \sqrt[4]{2^k}$$

Star seviyelerinin aldığı değerler aşağıdaki eşitlikle hesaplanır:

$$\alpha = \pm \frac{x - \text{orta değer}}{\text{orta değer ile en yakın değer arasındaki fark}}$$

Genellikle incelenen faktör değerleri arasındaki fark birbirine eşittir. Bu nedenle orta değerle en yakın değer arasındaki fark, aralık boyutu olarak düşünülür. Faktör değerlerinden star seviye değerleri bulunarak merkezi kompozit tasarım tablosu oluşturulur.⁴⁴ Verilen seviye değerleri, faktör değerleri arasındaki farkın eşit olduğu değerler için geçerlidir.

Merkezi kompozit tasarımıda, her deney için değiştirilecek parametrelerin tespit edilmesinde matematiksel matris oluşturulur.

Matrisin oluşturulmasından sonra bilgisayar yardımı ile; oluşturulan matrisin türevi alınır (X'). Matrisin türevi ile kendisi çarpılır ($X*X'$). ($X*X'$) matrisinin tersi alınır $(X*X')^{-1}$. Denemeler sonucunda bulunan yanıt değerleri ile $(X*X')^{-1}*X^{-1}$ çarpılması sonucu bulunan bu çarpım değerleri b değerleri olarak kodlanır ($b = (X * X')^{-1} * X' * y$) b değerleri belirlendikten sonra aşağıdaki denklem oluşturulur;

$$y = b_0 + \sum_1^k b_i x_i + \sum_1^k b_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j}^k b_{ij} x_i x_j$$

Burada y: yanıt; $x_1, x_2, \dots, x_k$ faktörler; $b_1 \dots b_k$ regresyon modeli ile belirlenen katsayılar, $b_{ij}x_i x_j$ faktörler arasındaki etkileşim; $b_{ii}x_i^2$ ise modelin eğriliğini tanımlar. Elde edilen bu kodların gerçek değerlere dönüştürülmesiyle, seçilen faktörlerin optimum şartları belirlenmiş olur.⁴⁴

2.9. Yöntem Geliştirme ve Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)

Analitik kimyada doğru ve güvenilir veri sağlamak önemlidir. Analitiksel verinin niteliği, yöntem geliştirme ve geçerlilik testleri kalitesi üzerinde direkt bir etkiye sahiptir. Yöntem geliştirme ve geçerlilik testlerinde ilk adım olarak yöntem için kabul edilebilir şartlar olan minimum kriterler belirlenmektedir.

2.9.1. Yöntem Geliştirme

Yöntem geliştirmede; sırasıyla yöntemin amacını, kapsamını ve uygulaması, performans parametreleri ve kabul kriterleri, cihazın performans karakterleri tanımlanmalıdır. Daha sonra çalışan materyaller nitelenmeli ve yöntem geliştirilip belgelenmelidir.

2.9.2. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)

Geçerlilik testi (validasyon), ürünlerin değerlendirilmesinde, seçilen yöntem ya da yöntemlerin kalitatif veya kantitatif analizlerde uygulanabilir olduğunu göstermek

amacıyla yapılan testlerin tümüdür. Analitik alanda değişik amaçlar için düzenlenen kurallar, dünyanın değişik bölgelerinde kullanım amaçlarına göre farklılıklar göstermektedir. Validasyon için dünyada kurallar belirleyen grupların bazıları ICH (The International Conference on Harmonization), GLP (Good Laboratory Practice), GMP (Good Manufacturing Practice)), FDA (Food and Drug Administration) ve USP Farmakope XXIV' dir.

Analitik bir yöntemin geçerliliğini (validasyonunu) göstermek amacıyla kullanılan parametreler:

1. Belirleyicilik/ Seçicilik (Specificity/ Selectivity)
2. Doğrusallık (Linearity) ve Çalışma aralığı (Range)
3. Doğruluk (Accuracy)
4. Kesinlik (Precision); Tekrarlanabilirlik (Repeatability), Arakesinlik (Intermediate Precision) ve Yenilenebilirlik (Reproducibility)
5. Duyarlılık Limiti (Sensitivity); Teşhis Limiti (Gözlenebilme Sınırı) (LOD) ve Miktar alt Tayini (Tayin Alt Sınırı) (LOQ)
6. Geri kazanım (Recovery)
7. Örneklerin Kararlılığı, Stabilite (Stability)

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Deneyde Kullanılan Materyaller

3.1.1. Kimyasal Maddeler

Pantoprazol, standart kimyasal maddesi Sigma-Aldrich'den (Almanya) elde edildi. Deneylerde çözeltilerin hazırlanması amacıyla kullanılan saf su Milli-Q saflıkta olup EASY püre RF cihazı kullanılarak elde edildi. Kimyasal madde olarak kullanılan CH_3COOH , H_3BO_3 , H_3PO_4 , NaOH ve Na_2HPO_4 Sigma-Aldrich'den (Almanya) elde edildi. Pantoprazol içeren Pandev, Panref ve Protonex isimli ticari farmasötik preparatlar eczanelerden temin edildi.

3.1.2. Cihazlar ve Araçlar

Moleküler absorpsiyon ölçümleri için Thermo Scientifie marka Multiscan GO 51119300 model UV-GB Spektrofotometre (Band aralığı 1.0 nm), Lenova model bilgisayar ve standart 96 Well UV kuvartz mikrolpaka (Helima, 370 μL) kullanıldı.

Polarografik ölçümler için, cıva damla çalışma elektrodu, platin-tel karşıt elektrot ve referans elektrot olarak bir Ag/AgCl (KCl 3M, BAS) elektrotu olmak üzere üç elektrotlu bir hücre sistemi içeren Gamry Potentiostat Interface 1000, yazılım PHE 200 ve PV 220 cihazı kullanıldı.

pH ölçümleri laboratuvar ortam sıcaklığında (22-25⁰C), standart tamponlar (Fixanal, Riedel-deHaen, Almanya) ile kalibre edilmiş Model 538 pH metre (WTW, Avusturya) ile yapıldı. İstenilen hacimlerde çözücü ve çözelti aktarımı için Eppendorf Research serisi 100-1000 μL ve 1000-5000 μL otomatik pipetler kullanıldı. Ayrıca çalışmada santrifüj (Hettich, RPM x100), terazi (Metler Toledo Ad 104-5), karıştırıcı vorteks (IKA), etüv (Memmert) ve ultrasonik banyo (Elma LC30) cihazları kullanıldı.

3.2. Deneyde Kullanılan Yöntemler

3.2.1. Spektrofotometrik Yöntem Şartları

Spektrofotometrik ölçümler, 96'lık kuvartz plate, 230-400 nm dalga boyu aralığında, 600 nm/dak dalga boyu tarama hızı ve 1 nm spektral bant genişliği kullanılarak gerçekleştirildi. Pantoprazol etkin maddesi üzerine gönderilen ışının, dalga boylarına karşı verdiği absorbans değerleri grafiğe geçirilerek UV-GB absorbans spektrumları elde edildi.

3.2.2. Polarografik Yöntem Şartları

Polarografik ölçümler, 0.4 ile -1 V potansiyel aralığında, 100 mV tarama hızı ile dönüşümlü, doğrusal taramalı, kare dalga polarografi (SWP) ve diferansiyel puls polarografi (DPP) yöntemleri kullanılarak gerçekleştirildi. SWP yönteminde, 25 mV puls genliği, 15 Hz frekans, 4 mV potansiyel adım çalışma parametreleri kullanıldı. DPP yönteminde ise 50 mV puls genliği, 50 ms darbe genişliği, 20 mV/s tarama hızı çalışma parametreleri kullanıldı. Bütün polarografik yöntemlerde çalışma elektrotu olarak DCE, referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrodu ve karşıt elektrot olarak Platin tel kullanıldı. Pantoprazol etkin maddesinin okside olduğu potansiyele karşı, verdiği pik akım değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle polarogramlar elde edildi.

3.3. Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.3.1. Pantoprazolün Stok, Standart ve Kalite Kontrol Çözeltileri

Spektrofotometrik Çalışmalarda: Pantoprazol stok çözeltisi, 100 mg pantoprazol tartılıp 100 mL'lik balon jojeye konularak suda 1000 µg/mL derişimde hazırlandı ve vorteks ile 30 sn karıştırıldı. Daha sonra bu stok çözelti 0.08M pH'sı 11.3 olan fosfat tampon ($\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$) çözeltisi ile seyreltilerek 100 µg/mL derişimde ikinci bir stok çözelti hazırlandı. Vorteks ile 30sn karıştırıldı ve hazırlanan çözelti +4°C'de saklandı. Pantoprazolün 100 µg/mL derişimde hazırlanan standart stok çözeltisi, 0.08M

pH'sı 11.3 olan fosfat tampon ($\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$) çözeltisi ile seyreltilerek 2.5, 5, 10, 15, 20 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ derişimlerde standart çalışma çözeltileri ve 5,10 ve 15 $\mu\text{g/mL}$ derişimlerde kalite kontrol çözeltileri hazırlandı.

Polarografik Çalışmalarda: Pantoprazol stok çözeltisi, 50 mg pantoprazol tartılıp 100 mL'lik balon jojeye konularak 0.25 M pH'sı 5.0 olan asetat tamponunda ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$) 50 $\mu\text{g/mL}$ derişimde hazırlandı ve vorteks ile 30 sn karıştırıldı. Hazırlanan çözelti $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı. Pantoprazolün 50 $\mu\text{g/mL}$ derişimde hazırlanan standart stok çözeltisi 0.25 M pH'sı 5.0 olan asetat tampon ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$) çözeltisi ile seyreltilerek 5, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 $\mu\text{g/mL}$ derişimlerde standart çalışma çözeltileri ve 5,15 ve 35 $\mu\text{g/mL}$ derişimlerde kalite kontrol çözeltileri hazırlandı.

3.3.2. Spektrofotometri ve Polarografi Yöntemlerinde Kullanılan Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

0.08M pH'sı 11.3 olan fosfat tampon ($\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$) çözeltisi: 0.08M 100mL fosfat tampon çözeltisi hazırlamak için, 1.136 g NaH_2PO_4 yaklaşık 90 mL suda çözüldükten sonra pH metre kullanılarak 3M NaOH çözeltisi ile pH'sı 11.3'e ayarlandı. Daha sonra hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

0.25 M pH'sı 5.0 olan asetat tampon ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$) çözeltisi: 0.25 M 100 mL asetat tampon çözeltisi hazırlamak için, 1.14 mL CH_3COOH yaklaşık 90 mL suda çözüldükten sonra pH metre kullanılarak 3M NaOH çözeltisi ile pH'sı 5.0'a ayarlandı. Daha sonra hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

0.04M Britton-Robinson tampon çözeltisi: 0.247 g H_3BO_3 bir miktar saf suda çözüldü. Üzerine 0.23 mL CH_3COOH ve 0.271 mL H_3PO_4 ilave edildi. Hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

3.4. Spektrofotometrik Yöntemin Optimum Koşullarının Belirlenmesi

En yüksek absorbansın gözlenmesinde etkili olan Na_2HPO_4 derişiminin ve uygun pH'nın belirlenmesi amacıyla, kemometrik tasarım yöntemlerinden biri olan merkezi kompozit tasarım yöntemi uygulandı. Belirtilen kemometrik tasarım için gerekli faktörler ve belirlenen aralıklar Tablo 3.1'de verildi.

Tablo 3.1. Pantoprazolün belirlenmesi için faktörler ve belirlenen aralıklar

X₁ (1. faktör)	Fosfat Tampon Çözeltisi Derişimi	0.08	0.19	0.3
X₂ (2. Faktör)	pH	11	12.25	13.5

Belirlenen faktörlerin aralıklarına göre Tablo 3.2'de çalışma şartları verilen 13 deney yapıldı. Veri ve her bir deneme için, pantoprazolün maksimum absorpsiyon gösterdiği dalga boyunda absorbansları belirlendi. Bulunan absorbans değerlerinden denklemler oluşturuldu. Dizayn-expert 8 yazılımı kullanılarak bu denklemler iterasyon yöntemi ile çözüldü. Bu şekilde her bir faktör için optimum değerler tespit edildi.

Tablo 3.2. Uygulanan merkezi kompozit tasarım kapsamındaki deneyler

Deney	X ₁	X ₂
1	0.30	11.00
2	0.19	10.48
3	0.19	12.25
4	0.03	12.25
5	0.30	13.50
6	0.19	12.25
7	0.34	12.25
8	0.19	12.25
9	0.19	12.25
10	0.19	12.25
11	0.08	11.00
12	0.19	14.01
13	0.08	13.5

3.4.1. Pantoprazolün Maksimum Absorbans Gösterdiği Dalga Boyunun Belirlenmesi

Pantoprazol etkin maddesinin spektrofotometrik analizini yapabilmek amacıyla, öncelikle çeşitli pH ve çözücülerde absorbansı belirlendi. Bunun için pantoprazol etkin maddesinin 10 µg/mL derişimde çözeltileri hazırlandı ve uygulanan merkezi kompozit tasarım kapsamındaki deneylerde belirlenen derişim ve pH'larda çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan her bir çözelti için absorbans değerleri ölçüldü. Böylece pantoprazol için absorbansın en yüksek olduğu dalga boyu ve çözelti ortamı belirlendi.

3.5. Polarografik Yöntemin Optimum Koşullarının Belirlenmesi

Pantoprazol etkin maddesinin polarografik analizini yapabilmek amacıyla, öncelikle farklı tampon çözeltileri ile (fosfat, asetat, Britton-Robinson) çeşitli pH ve çözücülerde polarografik yanıtı belirlendi. Bunun için pantoprazol etkin maddesinin 10 µg/mL derişimde çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan her bir çözelti için pik akımı değerleri ölçüldü. Böylece pantoprazol için en iyi oksidasyon dalgasının gözleendiği pik akımı göz önüne alınarak en uygun potansiyel ve çözelti ortamı belirlendi.

3.6. Analitik Yöntem Validasyonu

1. Belirleyicilik (Seçicilik)

Örnek içinde bütün komponentlerin varlığında, analitin cevabını doğru bir şekilde ölçmeye özgünlük-seçicilik denir.⁴⁵ ICH rehberine göre, özgünlük tek bir analit için cevabı sağlayan yöntem için, seçicilik ise birden fazla analit için cevabı sağlayan yöntem için kullanılır.

Spektrofotometrik ve polarografik çalışmalarda pantoprazolün hazırlandığı tampon çözeltilerinin, pantoprazolün absorbansı ve pik akımı üzerinde etkisinin olup olmadığı saptandı.

2. Doğrusallık / Çalışma Aralığı

Yöntemin doğrusal olduğu aralığı belirleme işlemidir. Bunun için en düşük derişimden en yüksek derişime kadar bir seri çözelti hazırlanır. Doğrusal aralık belirlendikten sonra çözelti derişimlerine karşı ölçülen cevaplar grafik edilerek kalibrasyon eğrisi elde edilir. Kalibrasyon eğrisinin analiziyle eğrinin doğru denklemi ve korelasyon katsayısı hesaplanır. Kalibrasyon doğrusunun eğimi, yöntemin doğrusal olduğu aralığın matematiksel bir ölçüsüdür. Çalışma aralığı ise kabul edilebilir doğruluk, kesinlik ve doğrusallığın elde edildiği analit derişim genişliğidir.⁴⁵

Pantoprazolün derişimi, spektrofotometrik çalışmalarda, 2.5, 5, 10, 15, 20 ve 25 µg/mL ve polarografik çalışmalarda, 5, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 µg/mL olacak şekilde Bölüm 3.3.1’de belirtilen yöntemler ile çalışma çözeltileri hazırlandı. Elde edilen çalışma çözeltilerinin derişimlerine karşı ölçülen absorbans veya pik akım değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle $y=ax+b$ regresyon eşitliğine sahip kalibrasyon eğrileri türetilti. Korelasyon katsayısı, regresyon eğrisindeki kaymanın ve eğimin standart sapması hesaplandı.

3. Doğruluk / Kesinlik

Doğruluk, deneysel olarak belirlenmiş değer, kabul edilebilir değere veya gerçek değere olan yakınlığı olarak tanımlanır ve bağıl ya da mutlak hata ile ifade edilir. Yöntemin doğruluğu üç yolla gösterilebilir. Bunlar; bilinen derişimlere sahip bir seri örneğin analiz sonucunun gerçek değerle karşılaştırılarak, sonuçların daha önce belirlenen doğru bir yöntemle alınmış sonuçlarla karşılaştırılarak, hedef derişim üzerinde üç düzeyde üç deney yapılarak katım yapılmış numune üzerinde çalışılarak gösterilebilir.

Kesinlik, herhangi bir değerin tekrarlanabilme kabiliyeti veya bireysel test sonuçlarının birbirine yakınlığının bir derecesidir.⁴⁵ Bağlı standart sapma (% BSS) veya varyasyon katsayısı (% VK) ile verilir. Kesinlik üç basamakta ifade edilir.

Tekrarlanabilirlik (Repeatability): Aynı çalışma şartlarında kısa bir zaman aralığında tekrarlanan analiz sonuçlarının birbirine yakınlığıdır. Güniçi kesinlik olarak da adlandırılır.

Ara kesinlik (Intermediate precision): Aynı çalışma şartlarında laboratuvarlar arasındaki farkların (gün değişikliği, analizeci değişikliği, cihaz değişikliği gibi) kesinlik değerlerinin göstergesidir. Günlerarası kesinlik, gün değişkenliği kullanılarak yapılan ara kesinlik çalışmasıdır ve aynı çalışma şartlarında numunelerin farklı günler (en az üç gün) içerisinde tekrarlayan analiz (en az n=6) sonuçlarının birbirlerine olan yakınlık ölçüsü olarak tanımlanır.

Reproducibility (Yenilenebilirlik): Laboratuvarlar arasındaki kesinliği ifade eder (laboratuvarlar arasında yapılan işbirlikli çalışmalar, yöntem standardizasyonu).

Pantoprazolün derişimi, spektrofotometrik çalışmalarda, 5, 15, ve 25 µg/mL ve polarografik çalışmalarda, 5, 15 ve 35 µg/mL olacak şekilde Bölüm 3.3.1’de belirtilen yöntemler ile kalite kontrol çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden gün içi analizler için 6’şar çözelti hazırlandı ve aynı gün UV-GB absorbans spektrumları ve polarogramları alındı. Günler arası analizleri için ise bu çözeltilerden 3 gün boyunca 2’şer kere hazırlandı ve üç farklı günde UV-GB absorbans spektrumları ve polarogramları alındı. Elde edilen analiz sonuçlarının ortalaması ve standart sapmaları belirlendi. Doğruluk ve kesinlik sırasıyla bağlı hata (BH) ve % bağlı standart sapma (% BSS) ile verildi ve aşağıdaki eşitliklere göre hesaplandı.

$$BH = [(bulunan - eklenen) / eklenen] \times 100$$

$$\% BSS = [standart\ sapma / ortalama \times 100]$$

4. Duyarlılık (Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ))

Analitik yöntemin en düşük derişimdeki analitleri saptayabilmesinin bir ölçüsüdür. Duyarlılık iki basamak olarak düşünölmektedir.

Gözlenebilme Sınırı (Teşhis Limiti) (LOD): Bir analitik yöntemin gözlenebilme sınırı, bir numunede incelenen maddenin belirlenebilen en düşük tayin miktarıdır.⁴⁵ Tipik olarak LOD pik boyunun güröltü oranına 3 olduğu veya % BSS değerin %20 den küçük olduğu derişimdir. Ayrıca $LOQ = 3.3 \sigma/S$ formöl ile hesaplanabilir. Burada σ , kalibrasyon eğrisinin kaymasının standart sapması ve S ise kalibrasyon eğrisinin eğimidir.

Tayin Alt Sınırı (Miktar Tayin Limiti) (LOQ): Bir analitik yöntemin tayin alt sınırı analitin, uygun doğruluk ve kesinlikle tayin edilebilecek en düşük derişimidir.⁴⁵ Tayin alt sınırı değeri, pik yüksekliğinin güröltü yüksekliğine oranın 10 olduğu veya % BSS değerin %10'dan küçük olduğu derişimdir. Ayrıca $LOQ = 10\sigma/S$ formöl ile hesaplanabilir.

LOD ve LOQ her iki yöntem için elde edilen kalibrasyon eğrilerinden yararlanılarak aşğıdaki eşitliklere göre hesaplandı.

$$LOD = 3.3 \sigma/S \text{ ve } LOQ = 10 \sigma/S$$

5. Geri Kazanım

Kimyasal analizlerde gerçek değerin ölçölmesi, uygulanan yönteme bağı olarak değışiklik gösterir. Deneysel işlemler sırasında bazı nedenlerle kayıplar oluşur. Bu kayıp miktar oranının ve belirsizliğinin hesaplanması gerekir. Yöntemin kayıp miktarı, geri kazanım oranı olarak tanımlanır. Analiz sonucunda elde edilen değerin gerçek değere oranı geri kazanımdır.

