TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ATORVASTATİN TAYİNİ İÇİN YENİ BİR SPEKTORFOTOMETRİK YÖNTEM

FATİH YİĞİT
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. IŞIL AYDIN

DİYARBAKIR- 2019

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ONAY

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Fatih YİĞİT'in hazırladığı "**Atorvastatin Tayini için Yeni Bir Spektrofotometrik Yöntem**" başlıklı tez Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih: 30/05/2019

Danışman	Prof. Dr. Işıl AYDIN	
Jüri Üyeleri		İmza
Jüri Başkanı	Prof Dr. Selim ERDOĞAN	
Üye	Prof. Dr. Işıl AYDIN	
Üye	Dr.Öğr.Üyesi Elif VARHAN ORAL	
Üye	.....	
Üye	.....	

Bu tez Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun …./…./20.. tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

…../…../……

Prof. Dr. Hakkı Murat BİLGİN
Dicle Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve tezimi Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzu standartlarına uygun bir şekilde hazırladığımı beyan ederim.

31/05/2019

Fatih YİĞİT

TEŞEKKÜR

Bilimsel projemi başarılı bir şekilde gerçekleştirebilmemi ve tamamlamamı sağlayan Allah'a Hamd'ı borç bilirim. Araştırma projesi boyunca değerli rehberliği ve önerileri ile yardımları esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Işıl AYDIN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmada desteklerini gördüğüm sayın Nurettin TARKAN'a, Dr. Mehmet AKDENİZ'e, Arş.Gör. Figen EREK'e ve Prof.Dr. Fırat AYDIN'a içten teşekkürlerimi sunuyorum. Bu tez bitene kadar anlayışları, destekleri, cesaretlendirmeleri, duaları, sabrı ve her türlü desteği için sevgili aileme teşekkür ediyorum.

Saf atorvastatin ilacını sağladığı için Abdi İbrahim İlaç San.ve Tic.A.Ş.'ye teşekkür ederim.

Fatih YİĞİT

İÇİNDEKİLER

		Sayfa No
BEYAN		I
TEŞEKKÜR		II
İÇİNDEKİLER		III
KISALTMA VE SİMGELER DİZİNİ		V
ŞEKİLLER LİSTESİ		VI
TABLOLAR LİSTESİ		VII
1.1.	ÖZET	1
1.2.	ABSTRACT	3
2.	GİRİŞ ve AMAÇ	5
3.	GENEL BİLGİLER	7
3.1.	Atorvastatin	7
3.1.1.	Atorvastatin'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	8
3.2.	Quinalizarin (Reaktif)	9
3.3.	Yük Transfer Kompleksi	10
3.4.	Analitik Metodun Seçimi	10
3.5.	Validasyon Parametreleri	11
3.5.1.	Spesifiklik	11
3.5.2.	Linearite	11
3.5.3.	Doğruluk	11
3.5.4.	Kesinlik	12
3.5.5.	Ölçüm Limiti (LOQ) ve Dedeksiyon Limiti (LOD)	12
3.5.6.	Standart Sapma Değeri (SD)	13
3.6.	Farmasötik Analizlerde Analitik Tekniklerin Rolü	13
3.6.1.	İlaç Analizinde Kullanılan Bazı Analitik Teknikler	15
3.6.2.	İlaç Analizinde Spektrofotometrinin ve Uygun Analitik Yöntemin Rolü	15
3.6.3.	Farmasötik Analizlerde Yakın Kızılötesi Spektroskopinin (NIRS) Analitik Yönteminin Rolü	16
3.7.	Ultraviyole ve Görünür Absobsiyon Spektofotometresinin Teorisi	17
3.8	Kimyasal analizlerde Lambert Beer Kanunu	21
3.9.	Literatür Taraması Özeti	22
4.	GEREÇ VE YÖNTEM	26
4.1.	Cihaz	26
4.2.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	26
4.2.1.	Standartların Hazırlanması	26

4.2.2. Reaktif Çözeltilerinin Hazırlanması…… 27
4.3. Kalibrasyon Eğrisinin Çizimi…….. 27
4.4. Yük Transfer Kompleksinin Stokiyometrisi …….. 28
4.5. Farmasötik Formülasyonlarda (Tabletlerde) Uygulama ……. 28
4.6. Katı Yük Transfer Kompleksini Sentezleme……... 28
5. BULGULAR ……... 30
5.1. Absorbsiyon Spektrumu…….. 30
5.2. Deney Çalışması Koşullarının Optimizasyonu…… 32
5.2.1. Çözücü Etkisi……... 32
5.2.2. Reaktif Konsantrasyonunun Etkisi …… 33
5.2.3. Bekleme süresi ve Sıcaklık Etkisi…….. 35
5.2.4. pH Etkisi…… 36
5.3. Yük Transfer Kompleksinin Stokiyometrisi…….. 36
5.4. Yük Transfer Kompleks Reaksiyonunun Mekanizması……. 37
5.5. Validasyon Yöntemi…… 38
5.5.1. Linearite……..... 38
5.5.2. Dedeksiyon Limiti (LOD) ve Tayin Limiti (LOQ)…… 38
5.5.3. Kararlılık …… 39
5.5.4. Doğruluk ve Kesinlik ……. 39
5.5.5. Sağlamlık……..... 40
5.5.6. Atorvastatin Formülasyonunu İlaç için Uygulama…… 40
5.6. Yük Transfer Kompleks Reaksiyonun Ürününün Kızılötesi Spektrum ile Karakterizasyonu…….. 41
6. TARTIŞMA……..... 43
7. SONUÇ……. 45
8. KAYNAKLAR……..... 46
9. ÖZGEÇMİŞ……. 52
10. EKLER……... 53
10.1. Turnitin Orjinallik Raporu……. 53
10.2. t-Tablosu……. 54

KISALTMA VE SİMGELER DİZİNİ

FDA	: Food and Drug Administration
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
YTK	: Yük transfer kompleksi
UV	: Ultra-Viole
ATOR	: Atorvastatin
HMG-CoA	: Hidroksimetilgulasil-koenzim A
LOD	: Limit of Dedection
LOQ	: Limit of Quantification
ICH	: International Conference of Harmonization
SD	: Standart Sapma Değeri
RSD	: Bağıl Standart Sapma Değeri
NIRS	: Yakın kızıl ötesi spektroskopi
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
λ	: Dalga boyu
nm	: Nanometre
μg	: Mikrogram
mL	: Mililitre
ε_r	: Dielekrik Sabiti
M	: Molar
mM	: Milimolar

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 3.1 Atorvastatin'in Kimyasal Yapısı…… 7

Şekil 3.2 HMG-CoA Reduktaz Reaksiyonu……. 7

Şekil 3.3 Toz halindeki Atorvastatin…… 9

Şekil 3.4 Quinalizarin'in kimyasal yapısı…….. 9

Şekil 3.5 Serumdaki K^+ konsantrasyonunun iki bireysel sonucun karşılaştırması…… 12

Şekil 3.6 Tipik spektrometre bileşenlerinin şeması …….. 18

Şekil 3.7 Elektronik geçiş seviyeleri ve geçiş durumları…….. 19

Şekil 4.1 Atorvastatin'in kalibrasyon eğrisi……. 27

Şekil 5.1 Metanole karşı Atorvastatin'in absorpsiyon spektrumu……... 31

Şekil 5.2 Metanole karşı Quinalizarin'in absorbsiyon…… 31

Şekil 5.3 1 mL Quinalizarin (1.0×10^{-4} M) ile 75 μg/mL Atorvastatin'in yük transfer kompleksinin absorbsiyon spektrumu…… 31

Şekil 5.4 Çözücü etkisini göstermek için; farklı çözücülerde çözünmüş Atorvastatin ile 3 farklı reaktifin sırasıyla oluşturdukları yük transfer komplekslerininin absorbsiyonları…….. 33

Şekil 5.5 Reaktif ve Atorvastatin arasında oluşan yük transfer kompleksinin optimum dalgaboyunda Quinalizarin hacminin absorbansa etkisi……..... 34

Şekil 5.6 Atorvastatin ile quinalizarinin reaksiyonunda absorbansa, zamanın ve sıcaklığın etkisi……... 35

Şekil 5.7 Atorvastatin ile quinalizarin arasındaki Job'un sürekli varyasyon yöntemi…….. 36

Şekil 5.8 Quinalizarin ile Atorvastatinin reaksiyonu……. 37

Şekil 5.9 Atorvastatin'in Kızılötesi spektrumu……. 42

Şekil 5.10 Quinalizarin'in Kızılötesi spektrumu……. 42

Şekil 5.11 Atorvastatin-Quinalizarin kompleksinin Kızıl ötesi spektrumu… 42

TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1 Ambalajlı ilaç malzemelerinin içeriğinin tayini için öngörülen çeşitli analitik yöntemlerin oranı……. 14

Tablo 3.2 Çok Sayıda Kromofor'un Absorbsiyon Etkisi…….. 20

Tablo 3.3 Bazı ilaçların farmasötik formülasyonlardaki UV-Görünür spektrofotometrik prosedürlerle kantitatif analizi…….. 25

Tablo 5.1 Çözücülerin Dielektrik Sabitleri…… 32

Tablo 5.2 Reaktif konsantrasyon etkisi deneyinde yük transfer kompleksi ve kör numunesinin hazırlanması…….. 34

Tablo 5.3 Reaksiyonun optimum koşulları……..... 35

Tablo 5.4 Önerilen yöntemle Atorvastatin tayini için anatilik parametreler.. 38

Tablo 5.5 Yük transfer kompleksi yapı kararlılığının güniçi ve günlerarasında izlenmesi…… 39

Tablo 5.6 Önerilen yöntemle doğruluk ve kesinlik değerlendirmesi……. 39

Tablo 5.7 Sağlamlık testinin sonuçları……... 40

Tablo 5.8 Önerilen yöntemin formülasyon değeri için istatistik sonuçları.... 40

Tablo 5.9 Atorvastatin, Quinalizarin ve Yük Transfer Kompleksinin kızılötesi frekans karakteristikleri……. 41

Atorvastatin Tayini için Yeni Bir Spektrofotometrik Yöntem

Öğrencinin Adı ve Soyadı: Fatih YİĞİT

Danışmanı: Prof. Dr. Işıl AYDIN

Anabilim Dalı: Analitik Kimya

1.1. TÜRKÇE ÖZET

Amaç:

Farmasötik formülasyon ve ilaçlarda bulunan Atorvastatin'in miktarsal olarak tayini için reaktif olarak quinalizarin yardımıyla yük transfer kompleksi oluşturarak ekstraksiyona gerek kalmaksızın spektrofotometrik yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem:

Atorvastatin ve reaktif olarak kullanılan Quinalizarin ile metanol ortamında oda şartlarında 573 nm dalgaboyunda maksimum absorbans veren mavi renkli yük transfer kompleksi oluşturulmuştur. Reaksiyonu etkileyecek farklı değişkenler optimize edilmiş ve çalışılmıştır.

Bulgular:

Atorvastatin'in kantitatif tayininde; oluşturulan yük transfer kompleksinin çok yoğun bir renk vermesi, maksimum renk gelişiminin sağlanması için ve en uygun koşulları oluşturmak için denemeler yapılmıştır. Yöntemin geliştirilmesi ve incelenmesi için; çözücü yapısı etkisinin değerlendirilmesi, reaktif konsantrasyonunun etkisinin araştırılması ve reaksiyonu tamamlamak için gereken sürenin belirlenmesi ve reaksiyonun stokiyometrisinin değerlendirilmesi gibi süreçler takip edildi.

Sonuç:

Önerilen yöntem aynı zamanda; sadece bir çözücü içindeki, atorvastatin ile quinalizarin arasındaki yük transfer reaksiyonu olma avantajına sahiptir ve aynı zamanda geliştirilebilir olma özelliği vardır. Linearitesi, 10-100 µg/mL aralığında kalibrasyon doğrusu elde edilmiş, tespit ve nicelendirme sınırları, sırasıyla 1,49 µg/mL ve 4,98 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Bu nedenle, önerilen yük transfer kompleksi reaksiyonu, kalite kontrol laboratuarlarında atorvastatinin rutin analizlerinde pratik ve ekonomiktir.

Anahtar Sözcükler:

Yük Transfer Kompleksi, Atorvastatin, Quinalizarin, Farmasötik Formülasyon, UV-VIS

A New Spectrophotometric Method for the Determination of Atorvastatin

Student's Surname and Name: YIGIT Fatih

Adviser of Thesis: AYDIN Isil

Department: Analytical Chemistry

1.2. ABSTRACT

Aim:

In order to determine the amount of atorvastatin found in pharmaceutical formulations and drugs, it is aimed to develop a spectrophotometric method without the need for extraction by forming a charge transfer complex with the help of quinalizarin as a reagent.

Material and Method:

A blue-colored charge transfer complex with maximal absorbance at 573 nm was generated in the room environment in the presence of kinetics with methanol. Different variables that affect the reaction have been optimized and studied.

Results:

In quantitative determination of atorvastatin; Experiments were conducted to provide the most favorable conditions to ensure a very dense color and maximum color development of the generated charge transfer complex. For the development and analysis of the method; The process of evaluating the effect of the solvent structure, studying the effect of the reagent concentration and evaluating the time required to complete the reaction and the stoichiometry of the reaction were followed.

Conclusion:

The proposed method is also; it has the advantage of being the charge transfer reaction between atorvastatin and quinalizarin in a solvent only and can be improved. The linearity of the calibration line was obtained between 10-100 μg / mL, and the detection and quantification limits were calculated as 1,49 μg/mL and 4,98 μg/mL, respectively. Therefore, the proposed charge transfer complex reaction is practical and economical in routine analysis of atorvastatin in quality control laboratories.

Key Words:
Charge Transfer Complex, Atorvastatin, Quinalizarin, Pharmaceutical Formulation, UV-VIS

2.GİRİŞ ve AMAÇ

Atorvastatin, statinler olarak bilinen kolesterol düşürücülerdendir, öncelikle karaciğerde etki eder. Hepatik kolesterol seviyelerinin azalmasıyla, kolesterolün hepatik alımı artar ve plazma kolesterol seviyeleri azaltır.

İlk olarak 1985 yılında Warner-Lambert Şirketi'nden Bruce Roth tarafından sentezlenen bir ilaç erken maddesidir. Atorvastatin'in 3 farklı tuz formu bulunur. Atorvastatin Kalsiyum, Atorvastatin Lakton ve Atorvastatin Sodyum. Lipitor® (Atorvastatin Kalsiyum) ismiyle Pfizer firması tarafından piyasaya sunuldu. Food and Drug Administration (FDA) tarafından 1996'da onaylandığında, Lipitor satışları 125 milyar ABD dolarını aştı ve yaklaşık on yıl boyunca dünyanın en çok satan ilaç markaları listesine girdi (1). Dünyada yaygın olarak kullanılan, çalışmamızda kullanmaya karar verdik.

Quinalizarin kromojenik-renkli şelat üretme kabiliyeti-özelliği sayesinde, kompleksleşme reaksiyonuna dayanan bir spektrofotometrik yöntem uygulanabilmektedir (2,3).

Yük transfer kompleksi (YTK), iyonlaşma potansiyeli yeterince düşük olan elektron ile iyonlaşma potansiyeli yeterince yüksek olan elektron donörlerinin etkileşimidir. Bir alıcıdan donör'e olan elektronun transferi, yük transfer işlemiyle mümkündür (4) ve sıklıkla Görünür Bölge Spekrofotometrisindeki geniş bandlı elektronik absorbsiyondaki yoğun görünümü ile karakterize edilir (5).

İlaç Analizinde önemli yer tutan önemli yöntem gruplarından biri, doğal UV emilimi ve kimyasal reaksiyonlara dayanan spektrofotometrik yöntemlerdir ve günümüzde ilaç analiz ölçümleri neredeyse sadece spektrofotometri ile gerçekleştirilmektedir (6). Spektrofotometri, bir maddenin dalga boyu işlevi olarak iletim veya yansıtma özelliklerinin kantitatif ölçümüne dayanır. Bu yöntemlerin avantajları; düşük zaman ve işçilik tüketimidir. Bu yöntemlerin kesinliği de oldukça mükemmeldir. Özellikle ilaçların dozaj formunun analizinde uygulanan UV-Görünür Bölge spektrofotometrisinin kullanımı son yıllarda hızla artmıştır (7). Kolorimetrik

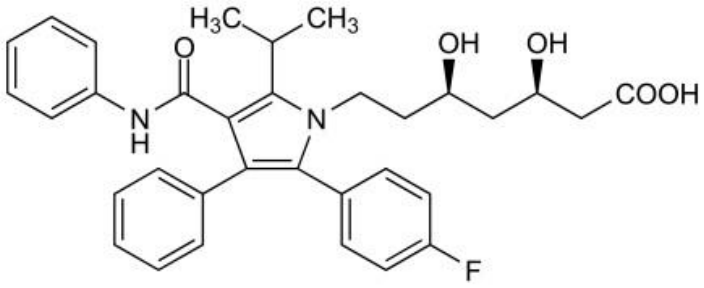
yöntemlerin, dökme malzemelerin tahlili için düzenli olarak kullanıldığını da belirtmek önemlidir.

Çalışmamız; atorvastatin ile quinalizarin arasında yük transfer kompleksi oluştururarak, numunede bulunan analitin kabul edilebilir düşük seviyelerdeki konsantrasyonlarının UV-Görünür bölgede belirlenmesine olanak sağlayan, hassas ve seçici özelliği olan spektrofotometrik yöntemlere alternatif oluşturmayı amaçlamaktadır.

3.GENEL BİLGİLER

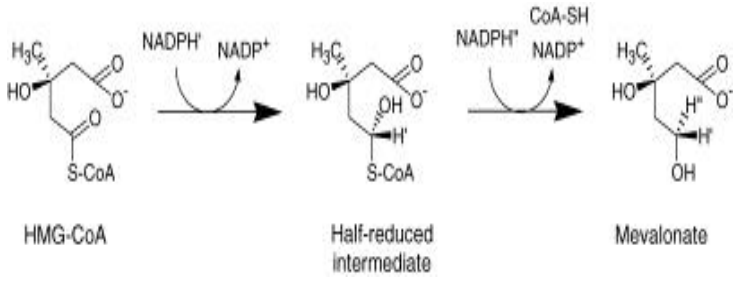
3.1. Atorvastatin

Atorvastatin (ATOR), Statinler olarak bilinen ilaç sınıfının bir üyesidir. Kimyasal ismi "[*R*-(*R**,*R**)]-2-(4-Fluorophenyl)-β,δ-dihydroxy–5-(1–methylethyl)-3–phenyl–4-[(phenylamino) carbonyl] -1*H*-pyrrole–1–heptanoic acid" dir (Şekil 3.1). Merck İndeks'in 13.baskısında (8) ve Martindale the Complete Drug Reference'ın 34. baskısında (9) listelenmiştir.



Şekil 3.1. Atorvastatin'in Kimyasal Yapısı

Kolesterolü düşürmek için kullanılır. Atorvastatin, kolalon biyosentezinde Mevalonat yolu ile hız belirleyici enzim olan Hidroksimetilgulasil-koenzim A (HMG-CoA) redüktazın rekabetçi bir inhibitörüdür. HMG-CoA redüktaz, HMG-CoA'nın mevalonat'a dönüşümünü katalize eder (Şekil 3.2). Reduktaz reaksiyonunun ana hatları 1960 yılında tanımlanmış ve 1964'te Konrad Bloch and Feodor Lynen 1964'te Nobel Ödülü'ne layık görülmüştür (10).



Şekil 3.2. HMG-CoA Reduktaz Reaksiyonu

Atorvastatin, öncelikle karaciğerde etki eder. Azalan hepatik kolesterol seviyeleri, kolesterolün hepatik alımını arttırır ve plazma kolesterol seviyelerini azaltır. İlk olarak 1985 yılında Parke-Davis Warner-Lambert Şirketi'nden Bruce Roth tarafından sentezlendi. Atorvastatin, Lipitor® (Atorvastatin Kalsiyum) ismiyle Pfizer firması tarafından piyasaya sunuldu. Food and Drug Administration (FDA) tarafından 1996'da onaylandığında, Lipitor satışları 125 milyar ABD dolarını aştı ve yaklaşık on yıl boyunca dünyanın en çok satan ilaç markaları listesine girdi (1). Lipitor adlı ilacın patenti 30 Kasım 2011'de sona erince, Watson Pharmaceuticals ve India'daki Ranbaxy Laboratories isimli ilaç firmaları tarafından jenerik Atorvastatin olarak üretildi (11).

Statinler, 5 yıl boyunca takip edilen 90.000 denekte, geniş ve kapsamlı klinik denemelerde test edilmiştir ve bütün bu çalışmaların sonuçları tutarlı olmuştur. Statinlerle tedavi sayesinde, plazma LDL seviyelerinin % 25–35 düştüğü ve kalp krizi sıklığının % 25–30 azaldığı tespit edilmiştir. Koroner olaylardaki azalma yüzdesinin, tedavinin daha uzun sürmesi ve statin tedavisinin daha erken başlatılması durumunda daha da etkili olacağı söylenmektedir. Çalışmaların hiçbirinde kolesterolü düşürmenin olumsuz bir etkisi olmamıştır. Bunun sebebinin; Statinlerin dikkat çekici güvenliği, benzersiz etki mekanizmaları olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (12- 14).

2 adet yarı sentetik statin (Simvastatin ve Pravastatin) ve 4 adet sentetik statin (Fluvastatin, Atorvastatin, Rosuvastatin ve Pitavastatin) dahil olmak üzere 6 adet Statin pazara sunulmuştur (15).

3.1.1. Atorvastatin'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

IUPAC isimlendirmesi (3R, 5R) -7-[2-(4-fluorophenyl)-3-phenyl-4-(phenylcarbamoyl)-5-(propan-2-yl)-1H-pyrrol-1-yl]-3,5-dihydroxyheptanoicacid'dir. Molekül formülü $C_{33}H_{35}FN_2O_5$ ve molekül ağırlığı 558,7 gram/mol'dür. Atorvastatin, oral yolla alımından hemen sonra hızla emilir. Bu, uygulanan ilaç dozuna bağlı olarak doğru oranlı olarak artar.

Atorvastatin'in 3 farklı tuz formu bulunur. Atorvastatin Kalsiyum, Atorvastatin Lakton ve Atorvastatin Sodyum. Çalışmamızda Atorvastatin Kalsiyum kullanacağız.

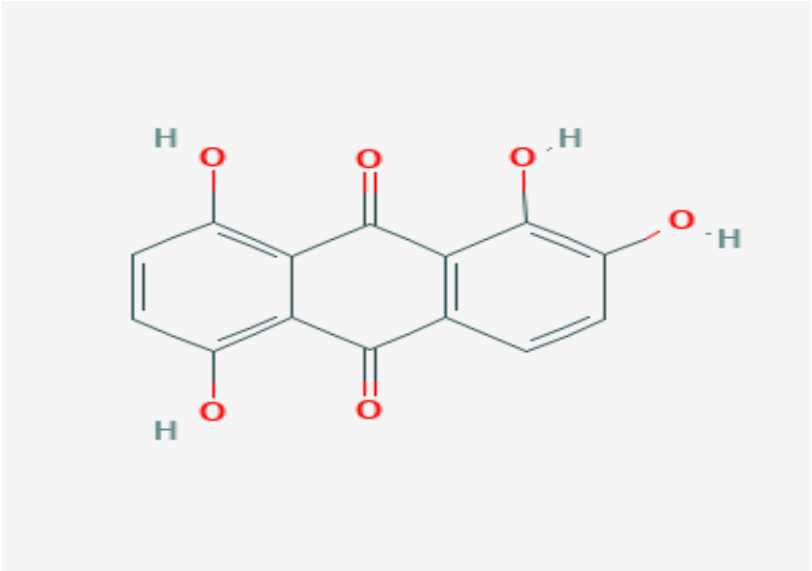
Atorvastatin Kalsiyum'un molekül formülü $[C_{33}H_{35}FN_2O_5]_2.Ca.3H_2O$ ve molekül ağırlığı 1209,4 gram/mol'dür. Kirli beyaz renkte kristalize tuz (Şekil.3.3) halindedir. pH≤4.0 olan su çözeltilerinde çözünmez. Distile su, Fosfat tamponu (pH=7.4) ve Asetonitril'de çok az çözünür. Etanol'de az çözünür. Metanolde ise serbestçe çözünür.



Şekil 3.3. Toz halindeki Atorvastatin

3.2. Quinalizarin (Reaktif)

Quinalizarin (1,2,5,8-tetrahydroksianthrakinon), $C_{14}H_8O_6$ formülüne sahip olan polifenolik bir bileşiktir (Şekil 3.4). Pigment ve boya endüstrisinde kullanılır. Dört hidrojen atomunun, dört hidroksil (OH) grubu ile yer değiştirilmesiyle türetilmiş tetrahidroksiyantrakinon izomerinden biridir.



Şekil 3.4. Quinalizarin'in kimyasal yapısı

3.3. Yük Transfer Kompleksi

Yük transfer kompleksi (YTK), iyonlaşma potansiyeli yeterince düşük olan elektron ile iyonlaşma potansiyeli yeterince yüksek olan elektron donörlerinin etkileşimidir. Bir alıcıdan donör'e olan elektronun transferi, yük transfer işlemiyle mümkündür (4). Yük Transfer komlekslerinin oluşumu, sıklıkla Görünür Bölge Spekrofotometrisindeki geniş bandlı elektronik absorbsiyondaki yoğun görünümü ile karakterize edilir (5). Ancak, alıcı ve verici türlerinin her ikisi içinde absorbe eden spektrumunda böyle bir geniş band görünmez. Organik ve Fotoiletken özellikteki opto-kimyasal sensörlerin redoks prosesleri çalışması sayesinde (YT) Kompleksi bulunmuş (16, 17) ve YTK etkileşimleri, kimyasal ve fiziksel özelliklerinden dolayı büyük ilgi görmüştür (18–19).

Yük transfer kompleksi (YTK) terimi, ilk önce Mulliken tarafından tanıtıldı (20-21) ve geniş ölçüde Foster (22) tarafından tartışıldı. Mulliken, klasik iyonik, kovalent ve hidrojen bağlanma bileşenlerinin koordinasyon modellerine uymayan belirli molekül sınıflarının davranışını açıklamak için yeni bir tür eklenti tanımlamayı amaçladı. Bu tür eklentiler, bileşenlerinin özelliklerinden bazılarını büyük ölçüde korurken, örneğin çözünürlük, diyamanyetik ve paramanyetik duyarlılık gibi bazılarında değişiklikler açıkça görülür. Başka farklılıklar ise elektrokimyasal teknikler ile bulunmuştur. Bazı kompleksler, normal stokiyometri ve yapı kristalleri olarak izole edilebilir.

3.4. Analitik Metodun Seçimi

Bir analitik metot, spesifik matrikste analite spesifik bir teknik uygulanmasıdır. Analizin gereksinimleri, en iyi yöntemi belirler. Bir yöntem seçerken, aşağıdaki tasarımın bir kısmına veya hepsine önem verilmelidir.

Kriterler:

- Doğruluk,
- Hassasiyet,
- Duyarlılık,
- Seçicilik,
- Ekipmanın kullanılabilirliği,
- Sağlamlık,
- Operasyon Kapsamı,
- Analiz süresi,
- Maliyet.

3.5. Validasyon Parametreleri

3.5.1. Spesifiklik

Yöntem; aranan analitin, karışık bir matriks içerisindeki diğer maddelerden tam ve doğru olarak bulunarak ayırabilme özelliğidir. Matrikste olması beklenen bileşenlere ragmen; yöntemin, bağımsız olarak aranan maddeyi bulabilme yeteneğidir. Numune içindeki varlığı tespit edilmiş aranan bileşik ile girişim yapabilen diğer analitlerden farklı olarak ölçme becerisidir (23).

3.5.2. Linearite

Analitik bir prosedürün doğrusallığı, belirli bir aralık dahilinde analit konsantrasyonuyla analitin cevabının orantılı olarak gösterebilmesidir. Yöntemin doğrusallık çalışması; genellikle hedef analit konsantrasyonunun % 80-120'si aralığındaki beş farklı konsantrasyon seviyesinde standart çözeltiler hazırlayarak gerçekleştirilir (24).

3.5.3. Doğruluk

Doğruluk, bir deneyin sonucunun "gerçek" veya "beklenen sonuç" ile birbirine ne kadar yakın ve aynı fikirde olduğudur. Elde edilen sonuç ile oluşturulan sonuç arasındaki "fark", genellikle öngörülebilir sonuçlara bölünür ve göreceli hata yüzdesi olarak bildirilir.

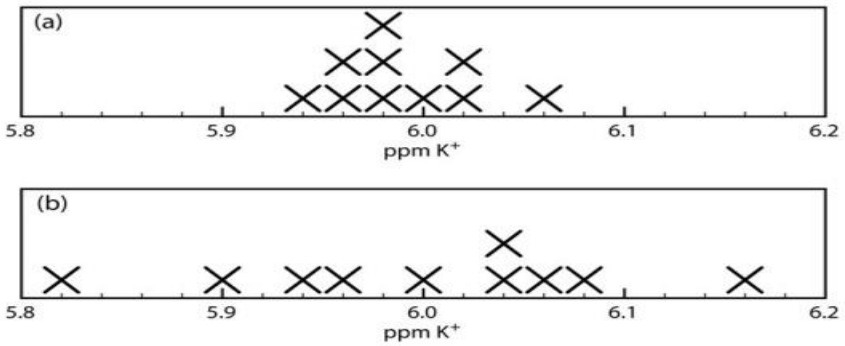
$$\% \text{ Hata} = \frac{\text{Elde edilen sonuç - Beklenen sonuç}}{\text{Beklenen sonuç}} \text{x100}$$

Analitik yöntemler, göreceli hatalarının büyüklüğüne bağlı olarak üç gruba ayrılabilir.

- Deneysel bir sonuç doğru sonucun % 1'i içinde olduğunda, analitik yöntem oldukça doğrudur.
- % 1 ile % 5 arasında bağıl hatalara neden olan yöntemler orta derecede doğrudur.
- Ancak % 5'ten daha büyük göreceli hatalar, düşük doğrulukta yöntemler üretmektedir.

3.5.4. Kesinlik

Bir örnek birkaç kez analiz edildiğinde, bireysel sonuçlar nadiren aynıdır. Hatta, sonuçlar genelde rastgele dağılmış durumdadır. Kesinlik, bu değişkenliğin bir ölçüsüdür. Bireysel analizler arasındaki uyum ne kadar yakınsa, sonuçlar o kadar net olur.



Şekil 3.5. Serumdaki K^+ konsantrasyonunun iki bireysel sonucun karşılaştırması (a) 'daki veriler (b)' deki verilerden daha kesindir.

Bir yöntemin kesinliği, sinyalin ölçülmesindeki belirsizliğine ve örneklerin tekrarlanabilir şekilde kullanım kolaylığı da dahil olmak üzere çeşitli faktörlere bağlıdır. Kesinlik, verilerin merkezi bir değere yayılmasının bir ölçüsüdür ve aralık, standart sapma veya varyans olarak ifade edilebilir. Kesinlik genellikle iki kategoriye ayrılır: Tekrarlanabilirlik ve yeniden üretilebilirlik.