Pantoprazolün derişimi, spektrofotometrik çalışmalarda, 5, 15, ve 25 $\mu\text{g/mL}$ ve polarografik çalışmalarda, 5, 15 ve 35 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde Bölüm 3.3.1'de belirtilen

yöntemler ile kalite kontrol çözeltileri hazırlanarak farmasötik preparatlara eklendi. Geri kazanım çalışmaları standart ekleme yöntemi ile yapıldı ve UV-GB absorbans spektrumları ve polarogramları alındı. Her iki yöntem için % geri kazanım (% GK) aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı.

$$\% \text{ GK} = [(\text{bulunan}/\text{eklenen}) \times 100]$$

6. Kararlılık (Stabilite)

Saklanan örneklerin analiz süresince bozunmadan sabit kaldığından emin olmak için yapılan testlere kararlılık (stabilite) denilmektedir. Normal laboratuvar şartlarında, saf analit veya analit çözeltisinin sıcaklık, ışık, nem ve hava gibi etkilere karşı stabilitesi, yayınlanmış koşullara göre veya laboratuvar testleriyle incelenmelidir. Stabilite deneylerinde kullanılan şartlar çalışma esnasında kullanılan numunelendirme ve analizdeki bütün şartları içermelidir.

Pantoprazolün derişimi, spektrofotometrik çalışmalarda, 5, 10 ve 15 µg/mL Bölüm 3.3.1’de belirtilen yöntemler ile kalite kontrol çözeltileri hazırlanarak oda sıcaklığında, +4 ve -20°C’de 6, 24 ve 48 saat süreyle bekletildi.ve UV-GB absorbans spektrumları alındı. Bulunan değerler, çözeltilerin hemen ölçülen değerleri ile karşılaştırılarak % GK değerleri hesaplandı.

3.7. Tablet Çözeltilerinin Hazırlanması

Spektrofotometri yöntemi için: Pantoprazol içeren tablet formundaki üç adet ticari farmasötik preparattan (Pandev 40 mg, Panref 40 mg, Protonex 40 mg) her biri için 10 adet tablet alınıp tartılarak ortalamaları alındı. Tabletler havanda ezilerek toz haline getirildikten sonra her biri için yaklaşık 1 tablet miktarı (40 mg pantoprazol) alınarak saf su eklendi ve 15 dakika boyunca sonike edildi. Hacim 100 mL’ye tamamlandı. Elde edilen çözeltiler süzüldü ve istenilen derişimleri 0.08M pH’sı 11.3 olan fosfat tampon çözeltisi ile seyreltilerek elde edildi. Bu çözeltilerin spektrumları alınarak absorbans

değerleri ölçüldü. Bu şekilde tabletlerdeki pantoprazol etkin madde içerikleri belirtilen yöntemden elde edilen kalibrasyon eğrilerinden hesaplandı.

Polarografi yöntemi için: Pantoprazol içeren tablet formundaki üç adet ticari farmasötik preparattan (Pandev 40 mg, Panref 40 mg, Protonex 40 mg) her biri için 10 adet tablet alınıp tartılarak ortalamaları alındı. Tabletler havanda ezilerek toz haline getirildikten sonra her biri için yaklaşık 1 tablet miktarı (40 mg pantoprazol) alınarak saf su eklendi ve 15 dakika boyunca sonike edildi. Hacim 100 mL'ye tamamlandı. Elde edilen çözeltiler süzüldü ve istenilen derişimleri 0.25 M pH'sı 5.0 olan asetat tampon çözeltisi ile seyreltilerek elde edildi. Bu çözeltilerin polarogramları alınarak pik akım değerleri ölçüldü. Bu şekilde tabletlerdeki pantoprazol etkin madde içerikleri belirtilen yöntemden elde edilen kalibrasyon eğrilerinden hesaplandı.

4. BULGULAR

4.1. UV-GB Absorpsiyon Spektrofotometri Yöntemi

4.1.1. Pantoprazolün Absorbans Şiddetine Çözücü ve pH'nın Etkisi

Pantoprazolün en yüksek absorpsiyon şiddeti verebileceği çözücü ve ortamı belirlemek için suda, etanolde ve metanolde 1 µg/mL derişimde stok çözeltileri hazırlandı. Daha sonra pantoprazolün belirtilen çözücüler ile seyreltmeleri yapılarak 10 µg/mL derişimde çözeltileri hazırlandı, çeşitli dalga boylarında UV-GB absorbans spektrumları kaydedildi ve maksimum absorbans gösterdiği dalga boylarında absorbans değerleri okundu. Tablo 4.1'de görüldüğü gibi en yüksek absorbans şiddetinin suda gözlemlendiği belirlendi. Ayrıca pantoprazolün en iyi suda çözündüğü gözlemlendi. Literatürde daha önce yapılan çalışmalarda UV-GB absorpsiyon spektrofotometri yöntemiyle pantoprazolün belirlenmesi için bazik ortamın tercih edildiği tespit edildi^{13,14,20}. Bu bilgiler ışığında suda hazırlanan pantoprazol (1µg/mL) çözeltisi, bazik ortamı sağlayacak şekilde farklı fosfat ve Britton-Robinson tampon çözeltileri ve 0.1 M NaOH ile seyreltilerek 10 µg/mL derişimde çözeltileri hazırlandı, çeşitli dalga boylarında UV-GB absorbans spektrumları kaydedildi ve maksimum absorbans gösterdiği dalga boylarında absorbans değerleri okundu (Tablo 4.1). Bu tabloda görüldüğü gibi pantoprazolün su ile çözülüp fosfat tampon çözeltisi ile seyreltilerek elde edilen çözeltinin en iyi absorbans değerine sahip olduğu belirlendi. Bundan sonraki bütün çalışmalarımız bu çözücü karışım ortamında yapıldı.

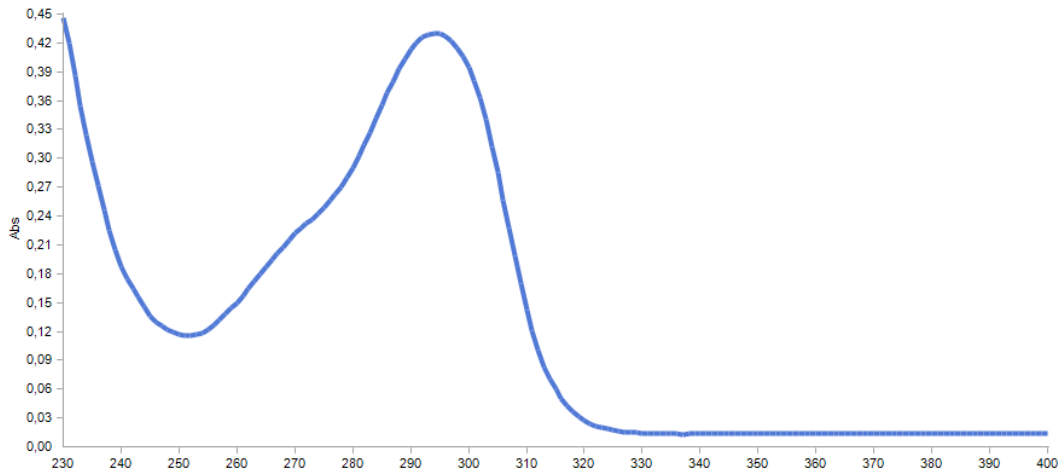
Tablo 4.1. Pantoprazolün (10 µg/mL) absorbans şiddetine çözücü ve pH'nın etkisi

Çözücü	pH	Absorbans	DalgaBoy(nm)
Su	-	0.32	287
Metanol	-	0.29	287
Etanol	-	0.30	288
0.1M NaOH	13	0.38	291
	7	0.31	290
Britton-Robinson	10	0.33	293
tampon çözeltisi	13	0.37	294
	7	0.32	290
Fosfat tampon çözeltisi	10	0.37	294
	13	0.40	294

Bu şartlar altında UV-GB absorpsiyon spektrofotometri yönteminde seçilen çözücünün derişiminin (fosfat tampon çözeltisi) ve pH'nın optimum değerlerinin belirlenmesi amacı ile merkezi kompozit tasarım yöntemi uygulandı.

4.1.2. Pantoprazolün Belirlenmesinde UV-GB Absorpsiyon Spektrofotometri Yönteminin Optimum Koşullarının Merkezi Kompozit Tasarım Yöntemi ile Belirlenmesi

Pantoprazolün suda çözölüp fosfat tamponunda seyreltilerek elde edilen 10 µg/mL çözeltisinin 230-400 nm dalga boyu aralığında taranarak UV-GB absorbans spektrumu alındı. Bu absorbans spektrumuna göre 294 nm dalga boyunda bir maksimum pik gözlemlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. 10 µg/mL pantoprazol çözeltisinin UV-GB absorbans spektrumu

UV-GB absorpsiyon spektrofotometri yönteminin deney koşulları belirlendikten (Bölüm 3.2.1) sonra fosfat tampon çözeltisinin derişimi ve pH'sının belirlenmesi için merkezi kompozit tasarım yöntemi uygulandı. Bu amaç ile 10 µg/mL pantoprazol içeren örnekler ile 13 deney yapıldı ve 294 nm dalga boyundaki absorbans değerleri belirlendi. (Tablo 4.2). Belirlenen absorbans değerleri ile matematiksel model oluşturuldu. Bu matematiksel quadropik modelin yüzey cevapları için elde edilen sonuçlar ANOVA testine tabi tutuldu (Tablo 4.3). Bu hesaplamalara göre pH ve fosfat tampon çözeltisinin derişimi açısından modelin anlamlı olduğu belirlendi ($p<0.05$).

Tablo 4.2. Merkezi kompozit tasarım kapsamında yapılan deneyler sonucunda bulunan yanıt değerleri

Deney	Absorbans (294 nm)
1	0.39
2	0.38
3	0.39
4	0.44
5	0.38
6	0.39
7	0.38
8	0.39
9	0.41
10	0.41
11	0.42
12	0.34
13	0.36

Tablo 4.3. Matematiksel quadropik modelin ANOVA analiz sonuçları

Kaynak	Kareler Toplamı	Df	Ortalama kare	F-değeri	p-değeri olasılık>F
Model	6.677E-003	5	1.335E-0003	7.69	0.0092
Fosfat derişimi	1.125E-003	1	1.125E-003	6.48	0.0384
pH-pH	2.002E-003	1	2.002E-003	11.53	0.0115
Fosfat derişimi-pH	6.250E-004	1	6.250E-004	3.60	0.0996
Fosfat derişimi ²	3.053E-004	1	3.053E-004	1.76	0.2264
pH ²	2.349E-003	1	2.349E-003	13.53	0.0079
Artan	1.215E-003	7	1.736E-004		
Uyum Eksikliği	7.354E-004	3	2.451E-004	2.04	0.2505
Saf Hata	4.800E-004	4	1.200E-004		
Toplam	7.892E-003	12			

Elde edilen matematiksel modelden yararlanılarak Tablo 4.4’de verilen denklemler elde edildi. Bu denklemler Design Expert 8 programında çözüldü.

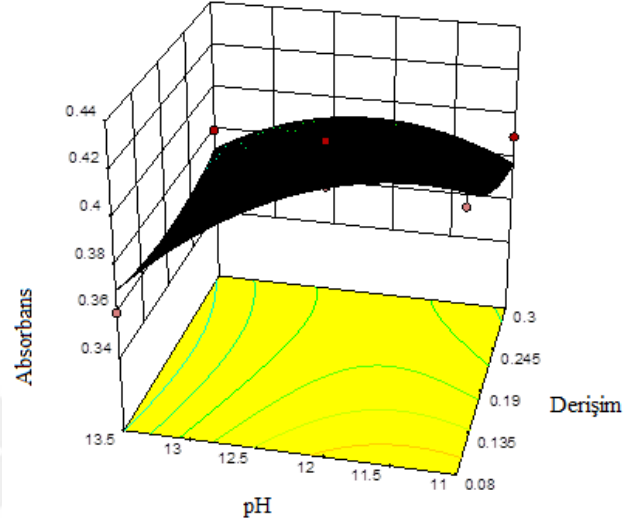
Tablo 4.4. Oluşturulan y denklemleri ve Design Expert 8 programından yararlanılarak çözülen denklemler

$Y = - 0.95985 - 1.42948 X_1 + 0.25819 X_2 + 0.090909 X_1X_2 + 0.54752 X_1^2 - 0.011760 X_2^2$
$dY/d X_1 = 0.1329 - 0.20556 X_1 - 0.039250 X_2 - 0.074500 X_3 = 0$
$dY/d X_2 = 0.031639 - 0.071568 X_2 - 0.039250 X_1 - 0.036500 X_3 = 0$

Deneysel veriler kullanılarak oluşturulan Tablo 4.4’deki denklemlerin çözümü ile Tablo 4.5’de verilen X_1 (fosfat tampon çözeltisi derişimi) ve X_2 (pH)’nin optimum değerleri bulundu ve X_1 ve X_2 ’nin fonksiyonu olarak absorbans yüzey cevap eğrileri elde edildi (Şekil 4.2).

Tablo 4.5. Pantoprazolün merkezi kompozit tasarım yöntemi ile analizi sonucu bulunan optimum değerler

X ₁	Fosfat tampon çözeltisi derişimi (M)	0.08
X ₂	pH	11.3



Şekil 4.2. Fosfat tampon çözeltisi derişimi ve pH'nın bir fonksiyonu olarak absorbansın yüzey cevap eğrileri

Bu parametrelere bakıldığında F-testine göre en iyi sonuçların quadropik yaklaşımla tespit edildiği gözlemlendi. Deney sonuçlarına göre χ^2 değerinin anlamlı çıkması bu tezi doğrulamaktadır. Her bir parametrenin ANOVA test sonucuna göre X₁ (fosfat tampon çözeltisi derişimi) ve X₂ (pH) açısından modelin anlamlı olduğu F-testi ile belirlendi. X₁ ve X₂ ile yapılan modellemede 0.43 absorbans değeri matematiksel olarak hesaplandı. Optimum değerler kullanılarak pantoprazolün derişimi 10 µg/mL olacak şekilde UV-GB absorbans spektrumu alındı ve elde edilen absorbans değerleri Tablo 4.6'da verildi.

Tablo 4.6. Teorik ve deneysel absorbans değerleri

Deney Sayısı	Teorik absorbans değeri	Deneysel absorbans değeri
1	0.43	0.43
2	0.43	0.42
3	0.43	0.43
4	0.43	0.44
5	0.43	0.42
6	0.43	0.43
7	0.43	0.43
8	0.43	0.44
9	0.43	0.43
10	0.43	0.45
	Ortalama	0.432
	%GK $\pm$ SS	100.4 $\pm$ 2.13
	%BSS	2.13

%GK:%Geri Kazanım, SS:Standart Sapma,%BSS:%Bağıl Standart Sapma

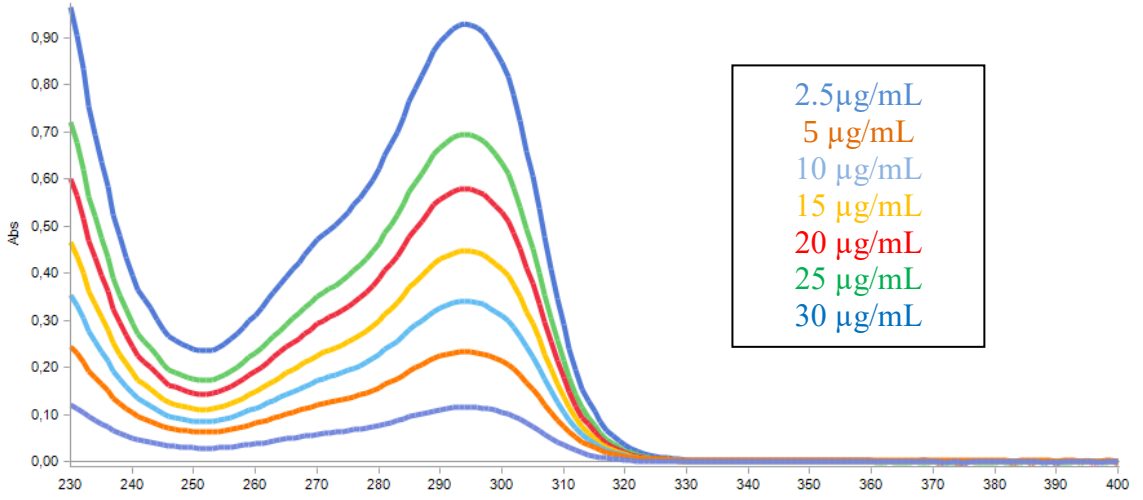
Modelleme ile hesaplanan değer ile deneysel çalışma sonuç değerleri arasında %100.4 geri kazanım değeri vardır. Bu da birbirlerine yakın değerler olduğunu gösterir. Lack of fit değeri ile yöntemin var olan sonuçlarla arasında lineerlik olup olmadığı belirlendi. H_0 hipotezine göre lineer bir ilişki vardı ve bu ilişki bulunan 0.0092 değeriyle reddedildi. Yöntem kümülatif olarak F-testine tabi tutuldu. Test sonucunda belirlenen 7.69 değeri yöntemin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu kanıtladı. Bu bağlamda elde edilen sonuçlara göre modelin ve optimizasyonun istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi. Ayrıca modelin gerekrneklere uygulanabilir olduğu deneysel veriler karşılaştırılarak belirlendi.

4.1.3. UV-GB Absorpsiyon Spektrofotometri Yönteminin Geçerlilik Testi (Validasyonu)

1. Belirleyicilik (Seçicilik)

Pantoprazol czltisinin 230-400 nm dalga boyu aralığında dalga boyu taraması yapıldı ve UV-GB absorbans spektrumları alındı. Pantoprazolün su ile hazırlanan ve

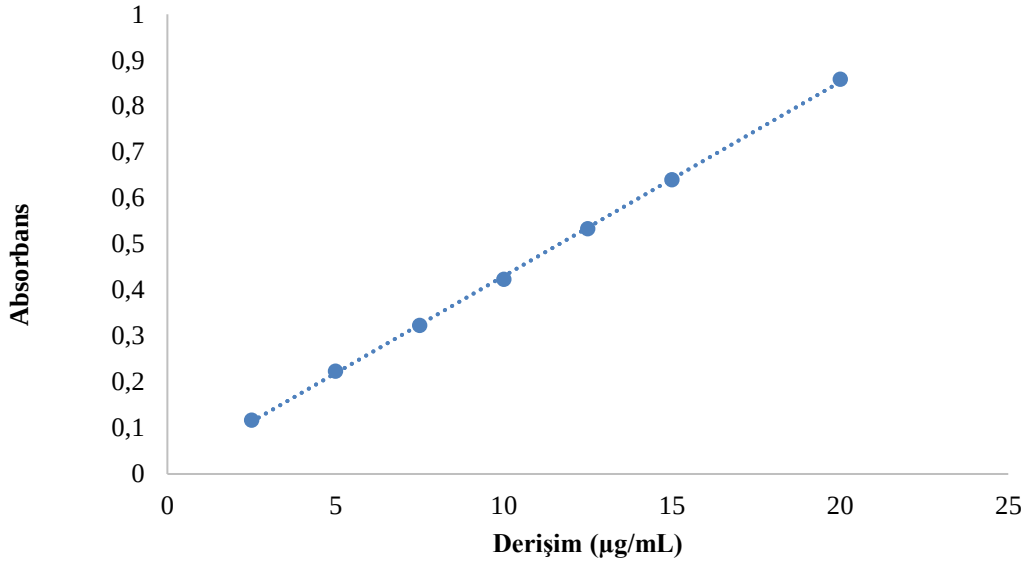
0.08 M fosfat tampon (pH 11.3) çözeltisi ile seyreltilen çözeltisinin, alınan UV-GB absorbans spektrumunda 294 nm dalga boyunda 1 maksimum pik gözlemlendi (Şekil 4.3). Farmasötik preparattan kaynaklanan herhangi bir interferansa rastlanmadı.



Şekil 4.3. Pantoprazolün standart çalışma çözeltilerinin (2.5, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 µg/mL) UV-GB absorbans spektrumları

2. Çalışma Aralığı ve Kalibrasyon Eğrisi

Su kullanılarak hazırlanan pantoprazolün stok çözeltisi, 0.08 M fosfat tampon (pH 11.3) çözeltisi ile seyreltilerek 7 farklı derişimde (2.5, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 µg/mL) standart çalışma çözeltileri hazırlandı. UV-GB absorbans spektrumları alındı ve 294 nm dalga boyunda absorbans değerleri kaydedildi. Pantoprazolün derişimine karşı absorbans şiddetleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edildi (Şekil 4.4). Bu kalibrasyon eğrisinin regresyon eşitliğinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.7’de verildi.



Şekil 4.4. UV-GB absorpsiyon spektrofotometri yöntemi ile pantoprazolün (2.5, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 µg/mL) 0.08 M fosfat tampon (pH 11.3) çözeltisi ortamında elde edilen kalibrasyon eğrisi

Tablo 4.7. UV-GB absorpsiyon spektrofotometri yöntemi ile pantoprazol için elde edilen kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri

Parametreler	UV-GB Absorbsiyon Spektrofotometri
Dalga boyu (λ :nm)	294
Doğrusal aralık (µg/mL)	2.5-30
Regresyon doğrusu denklemi	$A=0.0423x-0.0080$
S_a	0.00323
S_b	0.00915
Korelasyon katsayısı (r)	0.9997

S_a : Regresyon eğrisindeki kaymanın standart sapması, S_b : Regresyon eğrisindeki eğimin standart sapması

3. Doğruluk ve Kesinlik

Pantoprazolün stok çözeltisinden fosfat tampon çözeltisi ile yapılan seyreltmelerle yüksek, orta ve düşük derişimleri temsil eden 5, 10 ve 15 µg/mL derişimlerde pantoprazol kalite kontrol çözeltilerinin günüçi (aynı yöntem ve aynı laboratuvar şartlarında 1 günde 6 kez) ve günler arası (aynı yöntemle farklı 3 günde 6 kez) UV-GB absorbans spektrumları alınarak analizleri gerçekleştirildi. Analiz

sonuçlarının ortalaması ve standart sapmaları belirlendi, değişim katsayıları hesaplandı, elde edilen doğruluk ve kesinlik değerleri Tablo 4.8’de verildi.