Aynı analist tarafından, laboratuvar çalışmasının aynı dönemi boyunca yapılan tüm ölçümler sırasında elde edilen kesinlik, tekrarlanabilirlikle yapılır. Öte yandan, yeniden üretilebilirlik, analistler arasında veya tek bir analist için farklı laboratuar oturumlarında elde edilen kesinliktir. Yeniden üretilebilirlik ek değişkenlik kaynakları içerdiğinden, bir analizin yeniden üretilebilirliği tekrarlanabilirliğinden daha iyi olamaz (23).

3.5.5. Ölçüm Limiti (LOQ) ve Dedeksiyon Limiti (LOD)

Ölçüm limiti (Bir numune içindeki en düşük analit miktarının, uygun bir hassasiyet ve doğrulukla nicel olarak belirlenebilmesi) ve Tayin limiti (bir numune içindeki tespit edilebilen, en düşük analit miktarı) ve Uluslararası Uyum

Konferansı'na (International Conference of Harmonization-ICH) uygun olarak analitik prosedürler için "Validasyon Kuralları" belirlenmiştir.

Tayin limitinin hesaplanmasında kullanılan yöntem; En küçük ölçülebilen konsantrasyon değerinin, tekrarlanabilirlik denemeleriyle hesaplanmış "Standart Sapma değerinin (SD)" 3 katını almaktır.

$$LOQ = 3 \times (SD / a)$$

Ölçüm limitinin hesaplanmasında kullanılacak yöntem ise "Standart sapma değerinin (SD)" 10 katını almaktır (25).

$$LOQ = 3 \times (SD / a)$$

a; kalibrasyon eğrisinin eğimi iken,

SD; korelasyon doğrusunun y ekseninden standart sapmasıdır.

3.5.6. Standart Sapma Değeri (SD)

Mutlak standart sapma (SD), bireysel ölçümlerin ortalama değere yayılımını ifade etmekte ve verilerin ortalama değerinden "ortalama" sapmasının istatistiksel ölçüsü olarak tanımlanmaktadır. SD, genellikle nispi bir şekilde ifade edilir. Bu yüzden hesaplamalar "Bağıl Standart Sapma değerine (RSD)" göre yapılır.

$RSD = SD / \bar{\bar{X}}$ ($\bar{\bar{X}}$: Örneklem ortalaması)

3.6. Farmasötik Analizlerde Analitik Tekniklerin Rolü

Yeni ilaçların keşfedilmesi, artık sadece kimyagerlerin hayal gücüyle değil, kimya, farmakoloji, mikrobiyoloji ve biyokimya bilimlerinin arasındaki multidisipliner yaklaşımla, fikir alışverişinin katkısıyla üretilebilmektedir (26).

İlaç geliştirme süreci; hastalıklarla savaşmak, kontrol altına almak, hasta olup olmadığını test etmek ya da tedavi değeri gösteren bir ilaç molekülünün icadı ile başlamıştır. Aktif farmasötik bileşenler (APIs-Active Pharmaceutical ingredients) olarak da adlandırılan bu tür moleküllerin sentezi, karakterizasyonu, bunların ön güvenlik ve tedavi etkinlik verilerini oluşturmak için yapılan daha detaylı araştırmalar; ilaç olmaya aday ilaçlarların tanımlanmasında ön koşuldur (27).

Farmasötik araştırma alanında; toplu ilaç malzemeleri, ara ürünler, ilaç ürünleri, ilaç formülasyonları, safsızlıklar, ilaçların bozunma ürünleri ve ilaç metabolitlerini içeren biyolojik numunelerin analitik olarak incelenmesi çok önemlidir. Resmi farmasötik analizin başlangıcından itibaren, aktif madde içeriğinin sınırlarını

belirleyerek, toplu ilaç malzemelerinin kalitesini karakterize etmek amacıyla, özet grup incelemeleri olan analitik tahlil yöntemleri bu çalışmalara dahil edilmiştir. Son yıllarda bahsi geçen grup inceleme tahlil yöntemleri, spektrometri, kromatografi, kılcal elektroforezi ve titrimetrinin yanı sıra, elektroanalitik yöntemlerdir.

Bir dosyayı değerlendirmek için kullanılan prosedür fikri mülkiyetin gizliliğini garanti eder. Dosya, katılan ulusal yetkili makamlar, ülkeler ve yönetim kurulu tarafından atanmış sertifika prosedürüne uygun aday uzmanlarca değerlendirilir (28).

United States Pharmacopoeia (USP, 2004) ve The European Pharmacopoeia and Council of Europe (Ph.Eur, 2002) kurumlarının verilerine dayanarak hazırlanan mevcut durumu gösterir Tablo 3.1 hazırlanmıştır (29).

Tablo 3.1. Ambalajlı ilaç malzemelerinin içeriğinin tayini için öngörülen çeşitli analitik yöntemlerin oranı (30).

Teknik	USP 27 (%)	Ph. Eur. 4 (%)
UV–Görünür Bölge Spektofotometrisi	8.5	9.5
Titrasyon	40.5	69.5
Gaz Kromatografisi	2.5	2
HPLC- Sıvı Kromagrafisi	44	15.5
Potansiyometrik	10	27
Sıvı olmayan çözeltiler	24	36.5
Sıvı Karışımlar	5.5	21
Redoks (Iyodometri, Azotometri, vb.)	5.5	6.5
Mikrobiyolojik analizler (antibiyotikler)	2.5	3
İndikator	4.4	6.5
Asit- Baz	29.5	57.5
Diğer (Atomic absorbsiyon, Spectroskopi, IR, Polarimetri NMR, Gravimetri, Fluorimetri, Polarografi vb.)	2	0.5
Diğer (Kompleksometri, Argentometri, vb.)	5.5	5.5

3.6.1. İlaç Analizinde Kullanılan Bazı Analitik Teknikler

- Titrimetrik Teknikler
- Kromatografik Teknikler **:**
  - İnce tabaka Kromatografisi
  - Yüksek performans ince tabaka kromatografisi (HPTLC)
  - Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)
  - Gaz kromatografisi
- Spektroskopik Teknikler:
  - Spektrofotometri
  - Yakın kızıl ötesi spektroskopi (NIRS)
  - Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR)
  - Florometri ve fosforimetri
- Elekrokimyasal metotlar
- Kinetik analiz yöntem
- Elektroforetik yöntemler
- Akış enjeksiyonu ve sıralı enjeksiyon analizi

3.6.2. İlaç Analizinde Spektrofotometrinin ve Uygun Analitik Yöntemin Rolü

İlaç analizinde önemli yer tutan önemli yöntem gruplarından biri, doğal UV emilimi ve kimyasal reaksiyonlara dayanan spektrofotometrik yöntemlerdir. Günümüzde, ilaç analizindeki ölçümler neredeyse sadece spektrofotometri ile gerçekleştirilmektedir (6). Spektrofotometri, bir maddenin dalga boyu işlevi olarak iletim veya yansıtma özelliklerinin kantitatif ölçümüne dayanır.

Kesinliği oldukça mükemmel olan bu yöntemlerin avantajları; düşük zaman ve işçilik tüketimidir. Özellikle ilaçların dozaj formunun analizinde uygulanan UV-Görünür Bölge spektrofotometrisinin kullanımı son yıllarda hızla artmıştır (7). Kolorimetrik teknikler genel olarak aşağıdaki hususlara dayanmaktadır:

- Kompleks oluşum reaksiyonu.
- Bir katalitik etki.
- Yükseltgenme indirgeme işlemi.

Türev spektroskopisi, nitel araştırma ve tahmin için dalga boyuna göre; absorbansın birinci veya yüksek türevlerinde kullanır. Türevlendirme spektral veri kavramının birçok avantaja sahip olduğu ilk kez 1950'lerde gösterildi. Bununla birlikte, ilk dönem teknikle üretilmiş UV-Görünür spektrofotometreler kullanılarak türev spektrumları, üretme karmaşıklığından dolayı çok az dikkate alınmıştır. 1970'lerin sonlarında mikrobilgisayarların yardımıyla matematiksel yöntemlerin UV-Görünür spektrofotometrelerde kullanımı ile spektrumların genellikle hızlı, kolay ve tekrarlanabilir bir sonuç üretmekte ikna edici oldu. Bu, türev tekniğinin kullanımını önemli ölçüde arttırdı. Türev yöntemi uygulamalarına olan ilgi, sadece UV spektrofotometrisinde değil, aynı zamanda kızılötesi spektrofotometrisinde, Floresans spektrometresi, atomik absorpsiyon (31), ve florimetride (32) karşılık bulmuştur (33). Türev spektrometresi kullanımı tekil durumlar ile sınırlı değildir, ancak normal spektrumun kantitatif çalışmaları zor olduğu gibi faydalı da olabilir. Dezavantaj, türev teknikleri ile de ilgilidir. Farklılık sinyal-gürültü oranında bir miktar formül veya düzenleme gerekir, böylece farklılık azalır (34).

3.6.3. Farmasötik Analizlerde Yakın Kızılötesi Spektroskopinin (NIRS) Analitik Yönteminin Rolü

Yakın kızılötesi spektroskopisi (NIRS), çok bileşenli analizlerde hemen her matriste hızlı ve tahribatsız bir işlemdir. Son yıllarda, Yakın kızılötesi spektroskopisi, ilaç endüstrisi içerisinde hammadde testi, ürün kalite kontrolü ve prosesin izlenmesinde geniş bir takdir kazanmıştır. Yakın kızılötesi spektroskopisi tekniğinin bazı üstünlükleri ve eksiklikleri verilmiştir.

Üstünlükleri sırasıyla:

- Ölçüm yapabilme ve sonuç elde etme süresi oldukça basit ve hızlıdır. Kısa zamanda analiz sonuçları hemen alınabilir.
- Numuneye ait farklı kimyasal ve fiziksel parametre bileşen analizlerinin validasyon parametreleri analizi aynı anda yapılabilmektedir.
- Az miktarda çözücü içindeki numune analiz için yeterli olacaktır. Numune yapısı bozulmadığından, istendiğinde numunenin daha sonra kullanılması mümkündür.

❖ Analiz esnasında kimyasal madde kullanılmayacağından, tehlike arzetmez. Bu yüzden, fazla kimyasal atık oluşmaz.

❖ Analiz esnasında laboratuar malzemesi ya da ekipmana gereksinimduymaz. Kullanım maliyetini düşüren bir faktör olduğundan ucuz bir yöntemdir.

Dezavantajları:

❖ Titrimetrik yöntem ve ince tabakakromatografisi gibi yöntemlere gore pahalı kabul edilebilir.

❖ Kalibrasyon modellerinin geliştirilmesinde çeşitli zorluklar vardır. Zaman alıcı olmasının yanı sıra referans analizlere bağımlıdır.

❖ NIRS cihazlarının kendi aralarındaki teknik farklılıklar yüzünden kalibrasyon yöntemleri transferinde sıkıntılar yaşanmaktadır (35).

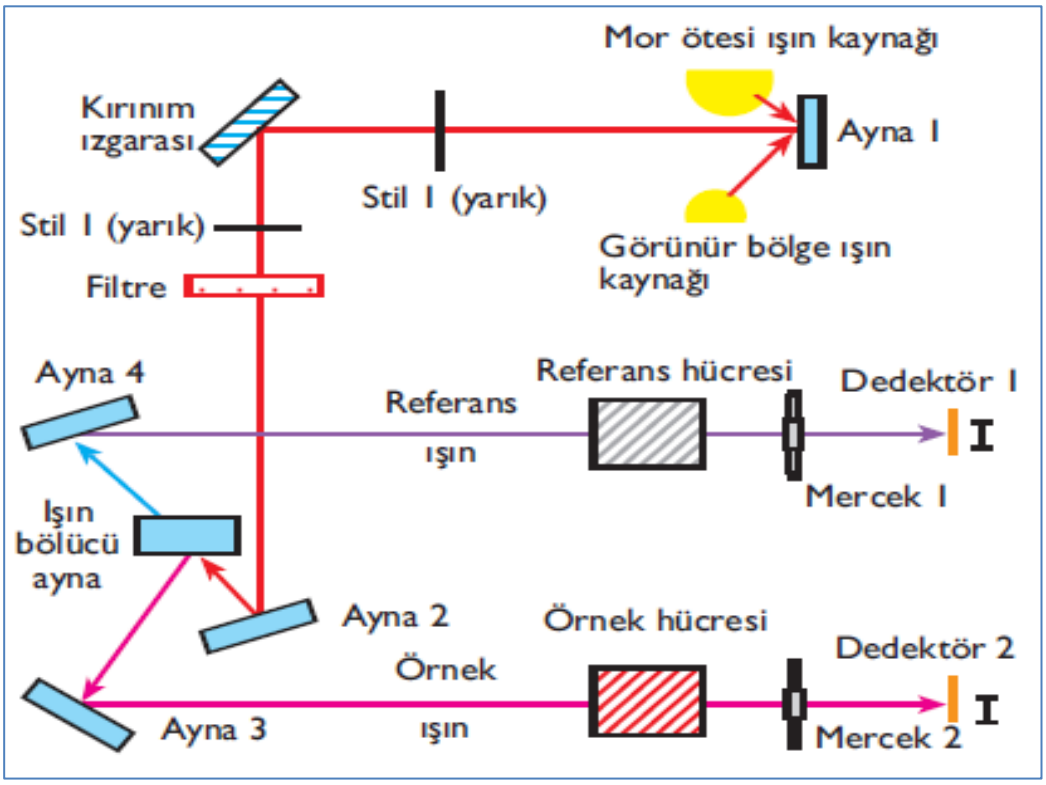
Ana farmakopeler, genellikle NIR spektrofotometri tekniklerini benimsemiştir. Avrupalı ve Birleşik Devletler farmakopeleri, NIR enstrümantasyonunun farmasötik testlerde uygulama için uygunluğunu vurgulanmıştır (36,37). Çok değişkenli veri analizi ile birlikte NIR spektroskopisi, farmasötik analizde hem kantitatif hem de kalitatif olarak ilginç algı yaratır. Sağlam tabletlerdeki etken bileşenin ölçümünde kantitatif NIR ölçümlerini gösteren çok sayıda yayın bildirilmiştir (38). Araştırma makalelerine ek olarak, NIR Spektrofotometrinin farmasötik analizde uygulanmasını gösteren birçok inceleme makalesi yayınlanmıştır (39).

3.7. Ultraviyole ve Görünür Absobsiyon Spektofotometresinin Teorisi

Absorpsiyon spektroskopisi, 200-750 nm dalga boyları aralığındaki ışığın, bir hücre içindeki çözeltinin absorbansının ölçümüne dayanmaktadır. Bir moleküldeki fonksiyonel grupları ve taşıyan bileşiklerin kalitatif analizinde yardımcı olmaktadır. UV-Görünür Bölge spektroskopisi çok sayıda organik ve inorganik bileşiğin analizinde kullanılmaktadır. Ultraviyole (UV) ve görünür (UV- Görünür bölge), konjuge çift bağlı bileşikler hakkında bilgi sağlar (40).

Ultraviyole ışık ve görünür ışıklar, bir elektronun bir yörüngeden diğerine, daha yüksek enerjiye (elektronik geçiş) geçiş için gerekli enerjiye sahiptir. Ultraviyole veya görülebilir bölgede bir molekül ışığı emecektir. Ultraviyole ışığı absorbe ettiği takdirde UV spektrumu elde edilir, görünür ışığı absorbe ettiği takdirde görünür bir spektrum elde edilir. Ultraviyole ışık, dalga boyu 180 ila 400 nm (nanometre)

arasında değişen elektromanyetik radyasyondur. Görünür ışığın dalga boyları, 400 ila 780 nm arasındadır (Bir nanometre veya 10 Å 'dur).



Şekil 3.6. Tipik spektrometre bileşenlerinin şeması.

Dalga boyu (λ) enerji ile ters orantılıdır, Dalga boyu kısaldıkça, enerji artar. Görünür ışık Ultraviyole ışığından daha küçük enerjiye sahiptir.

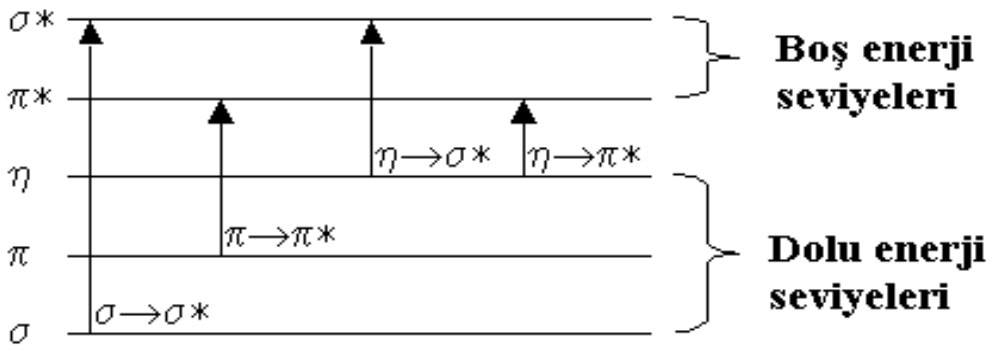
$E = h.c / \lambda$

c: Işık hızı

λ: Dalga boyu

h: Plank'ın sabiti

Ölçülen enerji seviyeleri arasındaki birçok geçiş türü, moleküler UV- Görünür spektrumunu oluşturur. Ultraviole - Görünür bölge spektroskopisi pek çok organik ve inorganik yapının tespitinde kullanılır.



Şekil 3.7 Elektronik geçiş seviyeleri ve geçiş durumları

En önemli elektronik geçişler şunlardır:

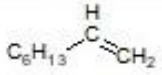
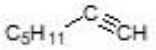
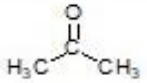
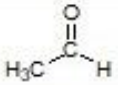
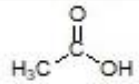
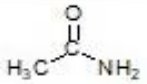
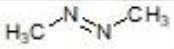
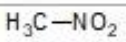
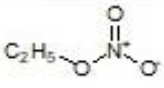
❖ **n→σ* Geçişleri:** Ortaklanmamış elektron çiftleri içeren yapılardaki (bağ yapmayan orbitalde bulunan elektronlar) gözlenmektedir. Genellikle, geçişler σ→σ* geçişlerine göre daha az enerji gerektirir ve absorpsiyon pikleri kahır ekseriyeti 150-250 nm aralığındaki bölgede yer alır.

❖ **σ→σ*Geçişleri:** Bir molekülde σ bağ orbitalindeki bir elektron, vakum UV bölgesindeki bir ışını absorplayarak antibağ orbitaline uyarılır, sonuç olarak σ→σ* geçişi meydana gelmiş olmaktadır. σ→σ* geçişleri için gereken enerji, diğer geçişlere nispeten oldukça yüksektir.

n→π* ve π→π* Geçişleri, 200-700 nm dalgaboyu aralığında absorpsiyon yaptıklarından Ultraviole - Görünür spektroskopisinde sıklıkla karşılaşılan geçiş türleridir. Her iki geçiş türüde, π* orbitallerini içerdiğinden doymamış fonksiyonel grup içeren organik bileşiklerde gözlenir. Başka bir söylemle ifade edilirse, bu doymamış absorplayıcı merkezler "kromofor" olarak adlandırılırlar (40).

Bu absorpsiyonlar için yaklaşık dalga boyu aralığının yanı sıra, bu geçişlere yol açan kısmi bir bağ, fonksiyonel grup veya molekül listesi Tablo 3.2'de gösterilmiştir. UV-Görünür bölgesindeki ışığın bir kısım dalgaboyunun absorbsiyonundan sorumlu belirli bir dalga boyunda absorblanmasından sorumlu olan organik bileşiklerin (Ketonlar, Aminler, Azot türevleri vb.) özel bağlarına veya fonksiyonel gruplarına "Kromoforlar" denir (41).

Tablo 3.2. Çok Sayıda Kromofor'un Absorbsiyon Etkisi

Kromofor	Örnek	Solvent	λ_{maks}, nm	ε_{maks}	Geçiş
Alken		n-Heptan	177	13000	$\pi \rightarrow \pi^*$
Alkin		n-Heptan	178 196 225	10000 2000 160	$\pi \rightarrow \pi^*$ - -
Karbonil		n-Heksan	186 280	1000 16	$n \rightarrow \sigma^*$ $n \rightarrow \pi^*$
		n-Heksan	180 293	büyük 12	$n \rightarrow \sigma^*$ $n \rightarrow \pi^*$
Karboksil		Etanol	204	41	$n \rightarrow \pi^*$
Amido		Su	214	60	$n \rightarrow \pi^*$
Azo		Etanol	339	5	$n \rightarrow \pi^*$
Nitro		İzooktan	280	22	$n \rightarrow \pi^*$
Nitrozo		Etil eter	300 665	100 20	- $n \rightarrow \pi^*$
Nitrat		Dioksan	270	12	$n \rightarrow \pi^*$

Spektrofotometrik yöntemlerin temeli, bir maddenin rengiyle elektronik yapısı arasındaki basit ilişkidir. Bir molekül veya bir iyonun radyasyonu, bir veya daha fazla kromoforik grup içeren moleküllerde elektronik bir geçişe neden olduğunda, görünür veya ultraviyole bölgesinde absorpsiyon sergiler. Bir molekülün rengi, absorbsiyon dalgasını, daha uzun dalga boyuna (bathochromic kayma) doğru değiştiren; oksokromik gruplar adı verilen ikame ediciler ile yoğunlaştırılabilir. Birçok moleküldeki renk belirleyici faktörler, konjuge çift bağların elektron verici veya elektron alıcı grupları vasıtasıyla verilmesidir (42).

Absorbsiyon yönteminin kantitatif uygulanabilirliği, absorbe edilen foton sayısının, atom, iyon veya moleküllerin sayısı veya konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğu gerçeğine dayanmaktadır. Absorpsiyon spektroskopisi, kantitatif analiz için farmasötik çalışanlarının kullanabileceği en kullanışlı araçlardan biridir.

Spektrofotometrik yöntemlerin önemli özellikleri ise şöyle sıralayabiliriz:

❖ Yüksek seçicilik: Bir numunedeki tek arsorbans bileşenin, tespit edilen madde olduğu bir dalga boyu bölgesini bulmak ile mümkün olabilir.

❖ Yüksek hassasiyet: Daha geniş bir aralıkta doğrusal kalibrasyon grafiklerinin olması. 10^{-2}–10^{-8} M konsantrasyon aralığındaki pek çok maddenin doğrusal kalibsayonu mümkündür.

❖ Geniş uygulanabilirlik: Çok sayıda organik ve inorganik maddenin ultraviyole ve görünür aralıklarda absorbe olabilir. Bu nedenle kantitatif tayin için hassasiyeti uygundur.

❖ Kolaylık ve rahatlık: Spektrofotometrik ölçümler modern cihazlarla kolayca ve hızlı bir şekilde gerçekleştirilebilirler (43).

3.8 Kimyasal analizlerde Lambert Beer Kanunu

Lambert-Beer yasası (Lambert-Beer -Bouguer yasası ya da sadece Beer yasası olarak da bilinir), absorbans ile elektromanyetik radyasyon emicisinin konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişkidir (44).

Genel Lambert-Beer yasası genellikle şöyle yazılır:

$$\mathbf{A = a_\lambda \cdot b \cdot c}$$

A : Ölçülen absorbans

a_λ : Dalgaboyuna bağlı bir absorbans katsayısı, birimi L/mol.cm

b : Yol uzunluğu,birimi cm

c : Analit konsantrasyonu, birimi mol/L

Konsantre molarite birimlerinde çalışırken, Beer-Lambert yasası şöyle yazılmıştır:

$$\mathbf{A = \varepsilon \, . \, b \, . \, c}$$

Beer-Lambert yasası, nicel analiz için değerli ve basit bir yöntem sunar. Pratikte, absorbansa karşı konsantrasyonun çizilmesi ile bir kalibrasyon eğrisi oluşturulur ve "X" absorbansıyla bilinmeyen konsantrasyon, kalibrasyon eğrisinde ölçülen absorbansa karşılık gelen konsantrasyonun bulunmasıyla belirlenir.

3.9. Literatür Taraması Özeti

Atorvastatin'in tayini için pek çok farklı teknik kullanılmıştır. Bu teknikler; biyolojik numuneler içerisindeki Atorvastatin miktarının belirlenmesi için Elektrospreyli tandem kütle spektrometreli yüksek performanslı sıvı kromatografisi (45, 46-47), Ekstraktif spektrofotometri (48), Sıvı Kromatorafisi (49-53), Yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (54), Gaz kromatografisi (55) ve Sıvı kromatografisi kütle spekrometresidir (56).

Bahsi geçen kromatografik yöntemler, ülkelerin kalite kontrol laboratuvarlarının genellikle çoğunda bulunan karmaşık ve yüksek maliyetli enstrümantasyon cihazları ile kullanılmaktadır. Spektrofotometri; basit işletme maliyet etkinliği, yeterince kabul edilebilen doğruluk, hassasiyet, kesinlik ve geniş kapsamlı uygulanabilirliği sayesinde yukarıda belirtilen gelişmiş kromatografi tekniklerine uygun bir alternatif teknik olarak hizmet verebilir.

Atorvastatin'in dökme ve farmasötik formülasyonlar için miktar tayini ile aralarındaki birkaç spektrofotometrik yaklaşım tarif edilmiştir.

Nevin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre (48), dökme ve farmasötik formülasyonlarında atorvastatin tayini için spektrofotometrik yöntemi tanımlamıştır. Yöntem atorvastatin ile bromo kresol yeşili, alizarin kırmızısı veya bromo fenol mavisi arasında optimum dalga boylarında ölçülebilen "iyon çifti kompleksi" reaksiyona dayanmaktadır. Beer kanununa göre; bromo kresol yeşili ile 5,0-53,0 pg/mL, alizarin kırmızısı 7,1-55,8 pg/mL ve bromo fenol mavisi 7,5-56,0 pg/mL arasındaki konsantrasyonlarda ölçüm alınabilmiştir. Atorvastatin, birinci mertebeden türev spektroskopi yönteminiyle 271,8 nm sinyalde 4,2-69,0 pg/mL konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu bulunmuştur.

Singh ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre, tablet formundaki Fenofibrat ve Atorvastatin Kalsiyum'un tahmini için UV-Görünür bölgede spektrofotometrik yöntemle kararlılığını ölçmüştür. Tablet formundaki dozlarında; Atorvastatin kalsiyum (ATOR) için dalga boyu (λ_{max}) 247 nm ve 6-16 µg/mL konsantrasyon aralığında, Fenofibrat (FEN) dalga boyu (λ_{max}) 287 nm ve 2-12 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusal olarak çalışmalarında bulunmuştur (57).

Amala ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre, UV-Görünür bölge spektofotometrisi'nde önerdiği yöntem ile dökme farmasötik formülasyon içindeki

Atorvastatin kalsiyumu analiz etmiştir. Atorvastatin kalsiyumun maksimum dalgaboyu olarak 244 nm ve 5 ila 25 μg/mL konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu bulmuştur (58).

Quinalizarin; kromojenik-renkli şelat üretme kabiliyeti-özelliği sayesinde, farklı metal iyon konsantrasyonlarının belirlenmesinde iyi bir reaktif olmasını sağlamıştır. Bu uygulamanın birçok örneği, Alüminyum (59), Bor (60), Uranyum ve Molibden (61) ve tespiti için 1950'lerin başından beri rapor edilmiştir. Günümüzde, biyolojik numunelerde ve suda Talyum ve Manganez tahmini için, Quinalizarinin kompleksleşme reaksiyonuna dayanan bir spektrofotometrik yöntem uygulanmıştır (2,3).

Biyolojik olarak parçalanamadığı ve suda yaşayan organizmalar için çok toksik olduğundan için birçok Tekstil endüstrisindeki atık sularda bir çeşit kirletici madde olarak ölçülmüştür. Quinalizarin, kendine özgü kimyasal özelliklerinden dolayı asimetrik bir kimyasal yapı sunan birçok tetrahidroksiyantrakinon izomerinden biridir. Bir asit-baz indikatörü olarak; Nötr/asidik çözeltide turuncu, zayıf bazda mavi, güçlü bazda ise mor renkleri verir, bu nedenle sırasıyla bir veya iki hidroksil grubunun deprotonasyonunu gösterir (62).

Farmasötik tabletlerde iki antiepileptik (pregabalin ve gabapentin) tayini için yine spektrofotometrik bir yöntemle elde edilmiştir (63). Ayrıca kanser araştırmalarında, çeşitli tümör hücrelerinde (meme kanseri) (64), prostat kanserinde (65), lösemi T hücrelerinde (66) ve anjiyogenezde (67) etkili olarak kullanılmıştır. Gansiklovir'e (antiviral bir ilaç) duyarlı ve Gansiklovir sitomegalovirüs'e dirençli insanlarda, umut verici bir ilaç örneği olduğu öne sürülmüştür (68). İnsan periferal kan mononükleer hücrelerinde, HIV'in büyümesini inhibe ettiği bildirilmiştir (69, 70). 2009'da yapılan çalışma ile quinalizarin, bilgisayar destekli sanal tarama ve biyokimyasal değerlendirme yoluyla protein kinaz CK2'nin güçlü ve seçici bir inhibitörü olarak tanımlandı ve HEK-293 ve Jurkat hücrelerinin <5 μM konsantrasyonlarında, endojen CK2'yi inhibe edebilen bir hücre geçirgen bileşik olduğu gösterilmiştir (66).

Yük transfer komplekslerinin bir özelliği, kompleksin birleşme sabitinin artan sıcaklıkla azalmasıdır. Bunun etkisi kompleksin ortaklarını şaşırtan termal hareketlerden kaynaklanmaktadır. Mulliken ayrıca, bir elektron verici-Donör (D) ve

bir elektron alıcı-akseptör (A)'dan oluşan bir moleküler kompleks içindeki yük transferi etkileşimlerinin, D'den A'ya bir yük transferiyle bir rezonans içerdiğini göstermiştir (71,72):

$$D + A \leftrightarrow D^{+} A^{-} \leftrightarrow D^{+} + A^{-}$$

(kompleks) (radikal anyon)

Yük transferi kompleksi şu anda biyokimyasal, biyoelektrokimyasal enerji transferi sürecinde (73), biyolojik sistemler, ve ilaç-reseptör bağlama mekanizmasında, örneğin ilaç etkisi, enzim katalizinde, lipofilik membranlar yoluyla iyon transferlerinde (74) ve bazı alıcılar, kimi ilaçların saf formlarında veya farmasötik preparasyonlarında ve farmasötik analizlerinde başarıyla kullanılmıştır (75). Son zamanlarda, çeşitli ilaç türleri ile çeşitli bileşiklerde ve farklı elektron alıcıları ile bağlantılı bileşikler arasındaki hızlı etkileşimler konusunda geniş kapsamlı raporlar bildirilmiştir (76). Öte yandan, elektron verici-alıcı (Electron Donor acceptor-EDA) etkileşimi, lineer olmayan optik malzemeler ve elektriksel iletkenlikler (77), ikinci dereceden lineroptik olmayan aktivite (78), mikro emülsiyon, yüzey kimyası (79), foto katalizörleri (80), dendrimerler (81), güneş enerji depolaması (82), organik yarı iletken (83), redoks süreçleri çalışmalarının (84) yanı sıra, birçok uygulama alanında büyük önem taşımaktadır. Organik türleri kullanan Yük transfer komplekslerinin özel etkileşimlerinden dolayı, yoğun olarak incelenir, ki bu bir elektronun donörden alıcıya aktarılmasının eşlik eder (85, 86). Ek olarak, asidik alıcılardan donörün protonlanması, genellikle iyon çifti katma oluşumunun bir yoludur (87, 88).