Tablo 4.8. UV-GB absorpsiyon spektrofotometri yöntemi ile pantoprazol için elde edilen günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

Eklenen (µg/mL)	Günüçi			Günler Arası		
	Bulunan±SS (µg/mL)	BH	%BSS	Bulunan±SS (µg/mL)	BH	%BSS
5	5.0 ± 0.14	0.47	2.98	5.0± 0.17	1.26	3.52
10	10.0± 0.19	0.78	1.91	10.0 ± 0.27	0.39	2.75
15	14.9 ± 0.31	-0.42	2.10	15.0 ± 0.44	0.63	2.93

SS: Standart Sapma, BH: Bağlı Hata, % BSS: % Bağlı Standart Sapma

4. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Pantoprazol için LOD ve LOQ değerleri, UV-GB absorpsiyon spektrofotometri yönteminden elde edilen verilere göre çizilen kalibrasyon eğrilerinden yararlanılarak, Bölüm 3.6’da belirtilen eşitliklere göre hesaplandı. Pantoprazolün LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.71 µg/mL ve 2.16 µg/mL olarak tespit edildi.

5. Geri Kazanım

Farmasötik preparatlardan pantoprazol etkin maddesinin geri kazanımı standart ekleme yöntemi kullanılarak yapıldı. Pandev, Panref ve Protonex tabletlerin daha önce belirtilen prosedüre göre 5 µg/mL derişimlerinde çözeltileri hazırlanarak UV-GB absorbans spektrumları alındı. Daha sonra bu hazırlanan çözeltiler üzerine pantoprazolün 5, 10 ve 15 µg/mL derişimlerdeki standart çözeltileri ilave edilerek tekrar UV-GB absorbans spektrumları alındı. Bu absorbans değerleri, aynı derişimdeki standart çözeltilerinin absorbans değerleriyle karşılaştırılarak elde edilen değerler yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.9’da verildi.

Tablo 4.9. UV-GB absorpsiyon spektrofotometri yöntemi kullanılarak farmasötik preparatlara katım yapılan pantoprazol çözeltilerinin geri kazanım değerleri

Ticari Preparat	Eklenen (µg/mL)	Ortalama±SS (µg/mL)	%GK	% BSS
Pandev 5 µg/mL	5	9.96 ± 0.17	99.60	1.79
	10	14.93± 0.23	99.50	1.56
	15	19.91 ± 0.27	99.60	1.39
Panref 5 µg/mL	5	9.92 ± 0.19	99.21	1.95
	10	14.90 ± 0.24	99.31	1.64
	15	19.83 ± 0.13	99.17	0.65
Protonex 5µg/mL	5	9.88 ± 0.25	98.81	2.51
	10	14.80 ± 0.25	99.05	1.67
	15	19.81 ± 0.16	99.07	0.79

SS: Standart Sapma, %GK: % Geri Kazanım, % BSS: % Bağlı Standart Sapma

6. Kararlılık (Stabilite)

Pantoprazol stok ve standart çözeltilerinin çalışma süresince kararlı (stabil) kaldığı süreyi belirlemek için pantoprazolün üç farklı derişimde hazırlanan çözeltileri oda sıcaklığında, +4 ve -20°C’de 6, 24 ve 48 saat süreyle bekletildi. Bu süreler sonunda çözeltilerin UV-GB absorbans spektrumları alındı. Bulunan bu absorbans değerleri çözeltilerin hemen ölçülen absorbans değerleri ile karşılaştırılarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.10’da verildi.

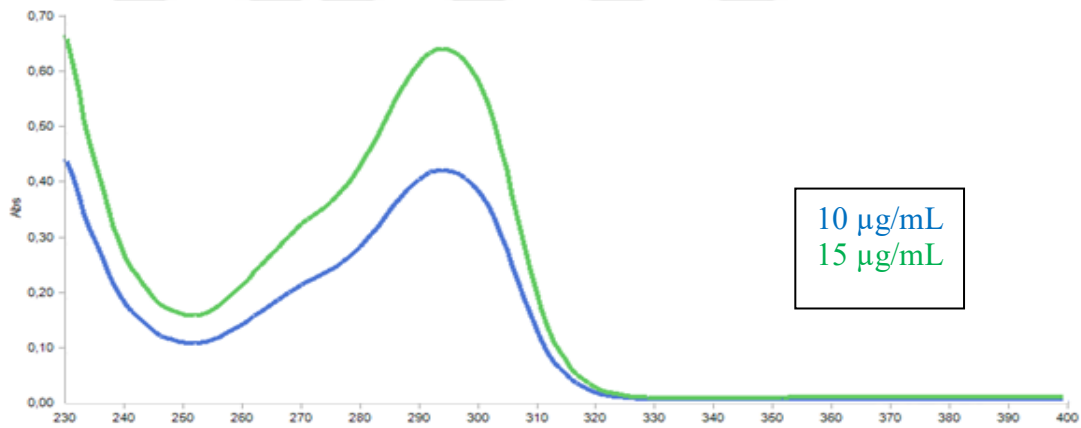
Tablo 4.10. Pantoprazolün UV-GB absorpsiyon spektrofotometri yöntemi ile belirlenen kararlılık (stabilite) değerleri

Kararlılık (Stabilite)	Eklenen (µg/mL)	6 Saat (%GK±SS)	24 Saat (%GK±SS)	48Saat (%GK±SS)
Oda Sıcaklığı	5.0	101.79 ±1.32	102.37 ± 0.51	102.7±1.48
	10.0	98.78 ± 1.01	101.83 ± 0.83	102.14 ±0.60
	15.0	99.85 ± 0.58	100.56 ± 1.63	100.78 ±2.15
+4 °C	5.0	-	102.08 ± 0.46	101.71 ±1.62
	10.0	-	99.56 ± 0.49	99.61 ±1.05
	15.0	-	100.09 ± 0.81	98.60 ±1.58
-20 °C	5.0	-	98.62 ± 0.54	98.97 ±1.10
	10.0	-	98.31 ± 1.78	99.05 ±1.24
	15.0	-	99.59 ± 10.81	101.47 ±0.33

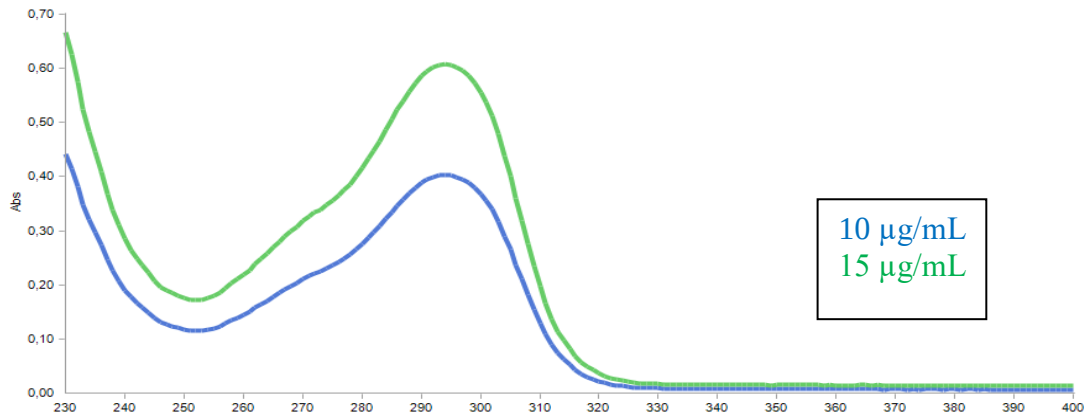
%GK: %Geri Kazanım, SS: Standart Sapma

7. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

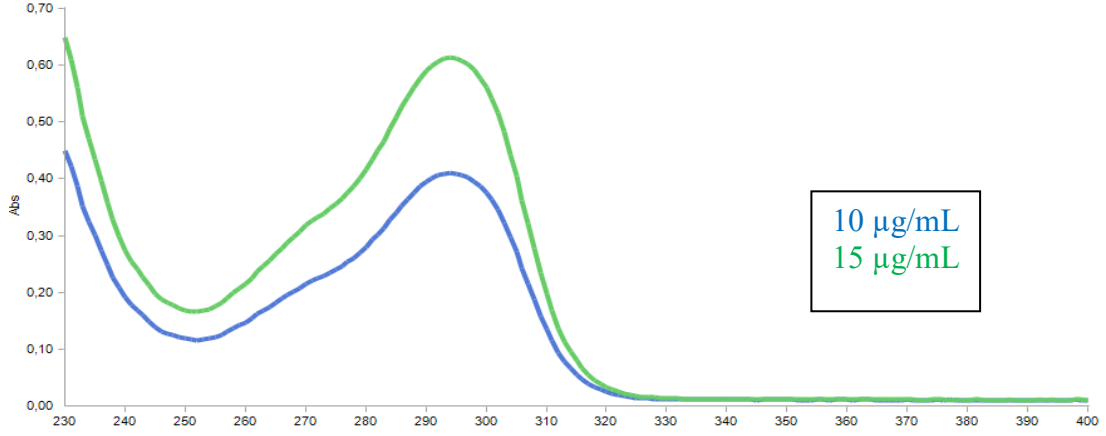
Geliştirilen ve geçerlilik testleri yapılan UV-GB absorpsiyon spektrofotometri yönteminin uygulanabilir olduğunu görmek amacıyla, pantoprazol içeren farmasötik preparatlarda pantoprazolün Şekil 4.3’de verilen kalibrasyon grafiğinden doğrudan tayini yapıldı. Pantoprazol içeren, film tablet formundaki üç adet ticari farmasötik preparat Pandev (40 mg), Panref (40 mg) ve Protonex (40 mg) Bölüm 3.2.7’de verildiği gibi suda çözülerek 1 µg/mL’lik çözeltileri hazırlandı. Daha sonra bu çözeltiler 0.08M fosfat tampon (pH 11.3) çözeltisi ile seyreltilerek 10 ve 15 µg/mL derişimdeki çözeltileri hazırlandı. Elde edilen çözeltilerin UV-GB absorbans spektrumları alındı (Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7).



Şekil 4.5. 10 µg/mL ve 15 µg/mL derişimlerde Pandev ilaç çözeltisinin UV-GB absorbans spektrumu



Şekil 4.6. 10 µg/mL ve 15 µg/mL derişimlerde Panref ilaç çözeltisinin UV-GB absorbans spektrumu



Şekil 4.7. 10 µg/mL ve 15 µg/mL derişimlerde Protonex ilaç çözeltisinin UV-GB absorbans spektrumu

Ölçülen absorbans şiddetleri ile pantoprazol derişimleri belirlendi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.11’de verildi.

Tablo 4.11. Pantoprazol içeren farmasötik prepatların UV-GB absorpsiyon spektrofotometri yöntemi ile miktar tayini

Ticari Preparat	N	Ortalama±SS (µg/mL)	%GK	% BSS
Pandev (40 mg)	12	39.96±0.89	99.92	2.32
Panref (40 mg)	12	39.67±0.72	99.19	1.83
Protonex(40mg)	12	39.70±0.63	99.26	1.58

N: Analiz sayısı, SS: Standart Sapma, %GK:%Geri Kazanım, , % BSS: Bağlı Standart Sapma

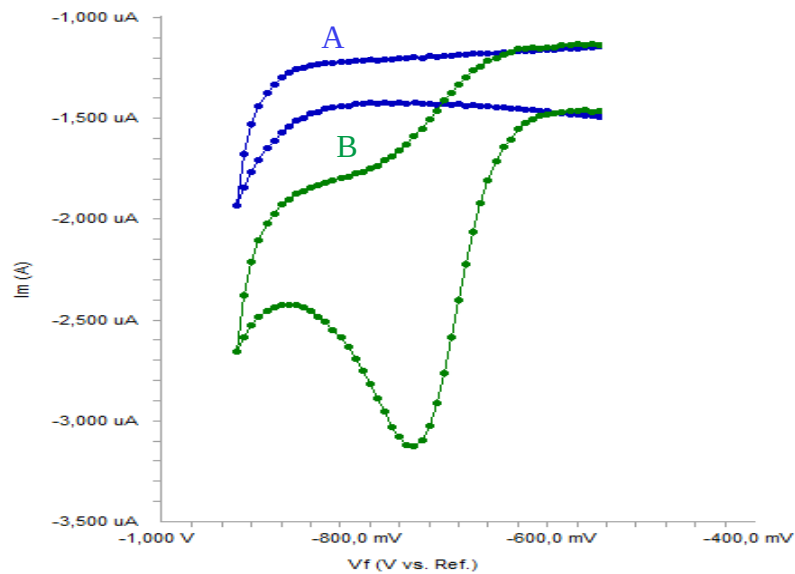
4.2. Polarografi Yöntemi

4.2.1. Dönüşümlü ve Doğrusal Taramalı Polarografi Yöntemleri ile Çalışma

Potansiyel Aralığının ve Tarama Hızının Belirlenmesi

Dönüşümlü polarografi yöntemi ile pantoprazolün elektrokimyasal davranışlarını incelemek amacıyla, literatürde daha önce yapılan çalışmalarda voltametrik yöntemler ile pantoprazolün belirlenmesi için asidik ortam kullanıldığından çalışmalarımızda bu ortam tercih edildi.^{28,30} Bunun için farklı asidik pH’larda (pH 2.0-6.0) asetat, fosfat ve Britton-Robinson tampon çözeltileri ile pantoprazolün 10 µg/mL derişimde çözeltileri hazırlandı ve dönüşümlü polarogramları kaydedildi. Bu polarogramlardan yararlanılarak

pantoprazolün en iyi pik akımı ve pik potansiyelinin asidik ortamda elde edildiği sonucu desteklendi. Fakat pH 5.0'den düşük olduğunda oksidasyon tepe noktası gözlenmedi. Bu tepe noktasının gözlenmemesinin sebebi, yapılan çalışmalarda pantoprazolün pH 5'in altında stabil olmaması ve assosiasyona uğrayabilmesi ile açıklanmaktadır.^{46,47} Bu bilgiler ışığında ve elde edilen polarogramların sonucunda en yüksek pik akımının elde edildiği çözelti asetat tampon çözeltisi ve pH değeri ise pH 5.0 olarak tespit edildi. Daha sonra asetat tampon çözelti ortamında çalışma potansiyel aralığı belirlemek için asetat tampon (pH 5.0) çözeltisinin 0 mV ile -1000 mV potansiyel aralığında damlayan civa çalışma elektrotu ile dönüşümlü polarogramı alındı (Şekil 4.8'de gösterilen A piki) - 1000 mV ile - 400 mV potansiyel aralığında ilgili çözücüye ait indirgenme veya yükseltgenme piki gözlenmemesi nedeniyle, pantoprazolün polarografik çalışmaları için asetat tampon (pH 5.0) çözeltisinde uygun potansiyel aralığının -1000 mV ile - 400 mV olduğu belirlendi. Asetat tampon (pH 5.0) çözeltisinde ile hazırlanan 50 µg/mL pantoprazol çözeltisinin, 0.1 V/s tarama hızı ve - 1000 mV ile - 400 mV potansiyel aralığında damlayan civa çalışma elektrotuyla alınan dönüşümlü polarogramı (Şekil 4.8'de gösterilen B piki) olarak verilmektedir.



Şekil 4.8. Asetat tampon (pH 5.0) çözeltisinin (A) ve asetat tampon (pH 5.0) çözeltisi içinde hazırlanan 50 µg/mL pantoprazol çözeltisinin (B) dönüşümlü polarogramı.

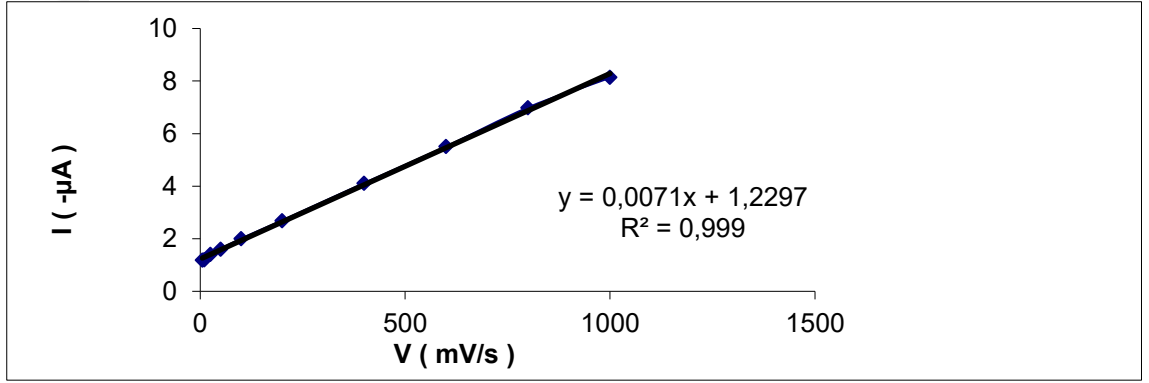
Şekil 4.8’de elektrokimyasal davranışı belirlenen pantoprazole ait polarogramda, bir anodik pik gözlenirken katodik pike rastlanmadı. Asetat tampon (pH 5.0) çözelti ortamında anodik pik potansiyeli -740 mV’dur. Polarogramlarda ilgili potansiyel aralığında herhangi bir katodik pik gözlenmemesi, pantoprazolün bu aralıkta yükseltgenme olayının tersinmez olabileceğini gösterdi. Ancak bu sonuç tek başına elektron aktarım basamağının tersinmez olmasını kanıtlamaz. Çünkü katodik pik gözlenmesinin bir başka sebebi de elektron aktarım basamağının ardından hızlı bir kimyasal reaksiyon gerçekleşmesi olabilir.⁴¹ Ayrıca 50 µg/mL pantoprazol derişiminde farklı tarama hızlarında alınan doğrusal taramalı polarogramlarından yararlanılarak tarama hızının pik akımına etkisi incelendi. Bu amaç için 0.005 V/s ile 1 V/s arasındaki tarama hızlarında dönüşümlü polarogramları alındı ve pik akım ve pik potansiyel değerleri kaydedildi (Tablo 4.12).

Tablo 4.12. Pantoprazolün farklı tarama hızlarında alınan doğrusal taramalı polarogramlarının pik akım ve pik potansiyel değerleri

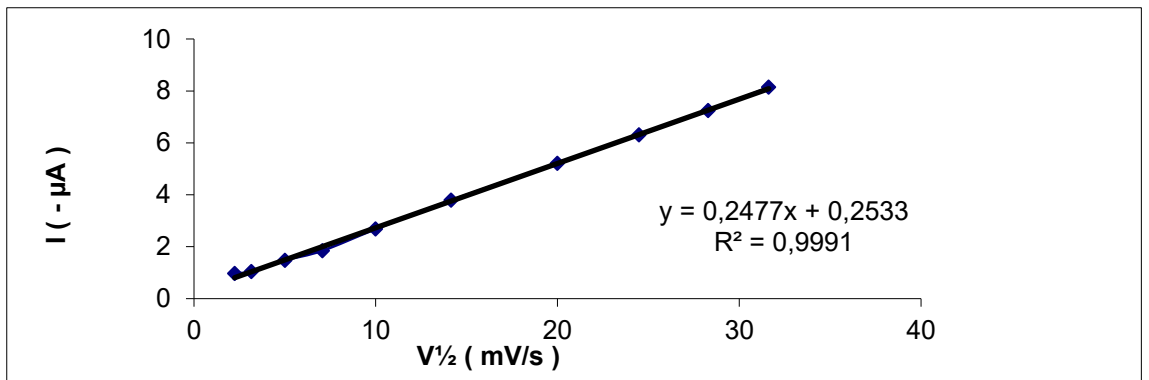
Tarama Hızı (V/s)	Pik Akımı (- nA)	Pik Potansiyeli (V)
0.005	0.973	- 0.889
0.010	1.044	- 0.964
0.025	1.171	- 0.775
0.050	1.549	- 0.779
0.100	2.276	- 0.794
0.200	3.389	- 0.814
0.400	5.109	- 0.834
0.600	6.303	- 0.849
0.800	7.246	- 0.864
1.000	8.139	- 0.874

50 µg/mL pantoprazol maddesinin asetat tampon (pH 5.0) çözelti ortamında, doğrusal taramalı polarogramlarından elde edilen pik potansiyellerinin 0.005 V/s - 1 V/s

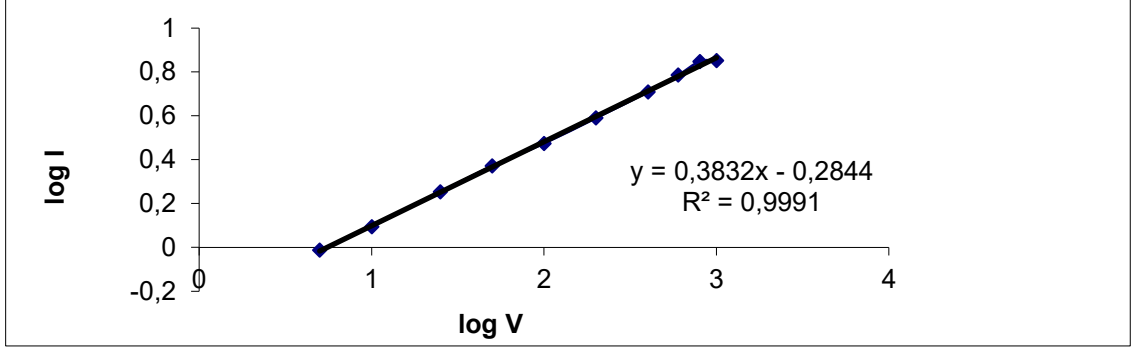
tarama hızı aralığında değişimleri incelendi. Bu tarama hızı aralığında en keskin yükseltgenme piki 0.1 V/s tarama hızında gözlemlendi. Bundan sonraki tüm çalışmalar 0.1 V/s tarama hızında gerçekleştirildi. Ayrıca elde edilen bu polarogramlardan tarama hızı arttıkça pik akımlarının arttığı ve pik potansiyellerinin pozitifte kaydığı gözlemlendi, V-I (Şekil 4.9), $V^{1/2}$ -I (Şekil 4.10) ve logv-logI (Şekil 4.11) grafikleri çizildi. Bu grafiklerin yüksek korelasyon katsayısı (r) ile doğrusal olması (V-I için $r^2=0.9990$, $V^{1/2}$ -I için $r^2=0.9991$ ve logV-logI için $r^2=0.9991$) akım fonksiyonunun tarama hızına bağlı olduğunu ve böylece sistemin tersinmez olduğunu gösterdi.^{41,48}