Kolorimetrik yöntemlerin, dökme malzemelerin tahlili için düzenli olarak kullanıldığını belirtmek önemlidir. Örneğin, mavi tetrazolyum tahlili kortikosteroid ilaç formülasyonlarının belirlenmesinde kullanılır (89). Kolorimetrik yöntem; ayrıca kardiyak glikozitlerin belirlenmesi için de kullanılır ve raporlar Avrupa Farmakopesine sunulur. Dökme ilaç ve formülasyonlardaki malzemelerin aktif farmasötik bileşenlerin belirlenmesi için spektrofotometri kullanan çeşitli yaklaşımlar bildirilmiş ve bu yöntemlerin detayları Tablo 3.3'de gösterilmiştir.

Tablo 3.3. Bazı ilaçların farmasötik formülasyonlardaki UV-Görünür spektrofotometrik prosedürlerle kantitatif analizi.

İlaç Etken Maddesi	Reaktif	λmax	Referans
Amiodaron hidroklorit	p-Kloroanilik asit	535	(90)
Aripiprazol	İyoodin	400	(91)
Gansiklovir	Quinalizarin	560	(92)
Bifonazol	3,4-Diaminotoluen	457	(93)
Bifonazol	2,5-Dikloro-3,6-dihidroksi-benzokinon	517	(93)
Desloratidin	Alizarin Kızıl S (ARS)	528	(94)
Desloratidin	Quinalizarin	560	(94)
Dutasterit	Kloranil	525	(95)
Gabapentin (GAB)	Alizarin Kızıl S (ARS)	572	(96)
Gabapentin (GAB)	Quinalizarin	571	(96)
Klotrimazol (CLZ)	Tetrasiyanoetilen (TCE)	396	(97)
Klotrimazol (CLZ)	7,7,8,8 Tetrasiyanokinodimetan	842	(97)
Modafinil	2,4-Dinitrofenol	475	(98)
Modafinil	1,2-Naftokinon-4-sulfonate	430	(98)
Parasetamol	m-Cresol	640	(99)
Pregabalin (PRG)	Alizarin Kızıl S (ARS)	538	(96)
Pregabalin (PRG)	Quinalizarin	528	(96)
Pregabalin (PRG)	Ninhidrin	402.6	(100)
p-Nitroanilin	Kloroanilik asit	530	(101)
Rasagilin mesilat	Bromotiymol Mavi	414	(102)
Rasagilin mesilat	Bromokresol Yeşil	414	(102)

Ayad ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya (103) göre; yük transferinin moleküler kompleksleri polar olmayan çözücülerde oluşturulurken, radikal anyon türleri polar çözücülerde baskındır. Ayrıca, yalnız bir çift elektron içeren bazik bileşiklerin eklenmesi ile atorvastatin gibi (n–π) tipi yük transfer komplekslerinin oluştuğu sonucuna inanılmaktadır. Bu tip kompleksler, polar çözücülerde radikal anyon oluşturan "ara moleküler birleşme bileşiği" olarak ölçülebilir. Bu durumda, radikal anyonlar toplam yük transferinden kaynaklanmaktadır.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Cihaz

Tüm absorpsiyon spektral ölçümleri, Spektral band genişliği, 1 nm'den daha iyi (190~900 nm) olan, 1 cm eşleştirilmiş kuvars hücreli UV-1800 çift ışınlı spektrofotometre (Shimadzu Ltd.) kullanılarak yapılmıştır. Katı olan yük transfer ürünleri için kızılötesi spektrumları, Agilent marka Cary 630 FTIR model cihazında 4000-650 cm^{-1} aralığında kaydedildi.

4.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Metanol…….	: Merck, Almanya
Etanol……...	: Merck, Almanya
Asetonitril…….	: Merck, Almanya
Ultra Saf Su……..	: Panreac, İspanya
Kloroform……....	: Merck, Almanya
Aseton……	: Merck, Almanya
Quinalizarin…….	: Sigma Aldrich, Almanya
Pikrik Asit…….	: Merck, Almanya
2, 3 Dikloro 1, 4 Naftokinon	: Merck, Almanya

Bu çalışmada kullanılan tüm kullanılan çözücüler analitik derecedeydi.

Atorvastatin referans standardı olarak kullanılan dökme toz, Abdi İbrahim İlaç San.ve Tic.A.Ş.- Türkiye tarafından sağlanmıştır. Üreticinin yöntemine göre, saflığı % 92,39 olarak bulundu. Kullanılan Cholvast tabletleri (Biofarma ürünü, Türkiye), tablet başına 10 mg Atorvastatin farmasötik dozaj formu, etiket içerikli ticari kaynaktan alındı.

4.2.1. Standartların Hazırlanması

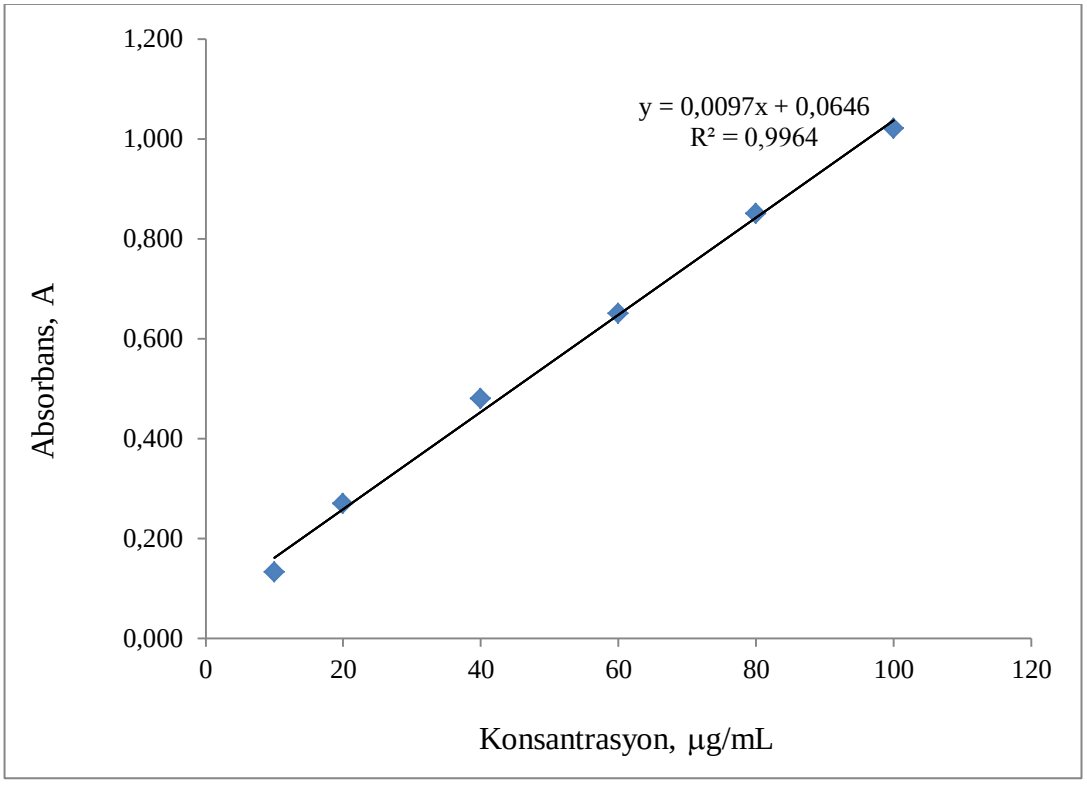
Analizde kullanılacak standart Atorvastatin, Metanol içerisinde çözülerek nihai konsantrasyon 500 μg/mL olacak şekilde ilacın standart bir stok çözeltisi hazırlandı.

4.2.2. Reaktif Çözeltilerinin Hazırlanması

Quinalizarin, Pikrik Asit ve 2, 3 Dikloro 1, 4 Naftokinon reaktif çözeltileri konsantrasyonları 0,5 mM olacak şekilde, toplam olarak 100 mL hacimsel balonlar içerisinde hazırlandı.

4.3. Kalibrasyon Eğrisinin Çizimi

Standart çalışma çözeltileri 10-100 µg/mL aralığında, 10 mL'lik balon jojelerde hazırlanmış, daha sonra 3 mL (0,5 x 10^{-3} M) kromojenik reaktif olan Quinalizarin çözeltisi ilave edilmiştir. Daha sonra elde edilen karışım, reaksiyonun teşvik edilmesi için çalkalandı ve hacim, metanol ile 10mL ye tamamlandı. Balon jojeler, oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi, ardından mor renkli ürünün 573 nm'de emilimi, sadece Quinalizarin reaktifini içeren boş bir reaktife karşı ölçülmüştür. Atorvastatin nihai konsantrasyonuna (µg/mL) karşı, absorbans (A) verilerini kullanarak doğrusal bir regresyon doğrusu grafiği (Şekil 4.1) yapıldı. Bilinmeyen bir örnekteki atorvastatin miktarını, ilgili regresyon denklemi veya kalibrasyon eğrisinde absorbansa karşılık gelen konsantrasyon hesaplandı.



Şekil 4.1. Atorvastatin'in kalibrasyon eğrisi.

4.4. Yük Transfer Kompleksinin Stokiyometrisi

Atorvastatin ve quinalizarin reaktifi arasında oluşan yük transfer kompleksi stokiyometrik oranları Job'un yöntemine (104) atfedilebilen ve Vosburgh ve Coober (104) tarafından değiştirilen, sürekli varyasyon yöntemi uygulanarak belirlenir. Maksimum absorbansın optimum dalga boyunda, Job'un sürekli varyasyon yöntemi uygulandı. $0{,}5x10^{-3}$ M Atorvastatin standart çözeltisi ve $0{,}5x10^{-3}$ M quinalizarin reaktifi çözeltisi kullanıldı. Reaktif ve ilaç toplam hacmi, 10 mL'de tutuldu. Farklı ilaç ve reaktif oranları karıştırarak, üzerinede çözücü olan metanol ile toplam hacmi kalibre edilmiş balon jojelerde 10 mL'ye tamamamlanarak, seri çözeltiler hazırlandı. Optimum dalga boylarında; oluşan çözeltilerin absorbsiyonu, benzer şekilde hazırlanmış reaktif içeren kör çözücüye karşı ölçülmüştür.

4.5. Farmasötik Formülasyonlarda (Tabletlerde) Uygulama

Tablet başına 10 mg Atorvastatin içerecek şekilde etiketlenmiş Cholvast tablet formülasyonu yerel bir eczanedan satın alınmıştır. Her bir tabletin kütlesi bağımsız olarak ölçülmüş (her bir tablet için ortalama 152 mg) ve 10 adet tabletin bir agat yardımıyla toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilmiş örnekten, 50 mg atorvastatin'e eşdeğer bir kısmı hassas terazide tartıldı ve 50 mL'lik bir balon jojeye aktarıldı. Üzerine 30 mL metanol eklendi ve karışım 2 dakika çalkalandı. Daha sonra 10 dakika ultrasonik banyoda katı patiküllerin iyice çözünmesi sağlandı. Bu çözelti, çalışma konsantrasyon aralıklarını elde etmek için uygun oranda metanol ile seyreltildi. Çalışma konsantrasyon aralıklarını kapsayan çözeltiler, 10 mL'lik hacimli vial şişelere aktarıldı ve önerilen yöntem uygulandı. Tabletlerin nominal içerikleri, absorbansları yardımıyla korelasyon eşitliği veya kalibrasyon grafiği kullanılarak belirlendi. Farmasötik formülasyondan (Cholvast tabletlerden) atorvastatin analizi için geliştirilen işlem uygulandı.

4.6. Katı Yük Transfer Kompleksini Sentezleme

Atorvastatin ilacının, quinalizarin reaktifinin ve bunların karışımı olan reaksiyon ürününün (kompleksin) kızılötesi spektrumları bölgesinde geçirgen olduğu bilinen alkali halojenürlerden olan potasyum bromür ile topakları olarak kaydedildi. Bu amaçla, her bir bileşikten yaklaşık 10 mg alınıp, 100 mg Potasyum bromür ile

karıştırıldı ve bir pelet elde etmek için basınçlandı. Daha sonra topak, spektrometreye aktarıldı ve spektrumlar, nominal çözünürlüğü 8 cm^{-1} olan, 4000-650 cm^{-1} aralığında kaydedildi.

Katı yük transfer kompleksinin (reaksiyon ürünü) sentezi için. İki ayrı şişede atorvastatin ve quinalizarinin eşit moldeki doygun çözeltileri metanol çözücü içinde karıştırılarak hazırlandı. Berrak bir çözelti elde edildikten sonra, düşük sıcaklık ve basınçta, çözücü tamamen uçuruldu. Elde edilen katı ürün preparasyon potasyum bromür ile oluşturulan topak ile infrared spektrumu alındı.

5. BULGULAR

5.1. Absorbsiyon Spektrumu

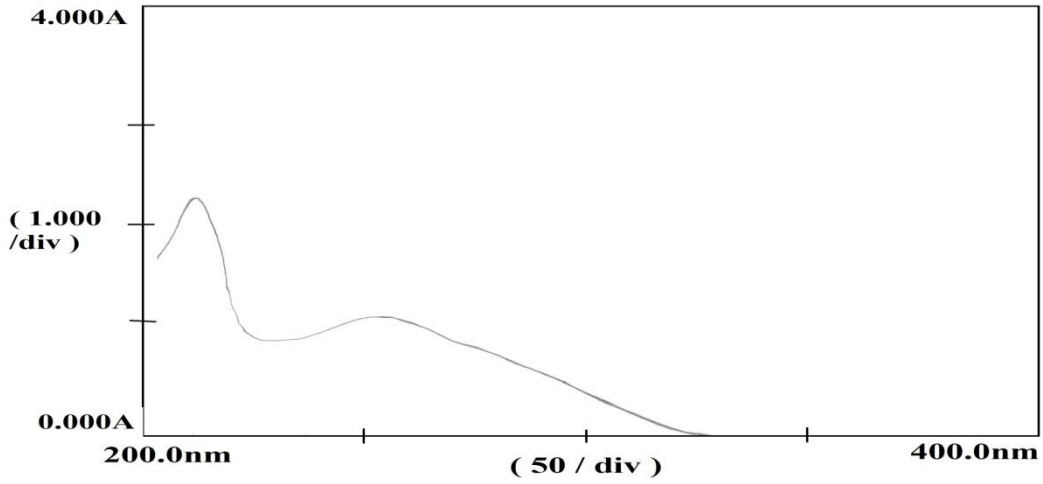
Atorvastatin ilacının tespiti için Quinalizarin reaktifi kullanıldı. Prosedür, reaktifin metanollü ortamda, Atorvastatin ile yük transfer kompleksi oluşumu reaksiyonuna bağlıdır. Reaksiyon, spektrofotometrik olarak ölçülebilen, renkli bir yük transferi ürün oluşumu ile ilerler.