Şekil 4.9. 50 µg/mL pantoprazolün asetat tampon (pH 5.0) çözelti ortamında elde edilen tarama hızına karşı doğrusal taramalı pik akım grafiği



Şekil 4.10. 50 µg/mL pantoprazolün asetat tampon (pH 5.0) çözelti ortamında elde edilen tarama hızının kareköküne karşı doğrusal taramalı pik akım grafiği



Şekil 4.11. 50 µg/mL pantoprazolün asetat tampon (pH 5.0) çözelti ortamında elde edilen tarama hızının logaritmasına karşı doğrusal taramalı logaritmik pik akım grafiği

4.2.2. Dönüşümlü ve Doğrusal Taramalı Polarografi Yöntemleri ile

Pantoprazolün Adsorpsiyon Özelliğinin Belirlenmesi

Elektrot reaksiyonları gerçekleşirken çoğu organik madde elektrot yüzeyine adsorbe olabilir. Bu olay elektrot reaksiyonlarını büyük oranda etkilemektedir. Birçok voltametrik teknik için geliştirilen eşitlikler bu durum söz konusu olduğunda geçerliliğini kaybeder. Bazı durumlarda ise maddenin bu elektrot yüzeyine olan adsorbsiyonu bir avantaj haline dönüştürülüp hassas olarak tayin edilebilmesini mümkün kılar. Bu nedenle, bu çalışmada organik bir molekül olan pantoprazolün kullanılan elektrot yüzeyine adsorplanıp adsorplanmadığının bilinmesi gerekir. Bunun için kullanılan elektrokimyasal yöntemlerden birisi dönüşümlü veya doğrusal taramalı polarografidir. Bu amaçla asetat tampon (pH 5.0) çözeltisi içerisinde hazırlanan 50 µg/mL pantoprazolün farklı tarama hızlarında dönüşümlü polarogramları alındı. Bu polarogramlardan yararlanılarak tarama hızı ile pik akımı arasındaki değişim incelemek amacı ile logv-logI grafikleri çizildi (Şekil 4.11) ve logI ve logv grafiğinde eğim 0.38 olarak tespit edildi. Bilindiği gibi Randless-Sevcik eşitliğine göre difüzyon kontrollü deneylerde logI ve logv arasında elde edilen eğrinin eğimi 0.5'den küçük olmalıdır ve eğer madde elektrot yüzeyine adsorbe oluyorsa eğim 0.5'ten büyük olur. Pantoprazolün belirlenmesi için çizilen grafiğin eğiminin 0.5'ten küçük olması oksidasyon akımının difüzyonel nitelikte olduğunu göstermektedir.⁴¹

4.2.3. Doğrusal Taramalı Polarografi Yöntemi ile Pantoprazolün Belirlenmesinde Pik Akımı ve Pik Potansiyeline pH'nın Etkisi

Organik maddelerin elektrot reaksiyonlarının çoğunda protonlar görev aldığı için bu reaksiyonlardaki akım-potansiyel ilişkileri genellikle pH'ya bağımlı olur. Bu nedenle bu bağımlılıktan oluşabilecek hatalardan kurtulabilmek için polarografik çalışmalarda çözeltilerin tamponlanması gereklidir. Burada dikkat edilmesi gereken seçilecek tampon çözeltinin çalışmanın gerçekleştirileceği potansiyel aralığını daraltmayacak özellikte olmasıdır. Bu bağlamda seçilen destek elektrolitinde (asetat tampon çözeltisi) pH'nın pantoprazolün pik akımı üzerine etkisini incelemek amacıyla, doğrusal taramalı polarografi yöntemi kullanıldı. Bunun için 50 µg/mL pantoprazolün asetat tampon çözeltisinde farklı pH'larda (pH 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.7) çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerin polarogramları alındı. Pantoprazolün elde edilen polarogramları incelendiğinde pH değerlerinin, 3.5'den 5.0'a kademeli olarak arttırıldığında pantoprazolün oksidasyon pik akımının arttığı, pH değerinin 5.0'dan 5.7'ye kademeli olarak arttırıldığında ise bu pik akımının değişmediği gözlemlendi. Fakat pH 5.0'dan 5.7'ye arttırıldığında pantoprazolün oksidasyon pik akımının keskinliğinin azaldığı gözlemlendi. Bu veriler ışığında pantoprazolün en yüksek oksidasyon pik akımının ve en keskin oksidasyon pikinin elde edildiği pH değeri olan 5.0 optimum pH olarak seçildi. Bundan sonraki bütün çalışmalarımız asetat tampon çözeltisinde pH 5.0'da yapıldı.

4.2.4. Doğrusal Taramalı Polarografi Yöntemi ile Pantoprazolün Belirlenmesinde Tampon Derişiminin Etkisi

Seçilen destek elektrolitinde (asetat tampon çözeltisi) ve pH'da (pH 5.0) asetat tampon çözelti derişiminin, pantoprazolün pik akımı üzerine etkisini incelemek amacıyla, doğrusal taramalı polarografi yöntemi kullanıldı. Bunun için farklı derişimlere sahip asetat tampon çözeltilerinde (0.025 M, 0.050 M, 0.075 M, 0.100 M,

0.125 M, 0.150 M, 0.250 M, 0.300 M ve 0.400 M) 50 µg/mL pantoprazol çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerin doğrusal taramalı polarogramları alındı. Pantoprazolün elde edilen doğrusal taramalı polarogramı incelendiğinde, asetat tampon çözelti derişiminin 0.025 M'dan 0.150 M'a kademeli olarak arttırıldığında pantoprazolün oksidasyon pik akımının arttığı, asetat tampon çözelti derişiminin 0.150 M'dan 0.400 M'a kademeli olarak arttırıldığında ise bu pik akımının değişmediği gözlemlendi. Fakat 0.150 M'dan 0.400 M'a arttırıldığında pantoprazolün maksimum oksidasyon pik akımı gösterdiği pik potansiyelinin (E_p -740 mV'dan -680 mV'a) pozitif değere kaydığı gözlemlendi. Bu veriler ışığında pantoprazolün en yüksek oksidasyon pik akımının ve en keskin oksidasyon pikinin elde edildiği toplam asetat tampon çözelti derişimi olan 0.25 M (0.083 M CH_3COOH ve 0.167 M CH_3COONa 'dan oluşan) optimum derişim olarak seçildi. Bundan sonraki bütün çalışmalarımız 0.25 M asetat tampon çözelti ortamında yapıldı.

4.2.5. Dönüşümlü Polarografi Yöntemi ile Pantoprazolün Elektrokimyasal Davranışının Belirlenmesi

0.25 M asetat tampon (pH 5.0) çözeltisi ile hazırlanan 50 µg/mL'lik pantoprazolün 0.1 V/s'lik tarama hızı ile alınan ardışık dönüşümlü polarogramlarında, tek bir oksidasyon piki gözlemlendi. Bu oksidasyon piki, literatürde belirtilen redoks mekanizmasına uygun olarak ya pantoprazolde bulunan amino grubunun geri dönüşümsüz oksidasyonundan^{49,50}, ya pantoprazolün redoks işlemiyle dimer oluşturmamasından, ya da pantoprazolde bulunan amin grubunun oksidasyonu sonucu oluşan radikal katyonlardan kaynaklanabilir.⁵¹

Pantoprazolün yukarıda belirtilen elektrokimyasal davranışına dayanarak, farmasötik preparatlarda belirlenebilmesi için dönüşümlü, doğrusal taramalı, kare dalga (SWP) ve diferansiyel puls polarografi (DPP) yöntemleri kullanılabilir. SWP ve DPP

yöntemleri, dönüşümlü ve doğrusal taramalı polarografi yöntemlerine göre daha düşük zemin gürültüsüne sahip olması, daha iyi ayırım sağlaması, hassasiyetin yüksek olması ve daha hızlı olması gibi avantajlara sahiptir.^{46,47} Bu bilgiler ışığında çalışmamızda, pantoprazolün farmasötik prepararlarda belirlenmesi için SWP ve DPP yöntemleri seçildi.

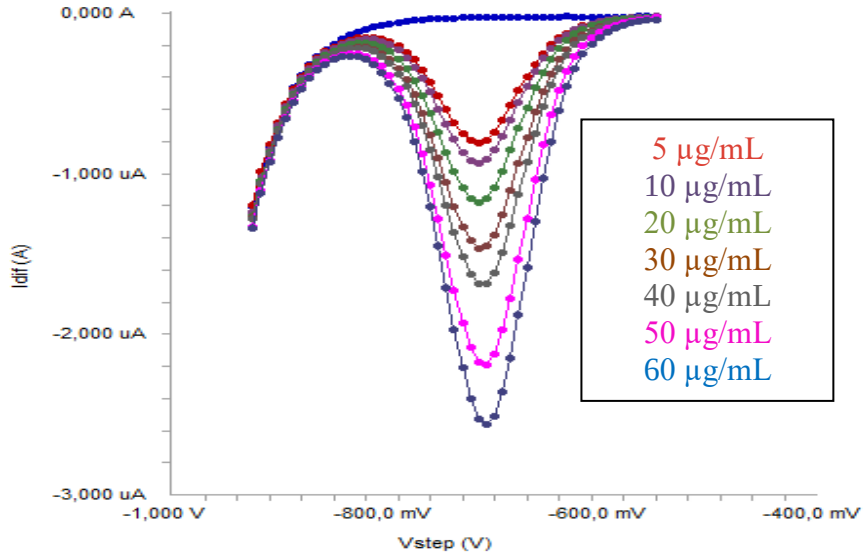
4.2.6. Kare Dalga Polarografi (SWP) Yöntemi

Bölüm 3.3.2’de belirtilen optimum yöntem şartlarında -400 mV ile -1000 mV potansiyel aralığında, 0.1 V/s tarama hızında, 0.025 M asetat tampon (pH 5.0) çözelti destek elektrolitinde, damlayan civa çalışma elektrotu, Ag/AgCl referans elektrotu ve Pt karşıt elektrotu kullanarak, pantoprazolün SWP yöntemi ile analizi gerçekleştirildi.

4.2.6.1. Kare Dalga Polarografi (SWP) Yönteminin Geçerlilik Testi (Validasyonu)

1. Belirleyicilik (Seçicilik)

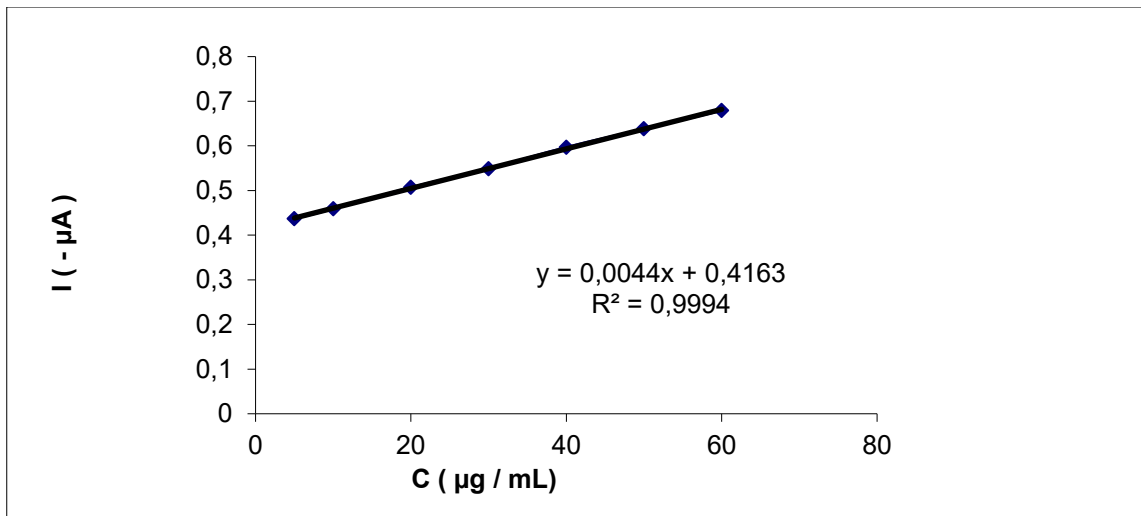
Pantoprazol çözeltisinin -1000 ile -400 mV potansiyel aralığında taraması yapıldı ve kare dalga polarogramları alındı. Su ile hazırlanan ve 0.25 M asetat tampon (pH 5.0) çözeltisi ile seyreltilen pantoprazol çözeltilerinin (5, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 µg/mL derişimlerde) alınan kare dalga polarogramında -740 mV’da bir oksidasyon piki gözlemlendi (Şekil 4.12). Farmasötik preparattan kaynaklanan herhangi bir interferansa rastlanmadı.



Şekil 4.12. Pantoprazolün (5, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 µg/mL) standart çalışma çözeltilerinin kare dalga polarogramları

2. Çalışma Aralığı ve Kalibrasyon Eğrisi

Su kullanılarak hazırlanan pantoprazolün stok çözeltisi, 0.25 M asetat tampon (pH 5.0) çözeltisi ile seyreltilerek 7 farklı derişimde (5, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 µg/mL) standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Polarogramları alındı ve -740 mV’da pik akımı değerleri kaydedildi. Pantoprazolün derişimine karşı negatif pik akımı değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edildi (Şekil 4.13). Bu kalibrasyon eğrisinin regresyon eşitliğinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.13’de verildi.



Şekil 4.13. SWP yöntemi ile pantoprazolün (5, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 µg/mL) 0.25 M asetat tampon (pH 5.0) çözelti ortamında elde edilen kalibrasyon eğrisi

Tablo 4.13. SWP yöntemi ile pantoprazol için elde edilen kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri

Parametreler	SWP
Potansiyel (E:mV)	- 740
Doğrusal aralık (µg/mL)	5 – 60
Regresyon doğrusu denklemi	$A=0.0044x + 0.4163$
S_a	3.523
S_b	0.244
Korelasyon katsayısı (r)	0.999

S_a : Regresyon eğrisindeki kaymanın standart sapması, S_b : Regresyon eğrisindeki eğimin standart sapması

3. Doğruluk ve Kesinlik

Pantoprazolün stok çözeltisinden 0.025 M asetat tampon (pH 5.0) çözeltisi ile yapılan seyreltmelerle yüksek orta ve düşük derişimleri temsil eden 5, 15 ve 35 µg/mL derişimlerde pantoprazol kalite kontrol çözeltilerinin günüçi (aynı yöntem ve aynı laboratuvar şartlarında 1 günde 6 kez) ve günler arası (aynı yöntemle farklı 3 günde 6 kez) kare dalga polarogramları alınarak analizleri gerçekleştirildi. Analiz sonuçlarının ortalaması ve standart sapmaları belirlendi, değişim katsayıları hesaplandı, elde edilen doğruluk ve kesinlik değerleri Tablo 4.14’de verildi.

Tablo 4.14. SWP yöntemi ile pantoprazol için elde edilen günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

Eklenen (µg/mL)	Günüçi			Günler Arası		
	Bulunan±SS (µg/mL)	BH	%BSS	Bulunan±SS (µg/mL)	BH	%BSS
5	5.01 ± 0.11	0.15	2.34	5.08 ± 0.18	1.66	3.65
15	15.08 ± 0.27	0.55	1.82	14.96 ± 0.33	- 0.20	2.23
35	34.89 ± 0.26	-0.30	0.76	34.93 ± 0.32	- 0.19	0.92

SS:Standart Sapma, BH: Bağıl Hata, % BSS: % Bağıl Standart Sapma

SWP yönteminde pantoprazolün pik akım ve pik potansiyelinin tekrarlanabilirliğini ve yeniden üretilebilirliğini belirlemek amacıyla 30 µg/mL derişimdeki pantoprazolün, üçer kez pik akım ve pik potansiyelleri ölçülerek bu değerlerin %BSS'ları hesaplandı(Tablo 4.15).

Tablo 4.15. SWP yönteminde pik akım ve pik potansiyelinin tekrarlanabilirliği ve yeniden üretilebilirliği

Parametreler	% BSS
Pik akımının tekrarlanabilirliği	1.78
Pik potansiyelinin tekrarlanabilirliği	1.01
Pik akımının yeniden üretilebilirliği	2.14
Pik potansiyelinin yeniden üretilebilirliği	2.13

%BSS: % Bağıl Standart Sapma

4. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Pantoprazol için LOD ve LOQ değerleri, SWP yönteminden elde edilen verilere göre çizilen kalibrasyon eğrilerinden yararlanılarak, Bölüm 3.6'da belirtilen eşitliklere göre hesaplandı. Pantoprazolün LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.40 µg/mL ve 1.20 µg/mL olarak tespit edildi.

5. Geri Kazanım

Farmasötik preparatlardan pantoprazol etkin maddesinin geri kazanımı standart ekleme yöntemi kullanılarak yapıldı. Pandev, Panref ve Protonex tabletlerin daha önce belirtilen prosedüre göre, 25 µg/mL derişimlerinde çözeltileri hazırlanarak kare dalga polarogramları alındı. Daha sonra hazırlanan bu çözeltiler üzerine pantoprazolün 5, 15 ve 35 µg/mL derişimlerdeki standart çözeltileri ilave edilerek kare dalga polarogramları alındı. Bu pik akımı değerleri, aynı derişimdeki standart çözeltilerinin pik akımı değerleriyle karşılaştırılarak elde edilen değerler yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.16'da verildi.

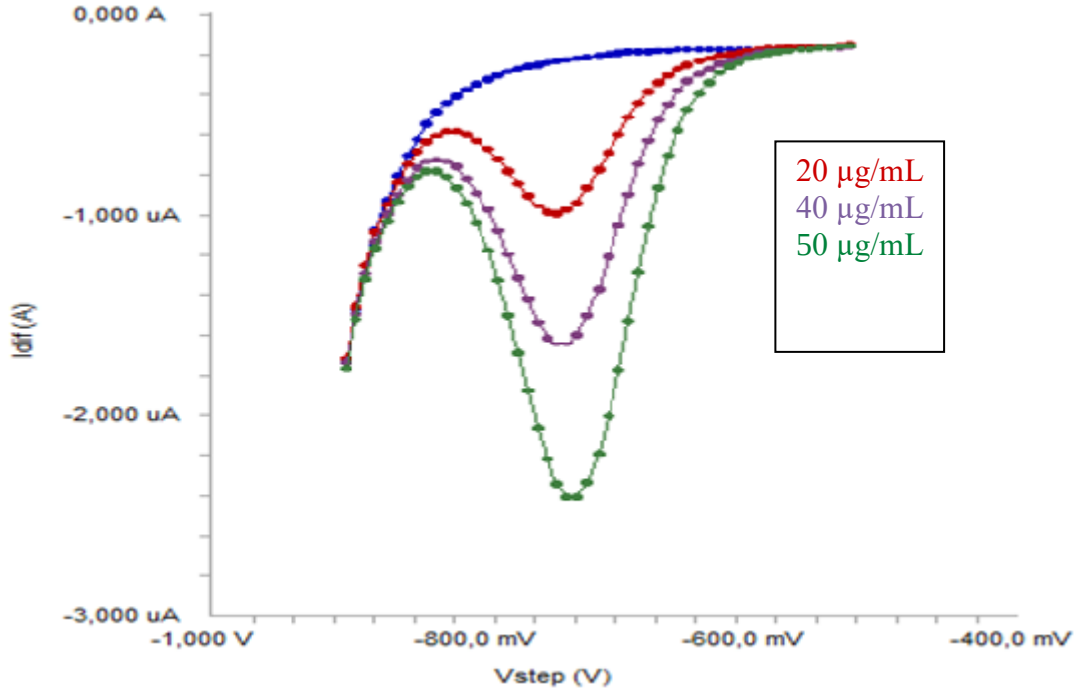
Tablo 4.16. SWP yöntemi kullanılarak farmasötik preparatlara katım yapılan pantoprazol çözeltilerinin geri kazanım değerleri

Ticari Preparat	Eklenen ($\mu\text{g/mL}$)	Ortalama $\pm$ SS ($\mu\text{g/mL}$)	%GK	% BSS
Pandev 25 $\mu\text{g/mL}$	5	5.2 $\pm$ 0.21	104.0	4.04
	15	14.6 $\pm$ 0.28	97.3	1.92
	35	35.4 $\pm$ 0.73	101.1	2.06
Panref 25 $\mu\text{g/mL}$	5	4.9 $\pm$ 0.13	98.0	2.65
	15	14.8 $\pm$ 0.27	98.7	1.82
	35	35.6 $\pm$ 1.02	101.7	2.87
Protonex 25 $\mu\text{g/mL}$	5	5.1 $\pm$ 0.18	102.0	3.53
	15	14.8 $\pm$ 0.25	98.7	1.69
	35	35.2 $\pm$ 1.67	100.6	4.74

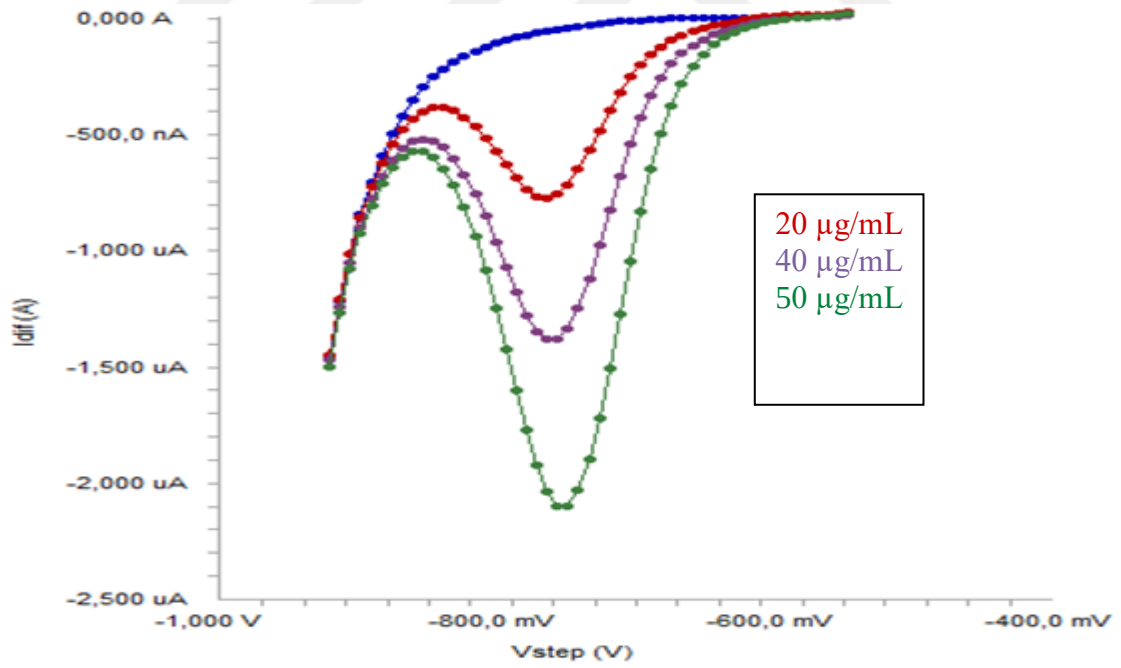
SS: Standart Sapma, %GK:%Geri Kazanım, % BSS: % Bağıl Standart Sapma

7. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

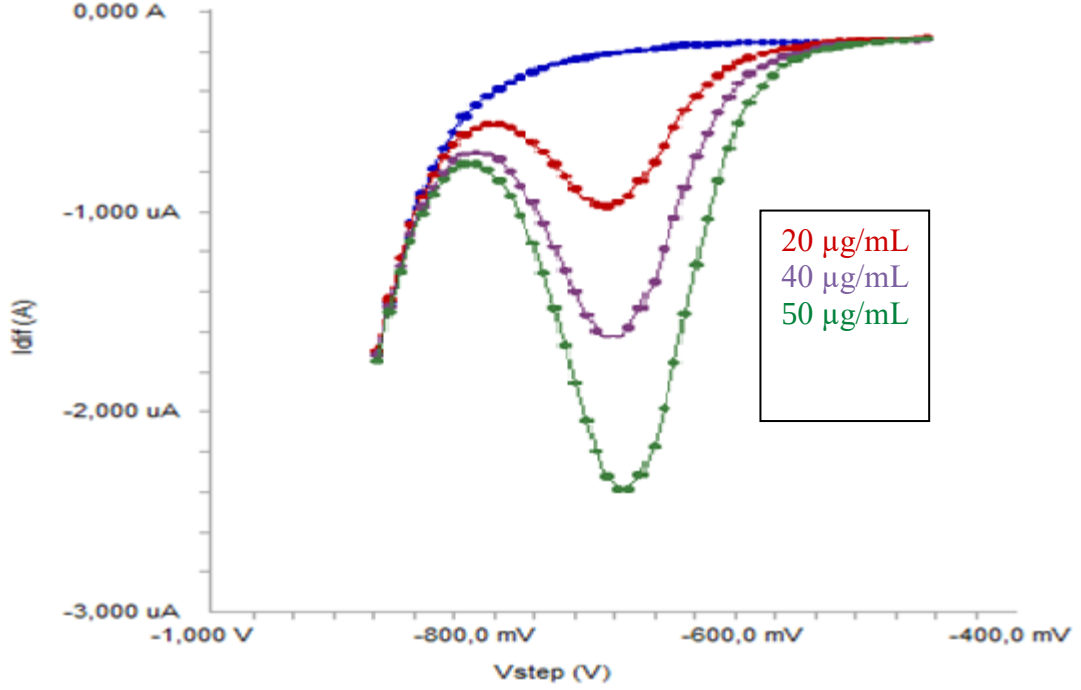
Geliştirilen ve geçerlilik testleri yapılan SWP yönteminin uygulanabilir olduğunu görmek amacıyla, pantoprazol içeren farmasötik preparatlarda pantoprazolün Şekil 4.13’de verilen kalibrasyon grafiğinden doğrudan tayini yapıldı. Pantoprazol içeren, film tablet formundaki üç adet ticari farmasötik preparat Pandev (40 mg), Panref (40 mg) ve Protonex (40 mg) Bölüm 3.2.7’de verildiği gibi suda çözülerek 1 $\mu\text{g/mL}$ ’lik çözeltileri hazırlandı. Daha sonra bu çözeltiler 0.25 M asetat tampon (pH 5.0) çözeltisi ile seyreltilerek 20 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$ ve 50 $\mu\text{g/mL}$ derişimdeki çözeltileri hazırlandı. Elde edilen çözeltilerin kare dalga polarogramları alındı (Şekil 4.14, Şekil 4.15 ve Şekil 4.16).



Şekil 4.14. 20 µg/mL, 40 µg/mL ve 50 µg/mL derişimlerde Pandev ilaç çözeltisinin kare dalga polarogramı



Şekil 4.15. 20 µg/mL, 40 µg/mL ve 50 µg/mL derişimlerde Panref ilaç çözeltisinin kare dalga polarogramı



Şekil 4.16. 20 µg/mL, 40 µg/mL ve 50 µg/mL derişimlerde Protonex ilaç çözeltisinin kare dalga polarogramı

Pik akımları ölçülerek pantoprazol derişimleri belirlendi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.17’de verildi.

Tablo 4.17. Pantoprazol içeren farmasötik preparatların SWP yöntemi ile miktar tayini

Ticari Preparat	N	Ortalama±SS (µg/mL)	%GK	% BSS
Pandev (40 mg)	12	39.92±0.687	99.80	1.72
Panref (40 mg)	12	39.88±0.717	99.71	1.80
Protonex (40mg)	12	39.93±0.674	99.82	1.69

N:analiz sayısı, SS: Standart Sapma, ,%GK:%Geri Kazanım, % BSS: Bağlı Standart Sapma

4.2.7. Diferansiyel Puls Polarografi (DPP) Yöntemi

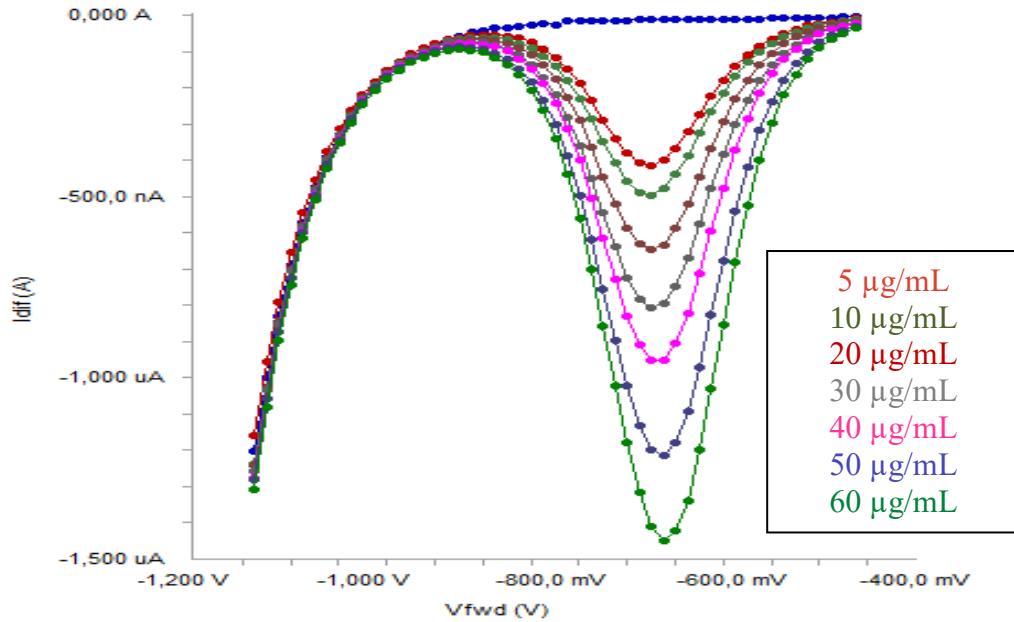
Bölüm 3.3.2’de belirtilen optimum yöntem şartlarında - 400 mV ile -1000 mV potansiyel aralığında, 0.1 V/s tarama hızında, 0.025 M asetat tampon (pH 5.0) çözelti

destek elektrolitinde, damlayan civa çalışma elektrotu, Ag/AgCl referans elektrotu ve Pt karşıt elektrotu kullanarak, pantoprazolün DPP yöntemi ile analizi gerçekleştirildi.

4.2.7.1. Diferansiyel Puls Polarografi (DPP) Yönteminin Geçerlilik Testi (Validasyonu)

1. Belirleyicilik (Seçicilik)

Pantoprazol çözeltisinin -1000 mV ile -400 mV potansiyel aralığında taraması yapıldı ve diferansiyel puls polarogramları alındı. Su ile hazırlanan ve 0.25 M asetat tampon (pH 5.0) çözeltisi ile seyreltilen pantoprazol çözeltilerinin (5, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 µg/mL derişimlerde) alınan diferansiyel puls polarogramında -740 mV’da bir oksidasyon piki gözlemlendi (Şekil 4.17). Farmasötik preparattan kaynaklanan herhangi bir interferansa rastlanmadı.

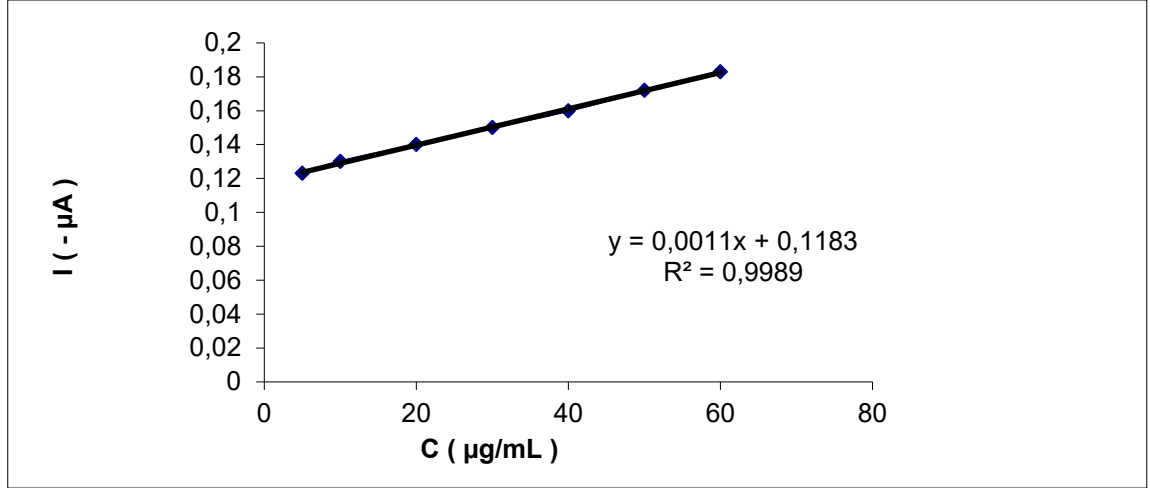


Şekil 4.17. Pantoprazolün (5, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 µg/mL) standart çalışma çözeltilerinin diferansiyel puls polarogramları

2. Çalışma Aralığı ve Kalibrasyon Eğrisi

Su kullanılarak hazırlanan pantoprazolün stok çözeltisi, 0.25 M asetat tampon (pH 5.0) çözeltisi ile seyreltilerek 7 farklı derişimde (5, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 µg/mL) standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Polarogramları alındı ve -0.74 V’da pik akımı

değerleri kaydedildi. Pantoprazolün derişimine karşı negatif pik akımı değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edildi (Şekil 4.18). Bu kalibrasyon eğrisinin regresyon eşitliğinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.18’de verildi.



Şekil 4.18. DPP yöntemi ile pantoprazolün (5, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 µg/mL) 0.25 M asetat tampon (pH 5.0) çözelti ortamında elde edilen kalibrasyon eğrisi.

Tablo 4.18. DPP yöntemi ile pantoprazol için elde edilen kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri

Parametreler	DPP
Potansiyel (E:mV)	- 740
Doğrusal aralık (µg/mL)	5 – 60
Regresyon doğrusu denklemi	$A=0.0011x + 0.1183$
S_a	0.473
S_b	0.049
Korelasyon katsayısı (r)	0.998

S_a : Regresyon eğrisindeki kaymanın standart sapması, S_b : Regresyon eğrisindeki eğimin standart sapması

3. Doğruluk ve Kesinlik

Pantoprazolün stok çözeltisinden 0.025 M asetat tampon (pH 5.0) çözeltisi ile yapılan seyreltmelerle yüksek orta ve düşük derişimleri temsil eden 5, 15 ve 35 µg/mL derişimlerde pantoprazol kalite kontrol çözeltilerinin günüçi (aynı yöntem ve aynı laboratuvar şartlarında 1 günde 6 kez) ve günler arası (aynı yöntemle farklı 3 günde 6

kez) diferansiyel puls polarogramları alınarak analizleri gerçekleştirildi. Analiz sonuçlarının ortalaması ve standart sapmaları belirlendi, değişim katsayıları hesaplandı, elde edilen doğruluk ve kesinlik değerleri Tablo 4.19’da verildi.

Tablo 4.19. DPP yöntemi ile pantoprazol için elde edilen günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

Eklenen (µg/mL)	Günüçi	Günler Arası				
	Bulunan±SS (µg/mL)	BH	%BSS	Bulunan±SS (µg/mL)	BH	%BSS
5	4.97 ±0.17	0.60	3.44	4.93 ± 0.14	-1.36	2.91
15	15.04 ±0.31	0.30	2.08	14.97 ± 0.36	- 0.20	2.43
35	34.85 ± 1.07	-0.41	3.07	34.89 ± 0.77	- 0.30	2.23

SS:Standart Sapma, BH: Bağıl Hata, % BSS: % Bağıl Standart Sapma

DPP yönteminde pantoprazolün pik akım ve pik potansiyelinin tekrarlanabilirliğini ve yeniden üretilebilirliğini belirlemek amacıyla 30 µg/mL derişimdeki pantoprazolün, üçer kez pik akım ve pik potansiyelleri ölçülerek bu değerlerin %BSS’ları hesaplandı (Tablo 4.20).

Tablo 4.20. DPP yönteminde pik akım ve pik potansiyelinin tekrarlanabilirliği ve yeniden üretilebilirliği

Parametreler	% BSS
Pik akımının tekrarlanabilirliği	1.78
Pik potansiyelinin tekrarlanabilirliği	1.23
Pik akımının yeniden üretilebilirliği	3.16
Pik potansiyelinin yeniden üretilebilirliği	3.18

%BSS:% Bağıl Standart Sapma

4. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Pantoprazol için LOD ve LOQ değerleri, DPP yönteminden elde edilen verilere göre çizilen kalibrasyon eğrilerinden yararlanılarak, Bölüm 3.6’da belirtilen eşitliklere göre hesaplandı. Pantoprazolün LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.30 µg/mL ve 0.90 µg/mL olarak tespit edildi.

5. Geri Kazanım

Farmasötik preparatlardan pantoprazol etkin maddesinin geri kazanımı standart ekleme yöntemi kullanılarak yapıldı. Pandev, Panref ve Protonex tabletlerin daha önce belirtilen prosedüre göre, 25 µg/mL derişimlerinde çözeltileri hazırlanarak diferansiyel puls polarogramları alındı. Daha sonra bu hazırlanan çözeltiler üzerine pantoprazolün 5, 15 ve 35 µg/mL derişimlerdeki standart çözeltileri ilave edilerek diferansiyel puls polarogramları alındı. Bu pik akımı değerleri, aynı derişimdeki standart çözeltilerinin pik akımı değerleriyle karşılaştırılarak elde edilen değerler Tablo 4.21’de verildi.

Tablo 4.21. DPP yöntemi kullanılarak farmasötik preparatlara katım yapılan pantoprazol çözeltilerinin geri kazanım değerleri

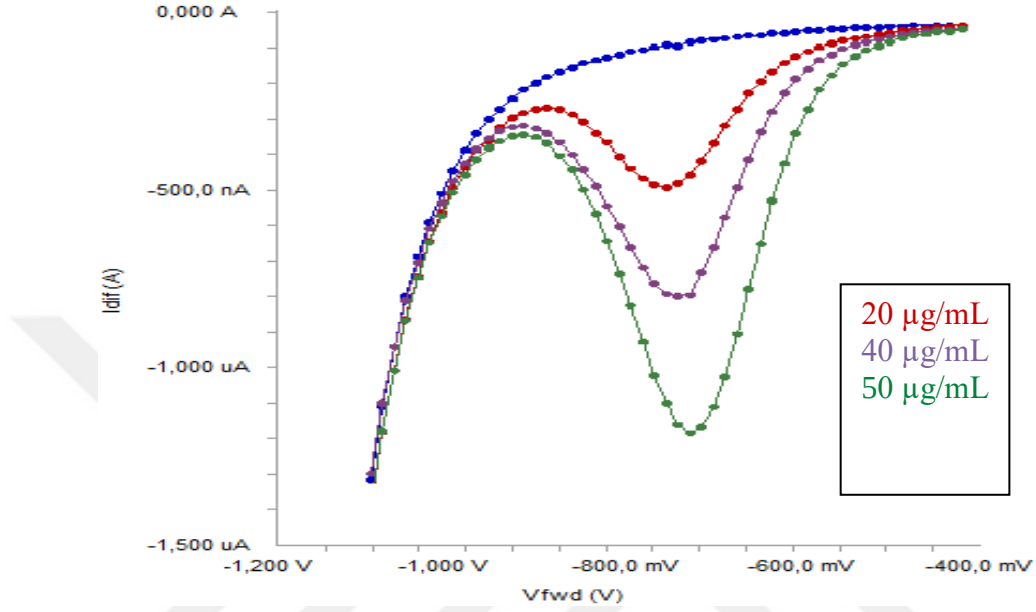
Ticari Preparat	Eklenen (µg/mL)	Ortalama±SS (µg/mL)	%GK	% BSS
Pandev 25 µg/mL	5	4.9 ± 0.11	98.0	2.24
	15	14.9± 0.23	99.3	1.54
	35	35.1 ± 0.93	100.3	2.65
Panref 25 µg/mL	5	5.1 ± 0.22	102.0	4.31
	15	14.7 ± 0.34	98.0	2.31
	35	35.9 ± 1.24	102.6	3.45
Protonex 25µg/mL	5	4.8 ± 0.20	96.0	4.17
	15	14.5 ± 0.29	96.7	2.00
	35	35.6 ± 1.12	101.7	3.14

SS: Standart Sapma, %GK:%Geri Kazanım, % BSS: % Bağıl Standart Sapma

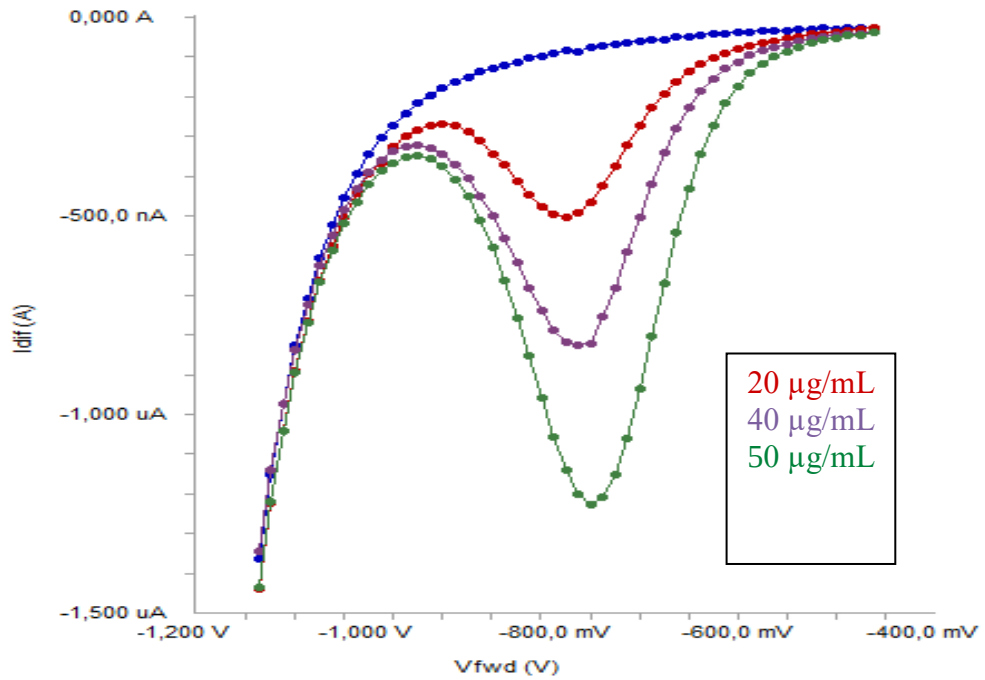
7. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Geliştirilen ve geçerlilik testleri yapılan DPP yönteminin uygulanabilir olduğunu görmek amacıyla, pantoprazol içeren farmasötik preparatlarda pantoprazolün Şekil 4.18’de verilen kalibrasyon grafiğinden doğrudan tayini yapıldı. Pantoprazol içeren, film tablet formundaki üç adet ticati farmasötik preparat Pandev (40 mg), Panref (40 mg) ve Protonex (40 mg) Bölüm 3.2.7’de verildiği gibi suda çözülerek 1 µg/mL’lik