Farmasötik formülasyonlarda ve dökme tozda atorvastatin tayini için Quinalizarin ile yük transfer reaksiyonunu inceleyen yöntemin, geliştirilmesi ve incelenmesi iki adımda gerçekleştirilmiştir:

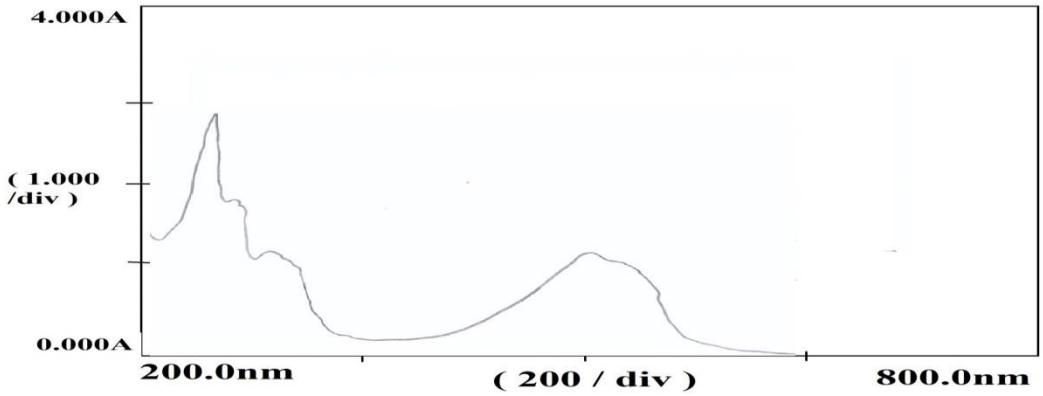
(a) Hem maksimum hassasiyet hem de seçicilik elde etmek için deney koşullarının optimizasyonu. Bu adım, çözücü yapısının etkisinin değerlendirilmesini, reaktif konsantrasyon etkisinin araştırılmasını ve reaksiyonu tamamlamak için gereken sürenin değerlendirilmesini içerir.

(b) Önerilen reaksiyon mekanizmasının doğrulanması ile gerçekleştirilen reaksiyonun incelenmesi ve Reaksiyonun (Job'un sürekli değişim yöntemi) stokiyometrisinin değerlendirilmesi.

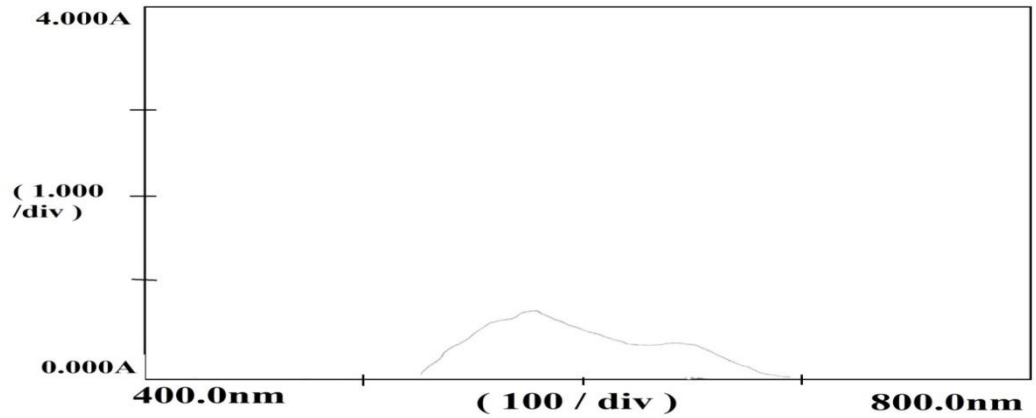
Optimum koşullarda, radikal anyonlar (absorblayan türler) reaktifin karıştırılmasından sonra metanol ortamında oluşturulmuş ve 573 nm'de maksimum absorpsiyon göstermiştir (Şekil 5.3). Bu nedenle, önerilen yöntem için en yüksek hassasiyeti elde etmek amacıyla tüm diğer ölçümler bu dalga boyu kullanıldı. Metanolde, Quinalizarin 490 nm'de maksimum absorbans değeri veririken, Atorvastatin 248 nm'de maksimum absorbans değeri vermektedir (Şekil 5.1, 5.2). Yük aktarma kompleksi ürününün absorbans değeri ile reaktifin absorbans bandı arasındaki yüksek fark (83 nm), ortamın içine fazladan ilave edilen reaktifin sadece küçük bir katkısı ile olduğu düşünülmektedir.



Şekil 5.1. Metanole karşı Atorvastatin'in absorpsiyon spektrumu (25 µg/mL)



Şekil 5.2. Metanole karşı Quinalizarin'in absorbsiyon (0,5 x 10^{-4} M)



Şekil 5.3. 1 mL Quinalizarin (0,5 x 10^{-4} M) ile 25 µg/mL Atorvastatin'in yük transfer kompleksinin absorbsiyon spektrumu

5.2. Deney Çalışması Koşullarının Optimizasyonu

Atorvastatin'in kantitatif tayininde; oluşturulan yük transfer kompleksinin çok yoğun bir renk vermesi ve maksimum renk gelişimini sağlamak için en uygun koşulları sağlamak amacıyla denemeler yapılmıştır. Aşağıdaki değişkenlerin her birinin reaksiyon üzerindeki etkisi test edilmiştir.

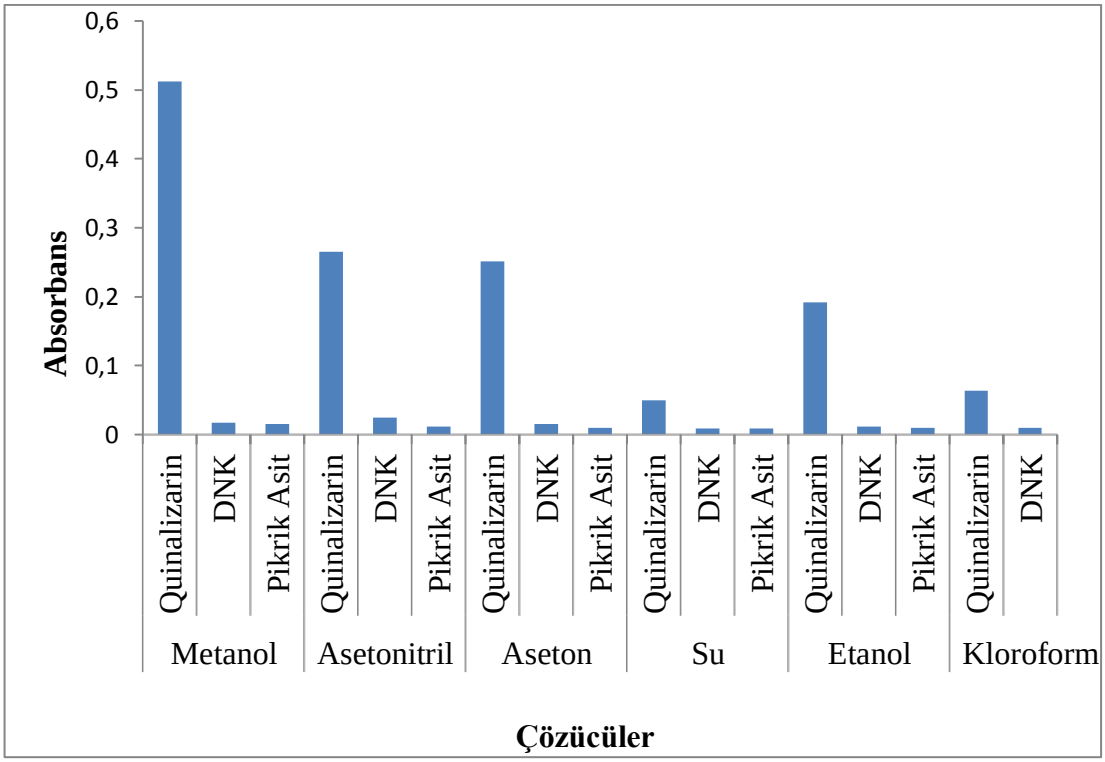
5.2.1. Çözücü Etkisi

Deney koşullarının optimizasyonunda değerlendirilen ilk parametre kullanılan çözücünün etkisidir. Bazı yük transfer reaksiyonlarında çözücü önemli bir rol oynar. Çünkü; toplam yük transferini kolaylaştırabilmesi ve daha sonra absorbsiyon verebilen tür olan radikal anyonun, dengelenmesine ve son olarak kompleksin ayrışmasına izin vermesi gerekir.

Dielektrik sabiti yüksek çözücüler; hem iyi çözen, hem de radikal anyonların ayrışmasında etkili olabilendir (104). Bu gerçeği hesaba katarak, 6 farklı çözücü ile deneme yapıldı. Su, metanol, etanol, aseton, asetonitril ve kloroform ortamında 3 farklı reaktif olan Quinalizarin, Pikrik Asit ve 2, 3 Dikloro 1, 4 Naftokinon (DNK) ile kompleksleşme reaksiyonu denendi. Tablo 5.1'de görüleceği üzere en yüksek dielektrik katsayısı, su ve asetonitril olmasına rağmen, en hassas sonuç metanol ile alındı (Şekil 5.4). Muhtemelen, radikal anyon ile hidrojen bağları oluşturma yüksek kapasitesi nedeniyle Metanolün, diğer çalışmalarımızda çözücü olarak kullanılmasına karar verildi.

Tablo 5.1. Çözücülerin Dielektrik Sabitleri (105)

Çözücüler	Dielekrik Sabiti, ε_r
Su	80
Metanol	32,60
Etanol	24,55
Aseton	21,40
Asetonitril	38,60
Kloroform	4,80



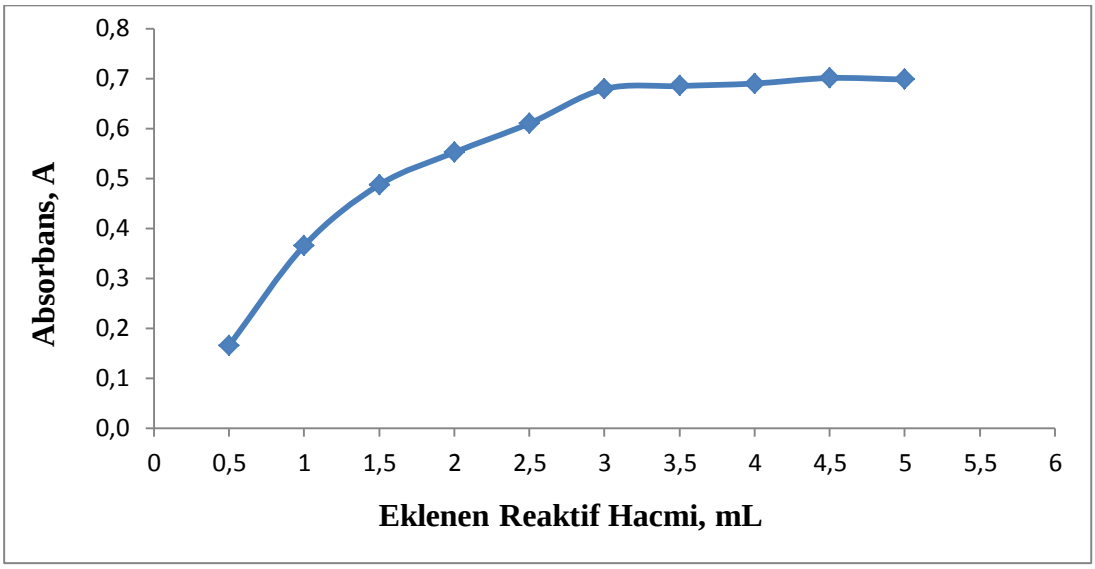
Şekil 5.4. Çözücü etkisini göstermek için; farklı çözücülerde çözünmüş Atorvastatin ile 3 farklı reaktifin sırasıyla oluşturdukları yük transfer komplekslerininin absorbsiyonları.

Atorvastatin konsantrasyonu= (75µg/mL), 1mL reaktif konsantrasyonları=(0,5mM).

5.2.2. Reaktif Konsantrasyonunun Etkisi

Maksimum hassasiyetin istendiği spektrofotometrik analitik yöntemlerde, çözeltideki reaktif konsantrasyonu, incelenmesi gerekli önemli bir parametredir. Çünkü; analitin, absorbe edici türlere maksimum dönüşümü, çözeltide mevcut reaktif miktarına ve ilgili dengeye bağlıdır. Bu amaca ulaşmak için; atorvastatin'in hacmi 1,5 mL olarak sabit tutulmuş (75µg/mL), üzerine hacmi artırılarak quinalizarin reaktif çözeltisinden ($0{,}5x10^{-3}$ M) ilave edilmiş, geri kalan kısmı çözücü olarak seçilen metanol eklenmesiyle (Tablo 5.2) toplam hacmi 10 mL olacak şekilde, oluşan yük transfer kompleksinin absorbansı ölçümü yapılmıştır (Şekil 5.5). Sonuçlara bakıldığında, ($0{,}5x10^{-3}$ M) reaktif çözeltisinden 3 mL ilavesinin rengi tam olarak istenen yoğunluğa getirmek için yeterli olduğunu görüldü. Şekil 5.5'de görüleceği üzere, absorbansta dikkate değer bir artış, 3 mL'ye kadar devam ederken, bu

noktadan sonra ilave edilen reaktif miktarının, absorbansı çok hafif arttırdığı ve sabit kaldığı görülmektedir.



Şekil 5.5 Reaktif ve Atorvastatin arasında oluşan yük transfer kompleksinin optimum dalga boyunda Quinalizarin hacminin Absorbans'a etkisi.