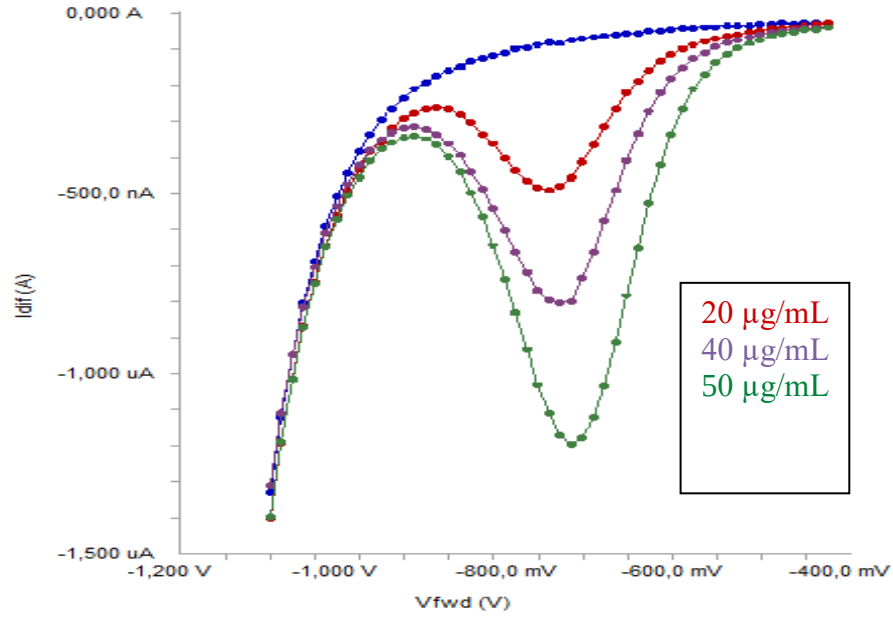
çözeltileri hazırlandı. Daha sonra bu çözeltiler 0.25 M asetat tampon (pH 5.0) çözeltisi ile seyreltilerek 20 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$ ve 50 $\mu\text{g/mL}$ derişimdeki çözeltileri hazırlandı. Elde edilen çözeltilerin diferansiyel puls polarogramları alındı (Şekil 4.19, Şekil 4.20 ve Şekil 4.21).



Şekil 4.19. 20 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$ ve 50 $\mu\text{g/mL}$ derişimlerde Pandev ilaç çözeltisinin diferansiyel puls polarogramı



Şekil 4.20. 20 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$ ve 50 $\mu\text{g/mL}$ derişimlerde Panref ilaç çözeltisinin diferansiyel puls polarogramı



Şekil 4.21. 20 µg/mL, 40 µg/mL ve 50 µg/mL derişimlerde Protonex ilaç çözeltisinin diferansiyel puls polarogramı

Pik akımları ölçülerek pantoprazol derişimi belirlendi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.22’de verildi.

Tablo 4.22. Pantoprazol içeren farmasötik prepatların DPP yöntemi ile miktar tayini

Ticari Preparat	N	Ortalama±SS (µg/mL)	%GK	% BSS
Pandev (40 mg)	12	40.44±1.317	101.10	1.31
Panref (40 mg)	12	39.95±0.675	99.88	1.69
Protonex (40mg)	12	40.08±0.697	100.02	1.74

N: analiz sayısı, SS: Standart Sapma, %GK:%Geri Kazanım, % BSS: Bağlı Standart Sapma

3.4. Farmasötik Preparatlarda Önerilen Yöntemlerden Elde Edilen Verilerin İstatistiksel Olarak Karşılaştırılması

UV-GB absorpsiyon spektrofotometri, kare dalga polarografi ve diferansiyel puls polarografi yöntemlerinin karşılaştırılması amacıyla F-testi yapıldı. Butest sonucunda her üç yöntemin istatistiksel olarak aralarında herhangi bir farkın olmadığı görüldü (Tablo 4.23).

Tablo 4.23. Farmasötik preparatlarda pantoprazolün belirlenmesi için uygulanan yöntemlerin birbirleriyle karşılaştırılması

Parametreler	UV	SWP	DPP
% GK	99.92	99.8	100.1
SD	0.89	0.687	1.317
% BSS	2.32	0.688	1.316
F-testi (3.27) ^a	2.011		

%GK:%Geri Kazanım, SD: Altı tekrarlanan belirlemenin standart sapması, %BSS: Bağlı standart sapma,
^a Teorik değerler, $p = 0.05$ te teorik değerler, H_0 hipotezi: kabul edilen üç yöntem arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yok, $F_t > F_c$: H_0 hipotezi kabul edildi ($P > 0.05$)

5. TARTIŞMA

Peptik ülserler, GİS iç yüzeyinde saldırgan faktörlerin (mide asidi, pepsin gibi sindirim enzimleri ve safra asitleri) iritan etkisiyle meydana gelen açık yaralardır. Peptik ülserler aşağıdaki mekanizma ile meydana gelir. GİS' in iç yüzeyi çeşitli koruyucu faktörler (mukus, bikarbonat, epitel bütünlüğü, doku kanlanması gibi) ile besinlerin sindirimini sağlayan saldırgan faktörlere karşı korunur. Bu koruyucu faktörlerin üretiminde veya devamlılığının sağlanmasında meydana gelen bir azal ve/veya eksojen bir takım saldırganlara aşırı maruziyet ile saldırgan faktörlerin üretiminde artış meydana gelir. Bu artış sonucu kurulu olan hassas denge bozulur. Bu dengenin bozulması ile saldırgan faktörlerin hassas mukoz tabakaya teması gerçekleşir, bu teması izleyen sınırları belli muskularis mukozayı aşan ve submukoza veya muscularis propriaya kadar derinleşebilen doku kaybı gerçekleşmeye başlar ve bu doku kaybının gerçekleşmesi ile ülserasyon meydana gelir. Peptik ülserler bulundukları bölgeye göre gastrik, duodenal veya özofageal ülserler diye sınıflandırılırlar.⁵² Ülsere neden olan faktörler arasında mide asidi üretiminde meydana gelen artış önemli bir faktör olarak kabul edilse de ülserli hastaların sadece %25'inde mide asidi salgısının normalin üzerinde olduğunun tespit edilmiş olması ve bununla birlikte gastrik asit sekresyonunu azaltan bazı ilaçların indometazinle indüklenen ülserleri önleyemediğinin gösterilmesi gastrik asit sekresyonundaki artışın tek başına peptik ülser oluşumunu veya tek başına bu sekresyonun baskılanmasının peptik ülser tedavisini açıklayamayacağını işaret etmektedir.¹ Peptik ülserli hastaların %75'inin HP ile enfekte olduğunun tespit edilmiş olması ve eradikasyonunun hastalığın nüks riskini ve komplikasyonlarını önemli oranda azaltabildiğinin gösterilmesi, bu mikroorganizmayı bilinen en önemli etiyolojik faktör haline getirmiştir. Yapılan çalışmalar muhtelif sebeplerle gastroprotektif mukus salgısını kontrol eden prostaglandin E-2 (PGE-2) üretimini

baskılayan uzun süreli non-steroid antiinflatuar ilaç (NSAİİ) kullanımının peptik ülserlere zemin hazırladığını düşündürmektedir. Öyle ki NSAİİ kullanan hastaların %60'ının bir takım GİS yakınmalarına sahip olduğu, %10'unda ise ciddi GİS ülserlerinin ve %3-4'lük bir kısmında ise hastaneye yatırılmayı gerektirecek ciddi komplikasyonların geliştiği bilinmektedir. Ancak PGE-2 seviyelerini etkilemeyen ve hatta düşürmesine rağmen anti-ülser etkinlik gösteren ilaçların tespit edilmiş olması PGE-2 inhibisyonunun peptik ülser oluşumunu tek başına izah edemeyeceğini göstermiştir.⁵²⁻⁵⁴ Ayrıca bazı deneysel ülser modellerinde denekler yoğun strese maruz bırakıldığında GİS ülserlerinin oluşumunun indüklendiği gözlenmiştir. İnsan vücudunun da yoğun fiziksel (kafa travması, vücut da geniş yanıklar ve yoğun bakımda kalma gibi) ve psikolojik strese maruz kaldığı durumlarda ciddi GİS'de peptik ülserler oluşabilmektedir. Ayrıca ülser hastaları fazla miktarda strese maruz kaldığında yakınmaları şiddetlenmektedir.⁵³

Peptik ülser, hem erkeklerde hem de kadınlarda ırk ayrımı olmadan dünyada sıklıkla görülen bir hastalıktır. Fakat erkeklerin hayat boyunca yakalanma riski kadınlara göre iki kat daha fazladır. Her on kişiden birinin hayatı boyunca en az bir defa peptik ülser şikâyeti yaşadığı bilinmektedir. Yaşın ilerlemesine bağlı olarak görülme sıklığı da artar. Bu oran duodenal ülserlerde 20-50 yaş iken mide ülserinde 40-70 yaş arasındadır. Ayrıca 20 yaş altındakilerde de yaygın olarak peptik ülser görülmemektedir. Peptik ülserlere özgü semptomların başında epigastrik ağrı gelir. Hastalar sağ veya sol epikondriyumda lokalize bir ağrıdan yakınır. Gastrik ve duodenal ülserleri sebep oldukları bu ağrıların farklı karakteri ile birbirlerinden ayrılırlar. Örneğin duodenal ülserler gıda alımıyla yatışan açlık dönemi ağrılarına sebep olurken gastrik ülserlere bağlı ağrılar gıda alımıyla genellikle şiddetlenir. Yine antiasitler duodenal ülserlere bağlı ağrıları genellikle yatıştırırken gastrik ülser vakalarının önemli bir kısmında bu

etkiyi gösteremezler.¹ Peptik ülser tanısı için mide-duodenum grafileri genellikle ilk tercih edilenlerdir. Ancak şiddetli yakınmalara rağmen radyolojik yollarla tespit edilemeyen ve GİS kanamasının mevcut olduğu vakalarda ve mide kanseri riskinin ekarte edilmesi gereken durumlarda endoskopik incelemeler uygulanır. Endoskopik girişim ile alınan doku örnekleri patolojik açıdan değerlendirilerek kesin tanı konulabilir. Peptik ülserin iyileştirilmesinde ilk olarak mide asit salgısının inhibisyonu gerekmektedir. Bu amaç için proton pompa inhibitörleri, H₂ reseptör blokerleri ve antiasitler kullanılır. PPI'ler paryetal hücrelerdeki proton pompasında bulunan H⁺ veya K⁺ ile stimüle edilen ATPaz'ı inhibe ederek mide asiditesini düşürür. Ayrıca PPI'ler, HP'yi inhibe ederek antibakteriyel etki gösterir.⁵³ Rabeprazol, omeprazol, esomeprazol, pantoprazol, lansoprazol ve deksrabeprazol benzimidazol türevi PPI'dir. Sübstitüye bir benzimidazol olan pantoprazol, gastrik pariyetal hücrelerde aktif formuna dönüşerek H⁺, K⁺-ATPaz enzimini spesifik ve geri dönüşsüz bir şekilde inhibe ederek mide lümenine HCl sekresyonunu baskılar. Pantoprazol ile gerçekleşen enzim inhibisyonu doza bağlıdır ve hem oral hem de intravenöz uygulaması mevcut olup genellikle 20 ve 40 mg'lık dozları kullanılır. Pantoprazolün oral yoldan tek doz kullanımı sonrası, plazma doruk derişimine ulaşma zamanı 2.5-4 saat arasında değişmektedir. Karaciğerde ilk geçiş etkisinden minimum etkilenir ve dolayısıyla oral biyoyararlanımı %77 civarındadır. Pantaprozol plazma proteinlerine % 90 oranında bağlanır, karaciğerde inaktif metabolitlerine dönüşür ve karaciğer stokrom hücreleri ile elimine edilir.^{3,7}

Peptik ülser, gelişiminde en önemli faktörlerin stress ve yanlış beslenme olduğu düşünüülerek hastaların yumuşak diyet içeren yaşam tarzı değişikliği ile tedavi edilebileceği bildirilmektedir. Enerji ve diğer besin öğeleri yönünden yeterli ve dengeli bir diyet, üç ana öğün içeren düzenli yemek saatlerini içeren bireyin beslenme alışkanlığının ayarlanması, diyetin posa, probiyotik ve antioksidan vitaminleri içermesi,

düzenli uyku ve dinlenme bunlardan birkaçıdır. Yaşam tarzı değişikliklerine rağmen peptik ülserlerin tedavisi sağlanamayan hastalarda ilaç başlanması önerilmektedir. FDA ve WHO kılavuzlarında bireyselleştirilmiş tedavi prensibinin uygulanması gerektiği ve kişiye özel ilaç ve dozunun belirlenmesi gerektiği bildirilmektedir.² Bireyselleştirilmiş tedavi, hastada tanı konulduktan sonra hastalığın aşamasına göre tedavinin planlanması ve uygulanmasını mümkün kılar. Bu şekilde tedaviye başlamadan önce, hastalığın özellikleri belirlenerek uygulanacak tedaviye karşı alınacak cevaplar belirlenmelidir. Bu cevapları saptayabilmek yani ilacın biyolojik etkisinin belirlenebilmesi için, şüphesiz ki farmasötik preparatlarda ve biyolojik sıvılarda ilaç etkin maddelerinin analizlerinin gerçekleştirilebilmesi gerekmektedir. Buna ilaveten hem imalat ve hem de piyasa kontrolleri sırasında ilaç etkin maddelerinin miktarlarının doğru olarak belirlenmesi ilacın terapötik etkisi, güvenirliliği ve kalitesi açısından önemlidir. Çünkü eksik etkin madde içeren ilaçlar gereken yararı göstermez, fazla etkin madde içeren ilaçlar ise yan etkilere sebep olmaktadır. Bu bağlamda, peptik ülserin medikal tedavisinde son yıllarda büyük atılımlar yapılmış ve bu durum ilaç etkin maddelerinin farmasötik preparatlarda ve biyolojik sıvılarda analitik yöntemler kullanılarak analiz edilebilmesi ile ilişkilendirilmiştir.⁵⁵

Yukarıda bahsedilen bu ilaç analizlerinde kullanılabilecek iyi bir yöntem seçimini yapabilmek için analitik yöntemler hakkında yeterli bir bilgi ve donanımına sahip olmak gerekir. Ayrıca çalışılacak konu hakkında iyi bir literatür bilgisine de sahip olmak gerekmektedir. Tabii ki nasıl bir analitik yöntemin seçilmesi gerektiğini hakkında kesin bir şey söylenemez, her koşul altında seçilecek birden fazla yol vardır. Uygulanacak analitik yöntemin seçimi için, ilk olarak ölçülmesi istenen değerler belirlenmeli ve buna ulaşmak için en güvenilir ve hızlı yol araştırılmalıdır.

Enstrümental analiz yöntemleri, bir örnekte bulunan bir bileşenin cinsi veya derişimi ile orantılı sinyal üreten cihazlarla yapılan analizleri içerir ve spektroskopik, elektrokimyasal, kromatografik ve termal analiz yöntemleri olarak dört sınıfta ayrılır.

Farklı tipte ışınlarla maddenin etkileşimini inceleyen bilim dalına spektroskopi denir. Atom, molekül veya iyonun elektromanyetik radyasyon ile etkileşimi sonucunda dönme, titreşimsel ve elektronik enerji seviyelerinde olan değışiklikler spektroskopinin temelini oluşturmaktadır.^{32,33} Spektroskopi yöntemleri ikiye ayrılır. Bunlar atomik ve moleküler spektroskopidir. Atomik spektroskopide elektronların bir enerji seviyesinden diğeri enerji seviyesine geçişı (elektronik geçişı) incelenir. Moleküler spektroskopide ise bu geçişe ilaveten dönme ve titreşim enerji seviyeleri arasında bulunan geçiş de incelenir. Elektronik geçiş enerjisi; molekülün çeşitli dış orbitallerindeki elektronlarla ilişkin enerji, titreşim enerjisi; atomlar arası titreşimlere ilişkin enerji, dönme enerjisi ise molekül ağırlık merkezi etrafında dönmesine ilişkin enerjidir. Atomik ve moleküler spektrokimyasal yöntemler, absorpsiyon, emisyon ve saçılma gibi birtakım etkileşimleri içermektedir. Bu etkileşimlerin sonuçları göz önüne alınarak çeşitli spektroskopik yöntemler ve cihazlar geliştirilmiştir.³⁵

UV-GB absorpsiyon spektrofotometri yöntemi, ultraviyole ve görünür bölgede meydana gelen absorpsiyonu temel alır ve bu absorpsiyon genellikle bağ elektronlarının uyarılması ile meydana gelir. UV-GB absorpsiyon spektrofotometri yönteminde, maddenin ışını absorplama derecesini ölçerek derişimi saptamak için, absorbans ile derişim arasındaki ilişkiyi veren Lambert-Beer eşitliğinden yararlanılır ve kantitatif analizler başta olmak üzere kalitatif analizlerde, fotometrik titrasyonlarda, molekül ağırlığı tayinlerinde, asit-baz denge sabitlerinin tayininde, kompleks formüllerinin ve kompleks oluşum sabitlerinin tayininde kullanılır. Bu yöntem rutin analizler, farmasötik ve kalite kontrol analizleri, su ve çevre analizleri, ilaç ve gıda analizleri, biyokimyasal

alışmalar, akademik ve araştırma faaliyetleri için sıklıkla tercih edilmektedir. Çünkü sadelik, çok yönlülük, hız, doğruluk ve maliyet etkinliği bakımından diğer analitik yöntemlerden daha üstündür. Maddenin UV-GB'deki ışını absorptlamasını incelemek için UV-GB absorpsiyon spektrofotometresi adı verilen bir düzenek kullanılır ve başlıca ışık kaynağı, monokromatör, örnek kabı, dedektör ve okuyucudan oluşur.

UV-GB absorpsiyon spektrofotometri yöntemi ile ilaç etkin madde analizleri doğrudan yapılabildiğı gibi, duyarlılık ve seçiciliğın düşük olduğu durumlarda etkin madde analizi, bir veya daha fazla reaktif ile oluşturdukları kompleks bileşiklerin spektrofotometrik ölçümlerine dayalı olarak veya absorptans spektrumunun eğimi ile ilgili bilgi veren omuz ile; dönüm noktaları daha net gözlenen ve bileşiğın daha kolay ve daha kesin olarak tanımlamasına sağlayan türev spektrofotometri yöntemi ile gerçekleştirilebilmektedir.³¹

Elektroanalitik yöntemler, elektrot çözeltisine elektriksel bir etki yapıldığında ortamın bu etkiye gösterdiği cevabın ölçüldüğü yöntemlerdir. Elde edilen cevap ortamın özelliğı konusunda bilgi verir ve genellikle potansiyel, akım ve zaman parametreleri elektrokimyasal yöntemlerde incelenir. Potansiyel-akım, parametreleri arasındaki ilişkiler voltametri yöntemleriyle belirlenmektedir. Voltametrik yöntemde üç elektrotlu hücre sistemi bulunur. Bu elektrotlar, zamanla potansiyeli değıştirilen çalışma elektrotu (karbon, civa, platin ve altın vb), potansiyeli deney süresince sabit kalan genellikle Ag/AgCl veya doymuş kalomel referans elektrotu ve genellikle platin tel karşıt elektrotudur. Voltametri analizlerinde maddenin indirgenmesi (katodik akım) ve yükseltgenmesi (anodik akım) sonucu oluşan akım ölçülür. Voltametrik analizlerde kullanılan katı çalışma elektrotlarında elektrot yüzeyi, maddelerin yüzeye tutunmaları sebebiyle kirlenmekte ve tekrar edilebilir yüzeylerin sürekli oluşturulması, elektrot temizleme ve parlatma işlemlerinin zahmetli ve zaman alıcı olmasından dolayı

zorlaşmaktadır. Çalışma elektrodu olarak civa kökenli elektrotlar kullanıldığında sürekli yeni yüzeyler oluşturacağı ve önceden civa yüzeyinde kalan safsızlıklar uzaklaştırılacağı için yukarıda bahsedilen problemler ortadan kaldırılabilir. Ayrıca civa elektrodun negatif potansiyellerde kullanılabilmesi, geniş bir potansiyel aralığında uygulanabilmesi, civanın hidrojen iyonunun indirgenmesine gösterdiği yüksek aşırı gerilim ve civanın yüzeyinde birçok metal indirgenip amalgam oluşturabilmesinden oluşan avantajları vardır. Bu yüzden günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat dezavantajları da vardır. Bunlar, civanın kolayca yükseltgenmesinden dolayı anodik sınırın küçük olması, yöntemde faradayik olmayan artık akımın duyarlılığı düşürmesi (10^{-5} M veya daha büyük) ve civanın sağlığa olumsuz etkisinin olmasıdır.⁵⁶

Damlayan civa (Hg) elektrotunun çalışma elektrotu olarak kullanıldığı voltametrik yöntem polarografi denir. Bu yöntemde, civa çalışma elektroduna zamanla doğrusal olarak değişen bir gerilim programı uygulanarak elektroaktif maddelerin davranışları incelenir. Polarografik yöntemde elde edilen cevap eğrisine polarogram denir. Polarografik yöntemde çalışma elektrodu olarak damlayan civa elektrotu, genel olarak karşıt elektrot olarak platin tel ve karşılaştırma elektrodu olarak da doymuş kalomel elektrot kullanılır.