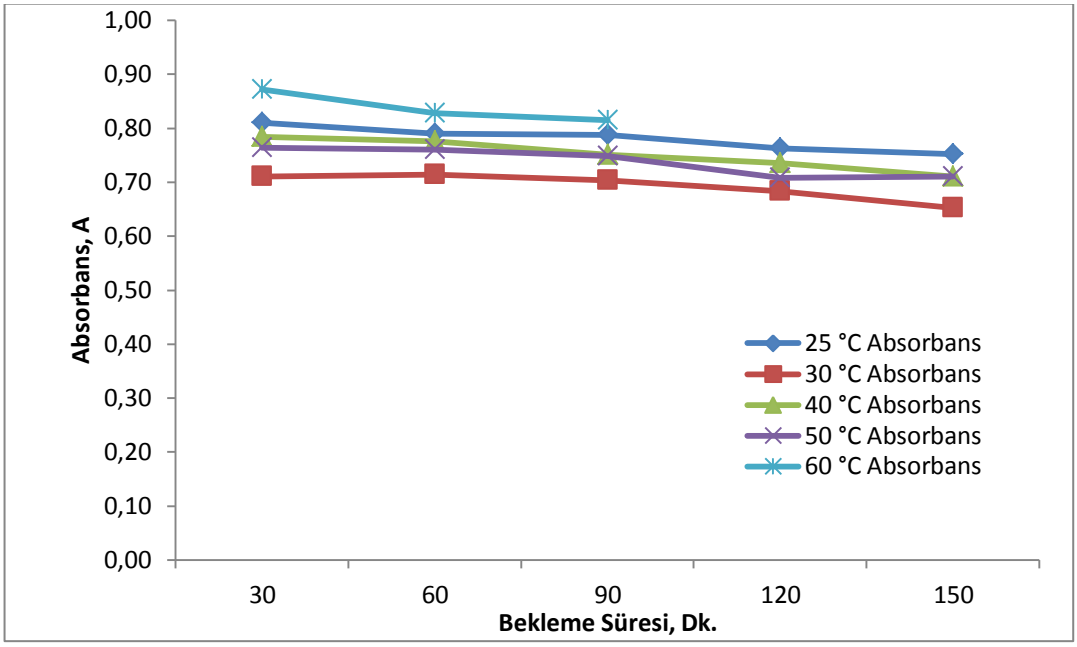
Tablo 5.2. Reaktif konsantrasyon etkisi deneyinde yük transfer kompleksi ve kör numunesinin hazırlanması

573 nm'de Reaktif Konsantrasyon etkisi						
Atorvastatin-Quinalizarin YTK Hazırlama					Kör Hazırlama	
No	500µg/mL Atorvastatin miktarı (mL)	$0,5x10^{-3}$ M Boyar madde miktarı (mL)	MeOH miktarı (mL)	Absorbans	$0,5x10^{-3}$ M Boyar madde miktarı (mL)	MeOH miktarı (mL)
1	1,5	0,5	8	0,165	0,5	9,5
2	1,5	1	7,5	0,365	1	9
3	1,5	1,5	7	0,487	1,5	8,5
4	1,5	2	6,5	0,552	2	8
5	1,5	2,5	6	0,610	2,5	7,5
6	1,5	3	5,5	0,679	3	7
7	1,5	3,5	5	0,685	3,5	6,5
8	1,5	4	4,5	0,690	4	6
9	1,5	4,5	4	0,701	4,5	5,5
10	1,5	5	3,5	0,698	5	5

5.2.3. Bekleme süresi ve Sıcaklık Etkisi

Optimum reaksiyon süresi, son hacimdeki konsantrasyonları 75 µg/mL atorvastatin ve 1,5 x 10^{-4} M quinalizarin reaktifinden oluşan bir çözeltinin optimum dalga boyundaki absorbansının, ortam sıcaklığının arttırılarak sürekli izlenmesi ile belirlendi. Sıcaklığın yükselmesi üzerine, yük transfer kompleksinin absorbansı, hipokromik bir kayma ile hafifçe azalırken, 60 °C'de çözücü olan metanol'ün uçması sonucu ölçüm alınamadığından deney sonlandırıldı. Denemenin başlangıç noktasından itibaren her 30 dakikada bir absorbansı ölçülmüş, absorbans değerlerindeki azalma devam etmiş, 150 dakika sonra absorbans düşmesi devam ettiği için deney burda sonlandırılmıştır (Şekil 5.6).

Bu deney ölçümlerinin sonucunda, tüm spektral ölçümlerin 25°C sıcaklıkta ve reaktifle atorvastatinin karıştırılmasından sonra bekleme süresinin 30 dakika olarak optimum nokta olarak belirlenmesine karar verildi (Tablo 5.3).



Şekil 5.6. Atorvastatin ile quinalizarinin reaksiyonunda absorbansa, zamanın ve sıcaklığın etkisi

Tablo 5.3. Reaksiyonun optimum koşulları

Optimum Koşullar	Değer
Sıcaklık (ºC)	25 ± 2
Bekleme Süresi (dakika)	30
Reaktif hacmi (mL)	3

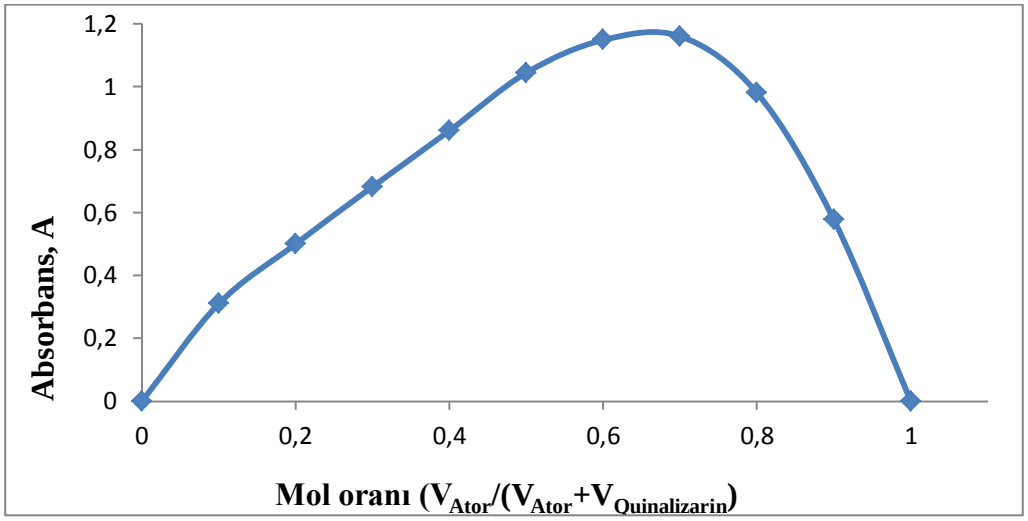
5.2.4. pH Etkisi

Deney çalışmamızda atorvastatin'in çözücüsü olarak kullandığımız methanol (≥ % 99,9) yüksek saflıkta olduğu için ve ortamda hemen hemen hiç su bulunmadığından pH ölçümü yapılamadı.

5.3. Yük Transfer Kompleksinin Stokiyometrisi

Job'un sürekli varyasyon yöntemi (106), metanol ortamında yük transfer reaksiyonunu stokiyometrisini belirlemek için kullanıldı. İncelenen atorvastatin ilacının ve quinalizarin reaktifinin, karışımdaki ilacın ve reaktifin konsantrasyonunun oranı değişirken, molar konsantrasyonlarının toplamının sabit tutularak optimum dalga boyunda, karışımların absorbansları hazırlanan uygun bir kör çözeltiye karşı deneyin her noktası için ölçüm yapılmış (Şekil 5.7) gösterildiği gibi, π-alıcı reaktifi ile reaksiyonunda en iyi absorbansı sağlayan (atorvastatin:quianalizarin) molar oranı; 0,7 olmuştur.

Bu reaksiyon sonucunda mekanizma göz önüne alındığında, atorvastatin içinde var olan karbon atomundaki serbest elektronun, quinalizarin molekülünün eksik yük pozisyonuna transfer edilmiş olduğu kabul edildi.



Şekil.5.7. Atorvastatin ile quinalizarin arasındaki Job'un sürekli varyasyon yöntemi.

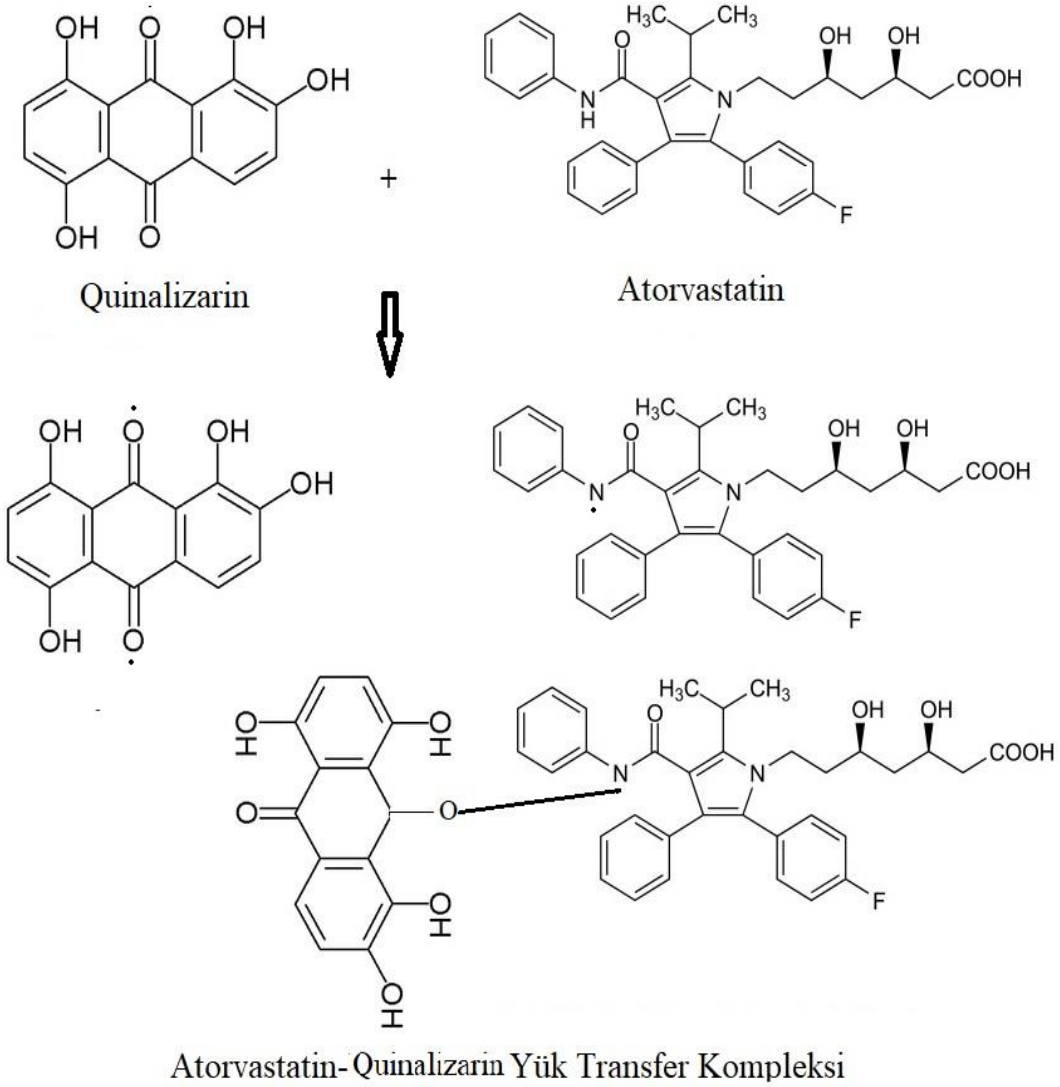
İlaç – reaktif kompleksine ait ML_y değerindeki, y değerini belirlemek için kesişme noktasındaki ilaç mol oranını kullanabiliriz (107).

$y = (n_{ATOR}/n_{Quin}) = (X_{ATOR}/X_{Quin}) = (X_{ATOR}/1 - X_{Quin})$

Buna gore; kompleks ligand oranı ML_3 olarak belirlenmiştir.

5.4. Yük Transfer Kompleks Reaksiyonunun Mekanizması

Metanolde çözülmüş quinalizarin reaktifinin çözeltisi, 490 nm'de iyi tanımlanmış bir maksimum ile bir absorbsiyon bandı sergilerken, metanol içindeki atorvastatin çözeltisi, 400-700 nm aralığında hiçbir absorbans göstermedi. Metanolde çözülmüş reaktif çözeltisine, atorvastatin eklenmesi sayesinde yeni bir karakteristik bandın ortaya çıkmasıyla, optimum dalga boyunda maksimum absorpsiyon spektrumunda hemen bir değişikliğe neden oldu ve yük transfer reaksiyonuna göre atorvastin ile quinalizarin arasında oluşan kompleksin reaksiyonunun Şekil 5.8'deki olduğu düşünülmektedir.



Şekil 5.8. Quinalizarin ile Atorvastatinin reaksiyonu

5.5. Validasyon Yöntemi

Önerilen yöntemin validasyonu; linearite, hassasiyet, doğruluk, hassasiyet, sağlamlık, kesinlik, tespit edilebilme ve nicelendirme limitlerinin değerlendirmesini içeren çalışmamız "Uluslararası Uyumlaştırma Konferansı" kurallarına (23) göre test edilmiştir.

5.5.1. Linearite

Uluslararası Uyumlaştırma Konferansı kararları (23) yöntemi kullanılarak doğrusal regresyon denklemi elde edildi. Atorvastatin için belirtilen konsantrasyon aralığında yöntem, korelasyon katsayısının doğrusal olduğunu gösterdi. Verilerin lineer korelasyon analizi sonucunda, aşağıdaki denklem bulunmuştur.

$A = 0{,}0097\ X + 0{,}0646$

A'nın absorbans olduğu yerde, X ilacın konsantrasyonu (µg/mL) göstermektedir.
Diğer istatistiksel parametreler de hesaplanmış ve Tablo.5.4' de verilmiştir.

Tablo 5.4. Önerilen yöntemle Atorvastatin tayini için analitik parametreler.

Parametreler	Değer
Dalgaboyu (λ maks)	573
Konsantrasyon aralığı (µg/mL)	10-100
Korelasyon katsayısı (r^2)	0.9964
Korelasyon denklemi	y=0,0097x+0,0646
Eğim	0,0097
Kayma değeri	0,0646
Tayin Limiti (µg/mL)	1,49
Ölçüm Limit (µg/mL)	4,98
Molar absorptivite (L/mol .cm)	$6{,}05 \times 10^3$

5.5.2. Dedeksiyon Limiti (LOD) ve Tayin Limiti (LOQ)

Uluslararası Uyumlaştırma Konferansı kararları (ICH) (23) yöntemine göre, ölçülebilen en düşük konsantrayonun tespit edilmesi işlemi "Tayin limiti ve Dedeksiyon limiti "olarak hesap edilmiştir. Sonuçlar Tablo 5.4 'de özetlenmiştir.

5.5.3. Kararlılık

Optimum deney koşulları belirlendikten sonra, oluşturulan yük transfer kompleksinin zamana karşı kararlılığı için deney yapılmıştır. Bunun için 3 farklı konsantrasyonda kompleks oluşturulmuş, 3 gün boyunca sabah, öğle ve akşam absorbans değerleri Tablo 5.5'de gösterilmiştir. Deney sonucu, farklı konsantrasyonların tamamında güniçi ve günlerarası absorbans değerlerinde düşme eğiliminin devam ettiği görülmüştür. Bunun; yük transfer kompleksi yapısınının, zamanla bozulmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tablo 5.5 Yük transfer kompleksi yapı kararlılığının güniçi ve günlerarasında izlenmesi

Kararlılık	1.Gün			2.Gün			3.Gün		
	Sabah	Öğle	Akşam	Sabah	Öğle	Akşam	Sabah	Öğle	Akşam
20 μg/mL, A	0,262	0,260	0,258	0,255	0,252	0,250	0,235	0,230	0,226
60 μg/mL, A	0,656	0,654	0,650	0,602	0,588	0,584	0,575	0,573	0,570
100 μg/mL, A	1,045	1,030	1,015	0,915	0,903	0,899	0,894	0,864	0,862

5.5.4. Doğruluk ve Kesinlik

Önerilen yöntemin doğruluğu ve kesinliği, saf atorvastatinin linearite aralığında bulunan üç farklı konsantrasyon seviyesinin ölçümü ile değerlendirildi, her konsantrasyon, on kez (n=10) tekrar edilerek ölçümler alındı ve sonuçlar Tablo 5.6' da sunuldu. Göreceli standart sapma (% RSD) değerinin yüzdesi, yöntem için % 2'den azdı ve bu da geliştirmiş olduğumuz yöntem için kesinlik değerlerinin iyi olduğunu göstermektedir. Önerilen yöntemin doğruluğu, yüzde bağıl hata (RE%) % 1'den az olarak hesaplandı ve değer önerilen yöntemin doğruluğunu göstermektedir.

Tablo 5.6. Önerilen yöntemle doğruluk ve kesinlik değerlendirmesi

Ölçülen Değer μg/mL	Bulunan Değer[a] μg/mL	RE[b] %	SD μg/mL	RSD %	Geri Kazanım %
20	20,13	0,63	0,092	0,46	100,63
60	60,39	0,65	0,121	0,20	100,65
100	99,27	0,73	0,111	0,11	99,27

[a] Tespit edilen 10 farklı değerin anlamı.

[b] RE – Bağıl hata; SD – Standart sapma; RSD – Bağıl standart sapma.