Farmasötik preparatlardaki etkin maddelerin, kimyasal, farmakolojik ve farmakokinetik özelliklerindeki değişiklikler, bu maddelerin yükseltgenme veya indirgenme davranışına bağlıdır. Elektrokimyasal bir yöntem olan voltametri, ilaç etkin maddelerinin belirlenmesinde sağladığı üstünlüklerden dolayı günümüzde birçok uygulamada kullanılmaktadır. Özellikle bu yöntemler ile farmasötik preparatlarda ve biyolojik sıvılarda düşük derişimlere ihtiyaç duyulan (10^{-10} - 10^{-12} M) ilaç etkin maddelerinin ve metabolitlerinin direkt analizleri yapılabilmektedir. Ayrıca voltametri yöntemleri ile ilaç etkin maddelerinin elektrot yüzeyindeki yükseltgenme ve indirgenme

davranışları incelenerek ilaçların metabolizmaları tespit edilebilir ve farmakolojik etki mekanizmaları açıklanabilir. Ayrıca bu elektrokimyasal yöntemler HPLC, LC-MS, GC-MS gibi birçok kromatografik yöntemle göre daha kolay, daha ucuz ve herhangi bir ayırmaya gerek kalmadan analiz gerçekleştirebilme imkânı sağlamaktadır.

Kemometri, kompleks sistemlerin çözümü için oluşturulan, kimyasal verilerin işlenmesini kapsayan bir kimya bilim dalıdır. Kemometri, karmaşık analitik verilerden istatistik, uygulamalı matematik ve bilgisayar kullanılarak maksimum kimyasal bilgi edinmesi yönünden analitik kimyada sıkça tercih edilir. Kemometrik yöntemlerin uygulanmasının gelişmesinde analitik kimyanın rolü büyüktür. Çünkü yeni enstrümantal yöntemlerle oluşturulan veriler karmaşıktır. Verilerin değerlendirilmesi ve açıklanması için uygulanan bazı kemometrik yöntemler vardır. Kimyasal problemlerin çözümü için uygun kemometrik yöntemlerin kullanılması, bu yöntemlerin sınırlarını ve varsayımlarının tam olarak anlaşılmasıyla mümkündür. Kimyasal veriler bir ya da birçok değişkene bağlı olabilir. Genellikle çok değişkenli verilerin analizinde kemometrik yöntemler kullanılmaktadır. Kemometri, deneysel yöntem tasarımı, modellemeyi, yapı tanımayı, sinyal işlenmesini, kalibrasyonu, optimizasyonu sınıflandırmayı, yapay akıl yöntemlerini, resim işlemede bilgi ve sistem kuramı uygulamalarını kapsar.

Deneysel tasarım, kemometrik tekniklerden biri olup deneysel sonucu etkileyen en önemli faktörlerin neler olduğu, verilerin incelenmesi ve optimize edilmesi gereken faktörlerin hangileri olduğu sorularına cevap verir ve aynı zamanda daha az deney yaparak, daha az çözücü ve zaman kaybıyla matematiksel modelleme teknikleri kullanarak deneyin optimum şartlarının belirler. Merkezi kompozit tasarım yöntemi, deneysel tasarım yöntemlerinden biridir ve yaygın olarak uygulanır. Merkezi kompozit tasarım yöntemi ile deneysel faktörlerin etkileri, aralarındaki etkileşim, deneysel hatalar

ve optimum deney koşulları incelenebilir. Avrupa standartlarına uygun çevrenin daha az kirlenmesine neden olan ekonomik analitik yöntemlerin geliştirilip, geçerlilik testlerinin yapılması deneysel tasarım yöntemleri ile gerçekleştirilebileceği için günümüzde fazlaca tercih edilmektedir.⁴³

Analitik yöntem seçimi ve yöntemin optimizasyonu yapıldıktan sonra geliştirilen bu yöntemin uygulanabilir olduğunu göstermek için belirleyicilik, doğrusallık, gözlenebilme ve tayin alt sınırı, doğruluk, kesinlik, geri kazanım ve kararlılık gibi parametreleri içeren geçerlilik testlerinin (validasyon) yapılması gerekmektedir. Geçerlilik testlerinde bileşimi tam olarak bilinen standart maddeler kullanılır. Kullanılan standart maddeler, analizi yapılacak analit ile aynı kimyasal özelliklere sahip olmalıdır.

UV-GB absorpsiyon spektrofotometri yöntemi ile farmasötik preparatlarda pantoprazolü, Kumar ve ark.¹⁰ suda 292 nm ve yine Shinde ve ark.¹¹ suda 289 nm dalga boyunda absorbans spektrumlarını alarak belirlemişlerdir. Bazı çalışmalarda ise pantaprazolün amfoter yapıda olduğu ve bazik ortamda daha keskin pik verdiği belirtilmiştir. Bu çalışmalarda, Panya ve ark.¹² 0.1 N NaOH çözeltisinde 296 nm ve 319 nmde, Adepu ve ark.¹³ fosfat tamponunda (pH 6.8) spektrofotometrik denklem yöntemini kullanarak 270 nmde ve Kumar ve ark.¹⁴ 0.1 M NaOH çözeltisinde 291 nm dalga boyunda, absorbans spektrumları alınarak pantaprazolün UV-GB absorbans spektrofotometri yöntemi ile doğrudan belirlenmesi gerçekleştirilmiştir.

Farmasötik preparatlarda türev spektrofotometri yöntemi ile pantoprazol, Chosla ve ark.¹⁵ metanolde 269 nm, Patil ve ark.¹⁶ metanolde 282 nm, Phadtare ve ark.¹⁷ metanolde 258 nm, Suslu ve ark.¹⁸ metanol-su karışımında (1:9 h/h) 303 nm ve Kakde ve ark.¹⁹ 0.1 M HCl içeren metanolde 331 nm dalga boyunda birinci türev spektrumları alınarak belirlenmiştir.

Farmasötik preparatlarda pantoprazolün belirlenmesi için kompleks oluşumuna dayalı UV-GB absorbans spektrofotometri yöntemi çalışmaları ise, Baraka ve ark.²⁰ pantoprazolü borat tamponunda (pH 10.5) 2,4-dinitrofluorobenzen ile nükleofilik substitusyon reaksiyonu yoluyla sarı renkli ürüne dönüştürmüş ve oluşan ürün 431 nm dalga boyunda; Basavaiah ve ark.²¹ asidik ortamda pantoprazol aşırı miktarda NBS ile reaksiyona sokulmuş ve bunu takiben arta kalan NBS'in metil turuncu veya indigo karmin boyar maddeleriyle reaksiyona sokulması sonucu sarı renkli ürüne dönüştürülmüş ve oluşan ürünler sırasıyla 520 nm ve 610 nm dalga boyunda; Basavaiah ve ark.²² H₂SO₄ ortamında pantoprazol aşırı miktarda permanganat ile reaksiyona sokulmuş ve bunu takiben arta kalan permanganatın 545 nm dalga boyunda; Moustafa²³ pantaprozolün asidik ortamda DDQ, iyot ve eozin-bakır ile yük transfer kompleksleri oluşturulmuş ve oluşan ürünlerin sırasıyla 457 nm, 293 ve 359 nm, 549 nm dalga boyunda; Reddy ve ark.²⁴ pantaprozolün asidik ortamda bromokrezol yeşili ile iyon-çift kompleksi oluşturulmuş ve oluşan ürünün 420 nm dalga boyunda; Devi ve Basavaiah²⁵ nötral ortamda, demir (III) klorür pantaprazol ile indirgenmiş ve daha sonra açığa çıkan Fe²⁺'nin 1, 10-fenantrolin ve 2,2-bipiridil reaksiyonu sonucu kırmızı renkli ürünlere dönüştürülmüş ve oluşan ürünler sırasıyla 510 nm ve 520 nm dalga boyunda; Devi ve ark.²⁶ pantaprozolün nötral ortamda permanganatla ile reaksiyonu sonucu oluşan kahverengi ürünün 350 nm dalga boyunda; Syeda ve Syeda²⁷ pantaprozolün nötral ortamda Fe³⁺ ve daha sonra ferrisiyanür reaksiyonu sonucu oluşan prusya mavisi ürünün 720 nm dalga boyunda UV-GB absorbans spektrumları alınarak pantoprazolün analizi gerçekleştirilmiştir.

Elektrokimyasal yöntemlerden biri olan voltametri yöntemi ile farmasötik preparatlarda pantoprazol, Erk²⁸ Britton-Robinson tampon çözeltisinde (pH 5.0) camsi karbon elektrotta, 1000 mV'da diferansiyel puls voltametri ile; Abeer ve Gehad²⁹

Britton-Robinson tampon çözeltisinde (pH 8.0) camı karbon elektrotta 833 mV'da dönüşümlü, kare dalga ve diferansiyel puls voltametri ile; Suslu ve Altınöz³⁰ Britton-Robinson tampon çözeltisinde (pH 5.0) asılı cıva damla elektrotta -987 mV'da kare dalga voltametri ile belirlenmiştir.

Pantaprozolün farmasötik preparatlarda belirlenmesine yönelik yukarıda bahsedilen çalışmalardan farklı olarak bu çalışmada kemometrik tekniklerden biri olan deneysel tasarım ile yöntem şartları belirlenen yeni bir UV-GB absorpsiyon spektrofotometri yöntemi ve yine literatürde bulunmayan yeni kare dalga poligrafisi ve diferansiyel puls poligrafisi yöntemleri geliştirildi ve geçerlilik testleri yapıldı. Belirtilen yöntemlerden elde edilen sonuçların kısaca özeti aşağıda verildi.

Bu çalışmada, UV-GB absorpsiyon spektrofotometri yöntemi ile pantoprazolün belirlenmesi amacıyla 230-400 nm dalga boyu aralığında çeşitli çözücülerde dalga boyu taraması yapıldı ve UV-GB absorpsiyon spektrumları alındı. En iyi absorpsiyonun fosfat tampon çözeltisi ile elde edildiği belirlendi (Tablo 4.1) ve bu çözeltide pantoprazolün UV-GB absorpsiyon spektrumu alındı (Şekil 4.8). Yöntemin optimum koşullarının belirlenmesi amacı ile deneysel sonucu etkileyen fosfat tamponu derişimi ve pH parametreleri göz önünde bulundurarak, her iki şartın optimum değerlerini bulmak için merkezi kompozit tasarım yöntemi uygulandı. Her bir parametrenin maksimum ve minimum değerleri saptandı ve bu değerler fosfat tamponu derişimi için 0.08 M-0.3 M ve pH için ise 11-13.5 olarak belirlendi. Bu değerler 2 faktörlü merkezi kompozit tasarımına göre 13 deneyden oluşan bir set halinde belirlendi ve 294 nm dalga boyundaki absorpsiyon değerleri UV-GB absorpsiyon spektrofotometrede ölçüldü (Tablo 4.2). Elde edilen absorpsiyon değerlerini kullanarak Tablo 4.3'de matematiksel quadropik modelin yüzey cevapları için elde edilen sonuçların ANOVA test sonuçları verildi. Bu matematiksel modelden yararlanılarak Tablo 4.4'de verilen denklemler elde edildi. Elde

edilen absorbans değerlerine göre Design Expert 8 programı yardımıyla optimum şartlar ve bu şartlar sonucu elde edilmesi gereken cevap değeri matematiksel model olarak ifade edildi. Bu parametrelere bakıldığında F-testine göre en iyi sonuçların quadropik yaklaşımla tespit edildiği gözlemlendi. Deney sonuçlarına göre χ^2 değerinin anlamlı çıkması bu deney faktörlerini doğrulamaktadır. Daha sonra her bir parametre ANOVA testine tabi tutuldu ve bu hesaplamalara göre fosfat tamponu derişimi karesi, ve pH parametreleri açısından modelin anlamlı olduğu F-testi ile belirlendi. Deney sonuçlarına göre optimum şartlar 0.08 M fosfat tampon çözelti derişimi ve 11.3 pH olarak belirlendi (Tablo 4.5). Bu değerler ile yapılan modellemede 0.43 absorbans değeri matematiksel olarak saptandı. Daha sonra yapılan deneysel çalışmada da bu değere çok yakın değerler bulundu. Geri kazanım % 100.4 olarak hesaplandı (Tablo 4.6). Yöntemin var olan sonuçlarla lineer ilgisinin bulunup bulunmadığı lack of fit değeri ile saptandı. Ho hipotezine göre lineer bir ilişki vardı ve bu ilişki bulunan 0.0092 değeriyle reddedildi. Metot kümülatif olarak F-testine sokuldu ve elde edilen 7.69 değeri yöntemin istatistiksel açıdan anlamlı olduğunu kanıtlandı. Tüm bu sonuçlar ışığında istatistiksel olarak modelin ve optimizasyonun anlamlı olduğu ve deneysel verilerle karşılaştırıldığında da modelin gerçek örneklere uygulanabilir olduğu sonucuna varıldı.

Yöntemin optimum koşulları merkezi kompozit tasarım ile belirlendikten sonra, pantoprazolün su ile hazırlanan ve 0.08 M fosfat tampon çözeltisi (pH 11.3) ile seyreltilen çözeltisinin alınan UV-GB absorbans spektrumunda 294 nm dalga boyunda 1 maksimum pik gözlemlendiği belirlendi (Şekil 4.3). Daha sonra su kullanılarak hazırlanan pantoprazolün stok çözeltisi, 0.08 M fosfat tampon (pH 11.3) çözeltisi ile seyreltilerek 7 farklı derişimde (2.5, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 $\mu\text{g/mL}$) standart çalışma çözeltileri hazırlandı. UV-GB absorbans spektrumları alındı ve 294 nm dalga boyunda absorbans değerleri kaydedildi (Şekil 4.3). Farmasötik preparattan kaynaklanan herhangi bir

interferansa rastlanmadı. Pantoprazolün derişimine karşı absorbans şiddetleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edildi (Şekil 4.4). Bu kalibrasyon eğrisinin regresyon eşitliğinin istatistiksel analiz sonuçlarına göre regresyon doğrusu denklemi $A=0.0423x-0.0080$ (A: Absorbans, x: derişim) ve korelasyon katsayısı (r) 0.9997 olarak (Tablo 4.7); yöntemin LOD değeri 0.71 µg/mL; LOQ değeri ise 2.16 µg/mL olarak tespit edildi. Yöntemin günüçi ve günler arası kesinliği için % BSS ve doğruluğu için BH değerleri sırasıyla % 3.52 ve % 1.26'dan küçük olarak belirlendi (Tablo 4.8). Yöntemin uygulanabilirliğinin araştırılması amacıyla seçilen 3 adet film tablet formundaki ticari farmasötik preparat, Bölüm 3.6'da anlatıldığı gibi hazırlanarak iki farklı derişimleri halinde geliştirilen yöntem ile UV-GB absorbans spektrumları alındı (Şekil 4.5-6-7). Ayrıca üç farklı farmasötik preparat için yapılan geri kazanım çalışmasında % 98.81-99.60 aralığında geri kazanım değerleri elde edildi ve bu da yöntemin doğruluğunun bir göstergesi olarak kabul edildi (Tablo 4.9). Geliştirilen UV-GB absorpsiyon spektrofotometri yöntemi ile Pandev, Panref ve Protonex isimli farmasötik preparatlarda yapılan analizlerde % 99.19 ile % 99.92 arasında sonuçlar elde edildi ve analiz bulguları etiketli miktarlarla uyumlu olarak bulundu (Tablo 4.11).

Bu çalışmada, pantoprazolün elektrokimyasal davranışlarını incelemek ve optimum deneysel parametreleri belirlemek (pH, destek elektrolitin derişimi ve tarama hızı) amacıyla, öncelikle doğrusal taramalı ve dönüşümlü polarografi yöntemleri kullanıldı. Bu amaçla önce çeşitli çözücülerde potansiyel penceresi belirlenmek için farklı asidik pH'larda (pH 2.0-6.0) asetat, fosfat ve Britton-Robinson tampon çözeltileri ile pantoprazolün 10 µg/mL derişimde çözeltileri hazırlanarak 0 mV ile -1000 mV potansiyel aralığında dönüşümlü polarogramları alındı. Bu polarogramlardan yararlanılarak pantoprazolün en iyi pik akımı ve pik potansiyelinin elde edildiği çözelti asetat tampon çözeltisi ve pH değeri ise pH 5.0 olarak tespit edildi. Daha sonra asetat

tampon çözelti ortamında çalışma potansiyel aralığı belirlemek için asetat tampon (pH 5.0) çözeltisinin 0 mV ile -1000 mV potansiyel aralığında dönüşümlü polarogramı alındı (Şekil 4.8’de gösterilen A piki) ve -1000 mV ile -400 mV potansiyel aralığında ilgili çözücüye ait indirgenme veya yükseltgenme piki gözlenmedi. Aynı potansiyel aralığında pantoprazol içeren çözeltinin dönüşümlü polarogramı alındığında ise pantoprazole ait, -740 mV’da bir anodik pik gözlemlendi (Şekil 4.8’de gösterilen B piki). Ayrıca bu polarogramda katodik bir pik gözlenmedi. Bu da pantoprazolün yükseltgenmesinin tersinmez olabileceğini göstermektedir. Ancak, polarogramda katodik pik gözlenmemesi sadece elektron aktarımının tersinmezliğinden kaynaklanmaz aynı zamanda bunu takiben hızlı kimyasal bir reaksiyondan da kaynaklanabilir.

50 µg/mL pantoprazolün DCE’de 0.005-1V/s aralığında değişik tarama hızlarında alınan doğrusal taramalı polarogramlarında, tarama hızının artması ile pik akımının arttığı ve pik potansiyelinin de pozitif kaydı tespit edildi (Tablo 4.12). Pik potansiyelinin yüksek tarama hızlarında pozitif kayması da, anodik pikin tersinmezliğini göstermektedir. Bunun yanında V-I (Şekil 4.9), $V^{1/2}$ -I (Şekil 4.10) ve $\log V$ - $\log I$ (Şekil 4.11) grafiklerindeki yüksek korelasyon katsayısı ile doğrusal olması ⁴⁶ (V-I için $r^2=0.9990$, $V^{1/2}$ -I için $r^2=0.9991$ ve $\log V$ - $\log I$ için $r^2=0.9991$) akım fonksiyonunun tarama hızına bağlı olduğunu ve böylece sistemin tersinmez olduğunu göstermektedir. Pantoprazolün elektrot yüzeyine adsorplanıp adsorplanmadığının belirlenmesi için de dönüşümlü ve doğrusal taramalı polarografi yöntemleri kullanıldı. Bu amaçla asetat tampon (pH 5.0) çözeltisi içerisinde hazırlanan 50 µg/mL pantoprazolün farklı tarama hızlarında dönüşümlü polarogramları alındı. Bu polarogramlardan yararlanılarak tarama hızı ile pik akımı arasındaki değişimi incelemek amacı ile $\log V$ - $\log I$ grafikleri çizildi (Şekil 4.11) ve $\log I$ ve $\log V$ grafiğinde eğim 0.38 olarak tespit edildi. Bu eğim değeri pantoprazolün difüzyon kontrollü olarak elektrot

yüzeyine adsorbe olmadığını göstermektedir. 50 µg/mL pantoprazol derişiminde farklı tarama hızlarında (0.005 V/s - 1 V/s) alınan doğrusal taramalı polarogramlarından yararlanılarak en keskin yükseltgenme pikinin 0.1 V/s tarama hızında gözleendiği belirlendi (Tablo 4.12). Organik maddelerin elektrot reaksiyonlarının çoğunda protonlar görev aldığı için bu reaksiyonlardaki akım-potansiyel ilişkileri genellikle pH'ya bağımlı olur. Bu nedenle bu bağımlılıktan oluşabilecek hatalardan kurtulabilmek için polarografik çalışmalarda çözeltilerin tamponlanması gereklidir. Bu amaç ile, 50 µg/mL pantoprazolün asetat tampon çözeltisinde farklı pH'larda (pH 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.7) hazırlanan çözeltilerinden alınan doğrusal taramalı polarogramlarından yararlanılarak en keskin oksidasyon pikinin elde edildiği pH değeri 5.0 olarak tespit edildi. Ayrıca seçilen destek elektrolitin derişiminin pantoprazolün pik akımı üzerine etkisi incelendi ve bu amaç ile 50 µg/mL pantoprazolün farklı derişimlere sahip asetat tamponunda (0.025, 0.050, 0.075, 0.100, 0.125, 0.150, 0.250, 0.300 ve 0.400 M) hazırlanan çözeltilerinden alınan doğrusal taramalı polarogramlarından yararlanılarak en keskin oksidasyon pikinin elde edildiği toplam asetat tampon çözelti derişimi 0.25 M (0.083 M CH₃COOH ve 0.167 M CH₃COONa) olarak bulundu.

Elektrokimyasal davranışı ve optimum koşulları belirlenen pantoprazolün kare dalga polarografi yöntemi ile belirlenebilmesi için öncelikle -1000 ile -400 mV potansiyel aralığında taraması yapıldı ve kare dalga polarogramları alındı. Su ile hazırlanan ve 0.25 M asetat tampon (pH 5.0) çözeltisi ile seyreltilen pantoprazol çözeltilerinin (5, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 µg/mL derişimlerde) alınan kare dalga polarogramında -740 mV'da bir oksidasyon piki gözleendi (Şekil 4.12). Farmasötik preparattan kaynaklanan herhangi bir interferansa rastlanmadı. Bu polarogramlardan yararlanılarak pik akım değerlerine karşı pantoprazolün doğrusal olduğu derişimleri (5-60 µg/mL) grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edildi (Şekil 4.13). Bu

kalibrasyon eğrisinin regresyon eşitliğinin istatistiksel analiz sonuçlarına göre regresyon doğrusu denklemi $A=0.0044x-0.4163$ (A: Absorbans, x: derişim) ve korelasyon katsayısı (r) 0.9990 olarak; yöntemin LOD değeri 0.40 µg/mL; LOQ değeri ise 1.20 µg/mL olarak tespit edildi. Yöntemin günüçi ve günler arası kesinliği için % BSS ve doğruluğu için BH değerleri sırasıyla % 3.65 ve % 1.66'dan küçük olarak belirlendi (Tablo 4.14). Yöntemin uygulanabilirliğinin araştırılması amacıyla seçilen 3 adet film tablet formundaki ticari farmasötik preparat Bölüm 3.6.'da anlatıldığı gibi hazırlanarak iki farklı derişimleri halinde geliştirilen yöntem ile kare dalga polarogramı alındı. Ayrıca üç farklı farmasötik preparat için yapılan geri kazanım çalışmasında % 97.3-104.0 aralığında geri kazanım değerleri elde edildi ve bu da yöntemin doğruluğunun bir göstergesi olarak kabul edildi (Tablo 4.16). Geliştirilen kare dalga polografi yöntemi ile Pandev, Panref ve Protonex isimli farmasötik preparatlarda yapılan analizlerde % 99.71 ile % 99.80 arasında sonuçlar elde edildi ve analiz bulguları etiketli miktarlarla uyumlu olarak bulundu (Tablo 4.17).

Diferansiyel puls polarografi yönteminde de öncelikle pantoprazol çözeltisinin -1000 mV ile -400 mV potansiyel aralığında taraması yapıldı ve diferansiyel puls polarogramları alındı. Su ile hazırlanan ve 0.25 M asetat tampon (pH 5.0) çözeltisi ile seyreltilen pantoprazol çözeltilerinin (5, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 µg/mL derişimlerde) alınan diferansiyel puls polarogramında -740 mV'da bir oksidasyon piki gözlemlendi (Şekil 4.17). Farmasötik preparattan kaynaklanan herhangi bir interferansa rastlanmadı. Bu polarogramlardan yararlanılarak pik akım değerlerine karşı pantoprazolün doğrusal olduğu derişimleri (5-60 µg/mL) grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edildi (Şekil 4.18). Bu kalibrasyon eğrisinin regresyon eşitliğinin istatistiksel analiz sonuçlarına göre regresyon doğrusu denklemi $A=0.0011x-0.1183$ (A: Absorbans, x: derişim) ve korelasyon katsayısı (r) 0.9980 olarak (Tablo 4.18); yöntemin LOD değeri

0.30 µg/mL; LOQ değeri ise 0.90 µg/mL olarak tespit edildi. Yöntemin günüçi ve günler arası kesinliği için % BSS ve doğruluğu için BH değerleri sırasıyla % 3.44 ve % 0.60'dan küçük olarak belirlendi (Tablo 4.19). Yöntemin uygulanabilirliğinin araştırılması amacıyla seçilen 3 adet film tablet formundaki ticari farmasötik preparat Bölüm 3.6.'da anlatıldığı gibi hazırlanarak iki farklı derişimleri halinde geliştirilen yöntem ile diferansiyel puls pologramı alındı. Ayrıca üç farklı farmasötik preparat için yapılan geri kazanım çalışmasında % 98.9- %102.6 aralığında geri kazanım değerleri elde edildi ve bu da yöntemin doğruluğunun bir göstergesi olarak kabul edildi (Tablo 4.21). Geliştirilen diferansiyel puls polografi yöntemi ile Pandev, Panref ve Protonex isimli farmasötik preparatlarda yapılan analizlerde % 99.8 ile %101.1 arasında sonuçlar elde edildi ve analiz bulguları etiketli miktarlarla uyumlu olarak bulundu (Tablo 4.22).

Bu çalışmada, farmasötik preparatlarda pantoprozolün belirlenmesine yönelik geliştirilen UV-GB Absorbsiyon Spektrofotometri, Kare Dalga Polarografi ve Diferansiyel Puls Polarografi yöntemlerinin günüçi ve günler arası %BSS ve BH değerleri % 4.0'den küçük olması ile kesinliği ve doğruluğu oldukça yüksektir. İlaveten yöntemlerin farmasötik preparatlardan geri kazanım değerleri de yüksektir. Ayrıca her üç yöntem için bulunan LOD ve LOQ değerleri ile yöntemler, farmasötik prepratlarda pantaprozolün belirlenmesi için yeterli hassasiyettedir. Son olarak, farmasötik preparatlarda pantaprozolün miktar analizleri için uygulanan her üç yöntemin birbiriyle karşılaştırılması amacıyla da *F*-testi yapılmıştır. Bu test sonucunda geliştirilen yöntemlerin istatiksel olarak aralarında herhangi bir farkın olmadığı görülmüştür (*F*-hesap: 2.011 ve *F*-cetvel: 0.05 (3, 24): 3.27; *F*hesap < *F*cetvel olduğundan *P*>0.05) (Tablo 4.23).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Peptik ülser dünyada çok sık görülen yaygın bir hastalık olup her ırkta ve her iki cinsten görülür. Öyle ki her on kişiden birinin hayatı boyunca en az bir defa peptik ülser şikayeti yaşadığı bilinmektedir ve ülkemizde en fazla görülen ilk beş hastalık arasındadır. Hastalıkların ilaçlar ile tedavi edilebilmesi için ilaçların farmasötik preparatlarda ve biyolojik sıvılarda analizine duyulan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır. Bu bağlamda, daha az deney yaparak daha az çözücü ve zaman kaybıyla matematiksel modelleme teknikleri kullanarak optimum şartları belirleyecek deneysel tasarım yöntemleri ile çevrenin daha az kirletilmesini sağlayan daha ekonomik analitik yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada, peptik ülser tedavisinde proton pompa inhibitörü olarak kullanılan pantoprazolün farmasötik preparatlarda belirlenmesine literatürde bahsedilen çalışmalardan farklı olarak kemometrik tekniklerden biri olan deneysel tasarım ile yöntem şartları belirlenen yeni bir UV-GB absorpsiyon spektrofotometri yöntemi ve yine literatürde bulunmayan yeni kare dalga polarografisi ve diferansiyel puls polarografisi yöntemleri geliştirildi ve geçerlilik testleri yapıldı. Çalışmanın sonunda ise geliştirilen ve geçerlilik testleri yapılan her üç yöntemin pantoprazolün farmasötik preparatlarda miktar tayini için uygulanabilir olduğu gösterildi. Sonuç olarak, herhangi bir ön işleme ihtiyacı duymayan bu üç yöntemin çok sayıda analizi kısa sürede ve az numune ihtiyacı ile yapılabilmesi açısından literatürde bulunan diğer yöntemlere alternatif olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Waisman Y, Dinari G, Marcus H, Ligumsky M, Rosenbach Y, Zahavi I. Naloxone is protective against indomethacin-induced intestinal ulceration in the rat. *Gastroenterology*. 1985, 89(1):86-91.
2. Dattilo M, Figura NJ. Helicobacter pylori infection, chronic gastritis, and proton pump inhibitors. *Clin Gastroenterol*. 1998,27(1):163.
3. Fitton, A, Wiseman, L, Pantoprazole a review of its pharmacological properties and therapeutic use in acid-related disorders. *Drugs*.1996, 51: 460.
4. Katz, PO, Frissora, C. The pharmacology and clinical relevance of proton pump inhibitors. *Curr Gastroenterol Rep*.2002, 4: 459.
5. Wurzer H, Schutze K, Bethke T, Fischer R, Luhmann R, Riesenhuber C. Efficacy and safety of pantoprazole in patients with gastroesophageal reflux disease using an intravenous-oral regimen. *Hepato-gastroenterology*. 1999,46(27):1809-1815.
6. Chandraiah MR, Reddy YVR. Method development and validation of HPLC for the determination and quantification of pantoprazole, *Bull. Environ. Pharmacol. Life Sci.*; 2012, 1(8): 39 - 42
7. Huber R, Hartmann M, Bliesath H, Lühmann R, Steinijans VW, Zech K. Pharmacokinetics of pantoprazole in man. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*.1996, 34(5):185-194
8. De Korwin JD, Ducrotte P, Vallot T. New generation proton pump inhibitors: progress in the treatment of peptic acid diseases? *Presse Med*. 2004,19:746-54.
9. Uygun A. Uzun süre proton pompa inhibitörleri (ppi) kullanılacaksa, hangi ppi tercih edilmelidir? nelere dikkat edilmelidir? *Güncel Gastroenteroloji*,2017,1,46-58.

10. Kumar R, Singh H, Singh P. Development of UV spectrophotometric method for estimation of pantoprazole in pharmaceutical dosage forms. *J. Chem. Pharm. Res.*, 2011, 3(2):113-117
11. Shinde V, Sarode V, Kshirsagar S, Jadhav A. Development and validation of UV spectrophotometric method for estimation of pantoprazole sodium in bulk and tablet dosage form. *CIBTech Journal of Pharmaceutical Sciences*.2016,5(4),22-26
12. Pandya J, Solanki S, Patel M. Development and validation of differential spectrophotometric method for determination of pantoprazole in tablet dosage form *JPSBR*, 2012, 2: 2271-3681
13. Adepu V, Nagoji KEV, Girijasastry V. Simultaneous determination of flurbiprofen and pantoprazole in bulk and pharmaceutical dosage form by UV spectrophotometer. *Int J Pharm Pharm Sci*, 2014,6(9): 31-33.
14. Kumar RS, Pamireddy P, Emmadi CS, Koneru S. Simultaneous determination Of naproxen sodium and pantoprazole sodium in bulk and pharmaceutical dosage form by validated ultraviolet spectrophotometric method. *International Journal of Chemical and Analytical Science*, 2012, 3(10):1569-1572
15. Chosla S, Bhatt V, Kadikar H. Development and validation of UV spectrophotometric method for simultaneous estimation of pantoprazole and levosulpiride in pharmaceutical dosage form. *Am. J. PharmTech Res.* 2013, 3(1): 2249-3387
16. Patil SS, Dhabale PN, Kuchekar BS. Spectrophotometric estimation of pantoprazole in tablet dosage form. *Int. J. Chem. Sci.*, 2008, 6(4):1984-1990.
17. Phadtare GA, Daswadkar SC, Kuchekar MA. analytical method development and its validation for estimation of pantoprazole sodium in bulk and tablet dosage form by UV spectroscopic method. *IJAPBR*, 2016,1(2):92-96.

18. Süslü İ, Altınöz S, Yıldız E. Determination of pantoprazole in tablet dosage forms by two different spectrophotometric methods. *FABAD J. Pharm. Sci.*,2003,28:85-92,
19. Kakde RB, Gedam SN, Chaudhary NK, Barsagade AG, Kale DL., Kasture AV. Three-wavelength spectrophotometric method for simultaneous estimation of pantoprazole and domperidone in pharmaceutical preparations. *Int.J. PharmTech Res.*2009,1(2):386-389
20. Baraka MM, El-Sadek ME, Abdel-Aziz LM, El-Bermawi SS. Validated spectrophotometric determination of pantoprazole sodium in tablets using 2, 4-dinitrofluorobenzene through nucleophilic substitution reaction. *Asian Journal of Pharmaceutical Analysis and Medicinal Chemistry*. 2014, 2(1):26 - 36.
21. Basavaiah K, Anilkumar UR, Kalsang T. Spectrophotometric determination of pantoprazole sodium in pharmaceuticals using n-bromosuccinimide, methyl orange and indigo carmine as reagents. *Iran. J. Chem. Chem. Eng.*, 28(1), 2009:31-36.
22. Basavaiah K, Rajendraprasad N, Tharpa K, Anilkumar UR, Hiriyanna SG, Vinay KB. Titrimetric and spectrophotometric assay of pantoprazole in pharmaceuticals using permanganate. *J.Mex.Chem.Soc.*,2009,53(1):34-40.
23. Moustafa AAM. Spectrophotometric methods for the determination of lansoprazole and pantoprazole sodium sesquihydrate. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2000,22:45-58.
24. Reddy MP, Reddy GR, Reddy NR. A simple spectrophotometric determination of pantoprazole in pharmaceutical formulations. *Chem Sci Trans.*, 2014, 3(1):209-212.
25. Devi OZ, Basavaiah K. Validated spectrophotometric determination of pantoprazole sodium in pharmaceuticals using ferric chloride and two chelating agents. *Int.J. ChemTech Res.*,2010,2(1):624-632.

26. Devi OZ, Basavaiah K, Vinay KB. Sensitive and selective spectrophotometric determination of pantoprazole sodium in pharmaceuticals using permanganate. *CI&CEQ.*, 2010, 16(1):97–102.
27. Syed AA, Syeda A. Spectrophotometric determination of certain benzimidazole proton pump inhibitors. *Indian J. Pharm. Sci.*, 2008, 70 (4): 507-510.
28. Erk N. Differential pulse anodic voltammetric determination of pantoprazole in pharmaceutical dosage forms and human plasma using glassy carbon electrode. *Analytical Biochemistry*, 2003, 323:48–53.
29. Abeer ME, Mohamed GG. Sensitive electrochemical determination of pantoprazole sodium in pure form pharmaceutical formulations and biological fluid at glassy carbon electrode using differential pulsed and square wave techniques. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2015 (10): 7147-7158.
30. Altinoz S, Suslu I. Determination of pantoprazole in pharmaceutical formulations and human plasma by square-wave voltammetry. *Analytical Letters*, 2005,38: 1389-1404.
31. Skoog DA, West, DM. *Principles of Instrumental Analysis*. Baskı. 1980.
32. Holler JF, Skoog DA, West DM. Fundamentals of analytical chemistry Çeviri: Kılıç E, Köseoğlu F. *Analitik Kimya Temelleri*. Bilim matbaa. Ankara, 1999: 497-597.
33. Hollas JM. *Modern spectroscopy*. 4th Baskı. Chichester ; Hoboken, NJ, J. Wiley, 2004.
34. Holler JF, Skoog DA, Nieman T. Principles of Instrumental Analysis. Çeviri: Kılıç E, Köseoğlu F, Yılmaz H. *Enstrümental Analiz İlkeleri*, Ankara, Bilim Matbaa, 1998:116-137.
35. Gündüz T, *İnstrümental Analiz*, Ankara, Gazi Kitabevi, 2002: 229-295.

36. Ahmed SS, Karajgi SR, Simpi CC, Sonawane S, Kalyane NV. Visible spectrophotometric methods for the estimation of losartan potassium and omeprazole in single component pharmaceutical formulations. *International Journal of PharmTech Research*, 2009, 1: 1247-1250.
37. Skoog DA, Leary JJ. *Principles of Instrumental Analysis*, 4th ed. New York, Harcourt Brace College Publishers, 1992.
38. Wiberg K. Multivariate spectroscopic methods for the analysis of solutions. Department of Analytical Chemistry, Sweden: Stockholm University, 2004.
39. Yılmazgüç, B. Telmisartan'ın Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi Ve Voltametrik Yöntemle Tayini. Fen Bilimleri Enstitüsü. Kimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2008.
40. Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. *Analitik Kimya Temel İlkeler*, 8.Baskı, Cilt 1, Çeviri Ed. Kılıç E, Yılmaz H. Bilim Yayıncılık (2007).
41. Bard AJ, Faulkner LR. *Electrochemical methods: Fundamentals Applications*, John Wiley and Sons. Inc. New York, 2001.
42. Dinc E. Kemometri çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 2007, 27: 61-92.
43. Baran KE. [N,N-bis(salisiliden)-2,2-dimetil-1,3-propandiamin] Komplekslerinden Yararlanılarak Zeytinyağında Metal Analizleri. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı. Yüksek lisans tezi, Balıkesir: Balıkesir Üniversitesi, 2006.
44. Tokay F. [N,N'-bis(4-metoksisalisiliden)-1,2-diaminoetan] Ligandı Kullanılarak Zeytinyağında Bakır, Demir, Nikel, Çinko Metallerinin Ekstraksiyonu ve FAAS ile Tayini. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı. Yüksek lisans tezi, Balıkesir: Balıkesir Üniversitesi, 2009

45. Sogutertas O, Kayalı A. Analitik yöntem geçerliliğine genel bir bakış. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 2005, 34(1):41-57.
46. Wang J. *Analytical Electrochemistry*, 2nd ed. New York, Wiley/VCH Publishers, 2000.
47. Kissenger PT, Heineman WR. *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*, 2nd ed. Marcel Dekker, New York. 1996.
48. Nicholson RS, Shain I. Theory of stationary electrode polarography: Single scan and cyclic methods applied to reversible, irreversible, and kinetic systems. *Journal of Analytical Chemistry*, 1964, 36(4):706-724.
49. Moane S, Barreira Rodriguez JR, Miranda Ordieres AJ, Tunon Blanco P, Smyth MR. *J Pharm Biomed Anal*, 1995, 14: 57-63.
50. Arranz A, Fernandezde BS, Echevarria C, Maria Moreda J, Cid A, Valentin JF *J Pharm Biomed Anal*. 1999, 21: 797-807.
51. Grimshaw J, *Electrochemical Reactions and Mechanisms in Organic Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, 2000.
52. Chan FKL, Leung WK. Peptic Ulcer disease. *Lancet* 2002,360:933-41.
53. Zahavi I, Weizen T, Marcus H, Karmeli F, Dinari G. Ketotifen is protective against indomethacin-induced intestinal ulceration in the rat. *Isr J Med Sci*. 1996, 32(5):312-317.
54. Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowska I, Pawlik T. Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation. *J Physiol Pharmacol*. 2005, 56(5):33-55.
55. Buick A, Doig M, Jeal S, Land G, McDowall R. Method validation in the bioanalytical laboratory. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1990, 8: 629-637.

56. Tural H, Gökçel Hİ, Ertay FN. Enstrümental Analiz I Elektroanalitik Yöntemler, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, Bornava, İzmir. 2003,186:131.



EKLER

EK-1 ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Tuba YERKAYA Doğum Tarihi: 05.03.1986 Doğum Yeri: Erzurum Medeni Hali: Evli, 1 çocuk Uyruğu: T.C. Adres: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı 25240 ERZURUM Tel: 0442 231 52 00 Faks: 0442 231 52 01 E-mail: tubayerkayaa@gmail.com
Eğitim
Lise: Nene Hatun Kız Lisesi (2002) Lisans: Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü (2005-2009) Yüksek Lisans: Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı (20015-2018) Doktora:
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce: Orta Derecede Almanca: Rusça:
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
Ay Plastik Ambalaj San. ve Tic. A.Ş.
İlgi Alanları ve Hobiler
Müzik ve El Sanatları

EK-2 ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Eczacılık Fakültesi Dekanlığı
Etik Alt Kurulu

Sayı : 93722986.12/ 05
Konu: Etik Alt Kurul Kararı

13/01/2017

Sayın Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU

İlgi: 12.01.2016 tarih ve 12 sayılı dilekçeniz.

Fakültemiz Alt Etik Kurulunun 13.01.2017 tarihinde almış olduğu 2 numaralı karar ile danışmanı olduğunuz yüksek lisans öğrencisi Tuba YERKAYA(SARUHAN)'nın "*Pantoprazol etkin maddesinin farmasötik preparatlarda farklı analitik yöntemlerle miktar tayini*" başlıklı çalışması etik kurulumuz tarafından kabul edilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Doç. Dr. Bilal YILMAZ
Üye

Doç. Dr. Meltem ÇETİ
Başkan

Yrd. Doç. Dr. Şaziye Sezin PALABIYIK
Başkan Yardımcısı

Yrd. Doç. Dr. Handan Gökben SEVİNDİK
Üye

Yrd. Doç. Dr. Sinan BİLGİNER
Üye

Karar-02- Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU'nun danışmanı olduğu yüksek lisans öğrencisi Tuba YERKAYA(SARUHAN)'nın Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Laboratuvarında yürüteceği "*Pantoprazol etkin maddesinin farmasötik preparatlarda farklı analitik yöntemlerle miktar tayini*" başlıklı çalışma ile ilgili 12.01.2016 tarih ve 12 sayılı yazı ile ekleri görüşülmüştür.

Yapılan görüşmelerden sonra; söz konusu çalışmanın yürütülmesinin etik kurallara uygun olduğu mevcut oybirliği ile kabul edilmiştir.