5.5.5. Sağlamlık

Önerilen yöntemin sağlamlığı, (25 °C) reaksiyon sıcaklığı ortamındayken, reaksiyon zamanı (30 ± 5 dakika), eklenen reaktif hacmi (3,0 ± 0,1 mL) gibi prosedür değişkenlerinde küçük değişikliklerin etkisinin değerlendirilmesi için optimize şartlar korunarak iki deneme yapılmıştır. Elde edilen tekrarlanabilir sonuçlar (Tablo 5.7), bu test değişikliklerinin hiçbirinin atorvastatin ölçümünde, önemli derecede etkilemediğini göstermiştir.

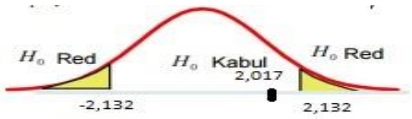
Tablo 5.7. Sağlamlık testi sonuçları

Değiştirilen parametreler		**Geri Kazanım (%)**	**RSD (%)**
Eklenen Reaktif hacmi	3,0 + 0.1	99,8	0,284
	3,0 – 0.1	99,9	0,190
Bekleme süresi	30 + 5	99,6	0,482
	30 – 5	100,4	0,524

5.5.6. Atorvastatin Formülasyonunu İlaç için Uygulama

Önerilen yöntem, farmasötik dozaj formlarındaki atorvastatinin tespitinde için kullanılmış ve sonuçlar Tablo 5.8' de gösterilmiştir. T-testinden % 95 güven düzeyinde istatistiksel değer elde edilmiştir. Önerilen yük aktarma kompleksleşme yönteminin, güvenilir ve doğru olduğunu göstermektedir. Geri kazanım değerinin yüksek yüzdesi, bu yöntemin ilaç katkı maddelerinden kaynaklanan muhtemel sıkıntılardan kurtulma avantajına sahip olduğunu göstermektedir.

Tablo 5.8. Önerilen yöntemin formülasyon değeri için istatistik sonuçları

Ticari Marka	Etiket Üzeri Miktarı	Bulunan Değer[a] ±SD
Cholvast	10mg	10,098 ± 0,108
	Ho:μ=10mg, v=n-1=4	t-test[b] = 2,132
	Ho:μ≠10mg α=0,05	$t_{hesaplanan}$ = 2,017
		Geri Kazanım = % 100,98

[a]: Beş tespitin ortalama değeri.

[b]: %95 güven düzeyine teorik t teğeri

5.6. Yük Transfer Kompleks Reaksiyonun Ürününün Kızılötesi Spektrum ile Karakterizasyonu

Atorvastatin, Quinalizarin ve yük transfer kompleks ürününe ait kızıl ötesi spektrumları Şekil 5.10, Şekil 5.11 ve Şekil 5.12) 'de gösterilmiş ve bant aralıkları (Tablo 5.9)' da verilmiştir. Elektron verici olan Atorvastatinden, π-alıcıya olan elektron bağış süreci (Şekil 5.8) 'de gösterilen amino grubunun bir azot atomundaki elektron çiftinden meydana gelebilir. Atorvastatin ile alıcı quinalizarin'in, kızılötesi spektral bantlarının karşılaştırılmasından, frekanslardaki kaymaların yanı sıra, bant kuvvetlerindeki azalmalar, yük transfer kompleksi oluşumunu açıkça kanıtlamıştır. Değerlerdeki bu kaymalar, kompleks oluşumlar üzerindeki reaktanların moleküler simetrilerinden ve elektronik yapılarında meydana gelen değişikliklerden kaynaklanıyordu (64). Sadece quinalizarinin spektrumu (Şekil 5.11), yapısında mevcut olan iki adet C=O bağının gerilmesini izah eden parmak izi bölgesi 1438 ve 1226 cm^{-1}'de bazı spesifik absorbsiyon bantlarını sundu. Quinalizarin, atorvastatin ile reaksiyona girdikten sonra, bu bantlar neredeyse kayboldu (Şekil 5.12).

C=O grubunun artık molekülde bulunmadığıda görüldü. Spektrumdaki bu değişiklik, atorvastatin'in toplam yük transferinden quinalizarin'in radikal bir anyon oluşumunu gösterdiğini kanıtladı.

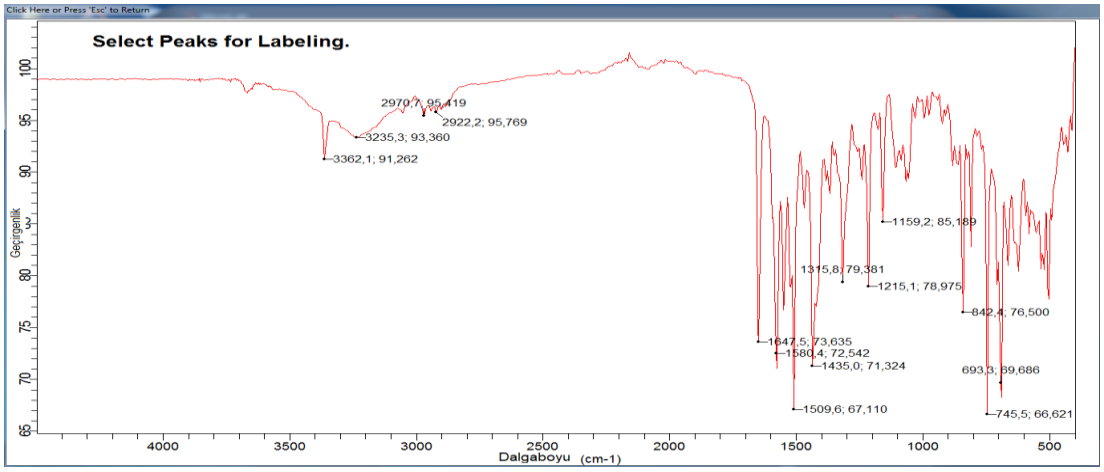
Tablo 5.9. Atorvastatin, Quinalizarin ve Yük Transfer Kompleksinin kızılötesi frekans karaktersitikleri

Bileşik İsmi	Frekans	Bağ Yapısı
Atorvastatin	1647vs	δ (C–O)
	3362 vs	ν (- OH)
	3235vs	δ (-NH)
	2922vs	–CH (aromatic)
	1580 w	C- C (aromatic)
Quinalizarin	1319s	δ (C–O)
	1226m	ν (C–O)
	1438vs	ν (–OH)
Kompleks	3399vs	ν (- OH)
	2930 vs	–CH (aromatic)
	1654vs	δ (-NH))def

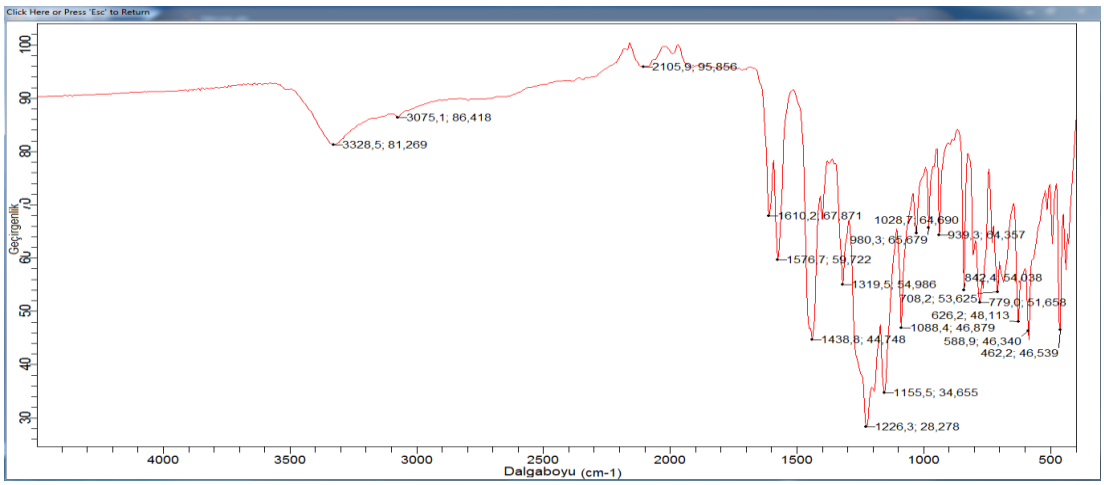
m: medium (orta) ; s: strong(güçlü); v: very çok; w: weak zayıf),

def: deforming (bozulmuş)

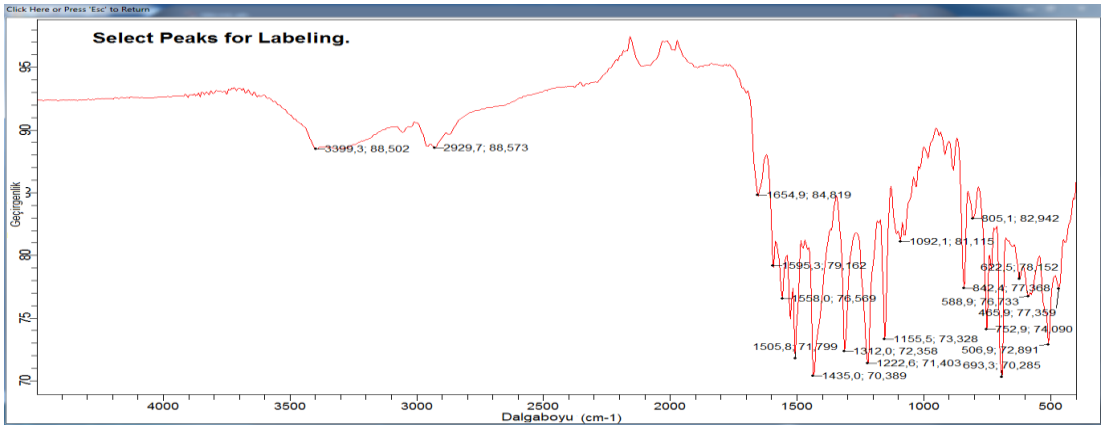
ν: stretching (gerilme) ; δ: bending(eğilme).



Şekil 5.9. Atorvastatin'in Kızılötesi spektrumu



Şekil 5.10. Quinalizarin reaktifinin Kızılötesi spektrumu.



Şekil 5.11. Atorvastatin-Quinalizarin kompleksinin Kızılötesi spektrumu

6.TARTIŞMA

İnsanlığın başlangıcından beri, hastalıklardan kurtulmak amacıyla ilaçlar sıklıkla kullanılmaktadır. İlaçlar canlı bünyesine içerdikleri etken maddeleri sayesinde etki göstermektedir. Bu etken maddeler belirli miktarda alınınca canlıların hastalıklarına iyi gelmektedir. Aşırı alındığında ise hastaları iyi edeceği yerde tehlikeli boyutlarda zarar veren kimyasal maddelerdir. Bu nedenle ilaçlarda bulunan etken maddenin analizi oldukça önem kazanmaktadır.

Yüksek lisans tez çalışması kapsamında, ilaç piyasasında geniş bir kullanım alanına sahip olan Atorvastatin ilaç etken maddesinin tayini için spektrofotometrik yöntemler geliştirildi.

Çalışmamızda ilk önce Atorvastatin etken maddesinin methanol içerisinde çözülerek 500 µg/mL stok çözeltisi hazırlandı. Stok çözeltiden yararlanarak kalibrasyon eğrisi çizildi ve sonuçlar Şekil 4.1' de görülmektedir. Bu kalibrasyon grafiğinin R^2 değeri 0.9964 ve denklemi y= 0.0097x+0.0646 olduğu tespit edildi. Bununla birlikte Linearite, 10-100 µg/mL aralığında elde edilmiş, LOD=1,49 mg/Lve LOQ değeri 4,98 mg/L olarak hesaplanmıştır. Bu çalışmanın devamında Yük transfer kompleksinin stokiyometresi Job Yöntemiyle belirlendi. Atorvastatin ile quinalizarin arasındaki bağlanmanın ML_3 şeklinde olduğu tespit edildi ve bağlanmanın quinalizarin de bulunan çift bağ O'ler üzerinden olduğu tahmin edilmektedir. Atorvastatin, Quinalizarin ve yük transfer kompleks ürününe ait kızıl ötesi spektrumları (Şekil 5.10, Şekil 5.11 ve Şekil 5.12) 'de gösterilmiş ve bant aralıkları (Tablo 5.9)' da verilmiştir. Böylece, Atorvastatin ile kompleksleştirici boyar madde olan Quinalizarin'in IR spektrumları incelenerek, etki mekanizmasının moleküler düzeyde aydınlatılmasına çalışıldı.

Çalışmada çözücü seçimi yapıldı. Atorvastatin ile quinalizarin için en iyi çözücünün metanol olduğu tespit edildi. Çalışmamızda optimum parametreler olarak; Sıcaklığın 25 °C, bekleme süresinin 30 dakika ve reaktif hacmininde 3 mL olduğu tespit edildi.

Bu tür çalışmalarda validasyon çalışmaları için; hem cihazın, hem de çalışmanın performansı için çok önemlidir. Bizim çalışmamızın performansı Tablo 5.4'de verilmiştir. Önerilen yöntemin doğruluğu ve kesinliği, saf atorvastatinin linerarite aralığında bulunan üç farklı konsantrasyon (20, 60 ve 100 mg/L) seviyesinin ölçümü

ile değerlendirildi, her konsantrasyon, on kez (n=10) okunarak ölçüm yapıldı ve sonuçlar Tablo 5.6'da sunuldu. Göreceli standart sapma (% RSD) değerinin yüzdesi, yöntem için % 2'den azdı ve bu da geliştirmiş olduğumuz yöntem için kesinlik değerlerinin iyi olduğunu gösteriyor. Önerilen yöntemin doğruluğu, yüzde bağıl hata (RE%) % 1'den az olarak hesaplandı. Değer önerilen yöntemin doğruluğunu göstermektedir.

Çalışmanın bir önemli parametresi ise sağlamlıktır. Önerilen yöntemin sağlamlığı, (25 °C) reaksiyon sıcaklığı ortamındayken, reaksiyon zamanı (30 ± 5 dakika), eklenen reaktif hacmi (3,0 ± 0,1 mL) gibi prosedür değişkenlerinde küçük değişikliklerin etkisinin değerlendirilmesi için optimize şartlar korunarak iki deneme yapılmıştır. Elde edilen tekrarlanabilir sonuçlar (Tablo 5.7), bu test değişikliklerinin hiçbirinin Atorvastatin ölçümünde, önemli derecede etkilemediğini göstermiştir.

Çalışmada önerilen yöntem, farmasötik dozaj formlarındaki atorvastatinin tespitinde için kullanılmıştır. t-testinden % 95 güven düzeyinde istatistiksel değer elde edilmiştir. Önerilen yük aktarma kompleksleşme yönteminin, güvenilir ve doğru olduğunu göstermektedir. Geri kazanım değerinin yüksek yüzdesi, bu yöntemin ilaç katkı maddelerinden kaynaklanan muhtemel sıkıntılardan kurtulma avantajına sahip olduğunu göstermektedir.

Optimum deney koşulları belirlendikten sonra, bir önemli parametrede oluşturulan yük transfer kompleksinin zamana karşı kararlılığıdır. Bunun için, 3 farklı konsantrasyonda kompleks oluşturulmuş, 3 gün boyunca sabah, öğle ve akşam olmak üzere absorbans değerleri (Tablo 5.5) verilmiştir. Yaptığımız çalışmalar sonucu, farklı konsantrasyonların tamamında güniçi ve günlerarası absorbas değerlerinde düşme eğiliminin devam ettiği görülmüştür. Bunun; yük transfer kompleksinin, zamanla yapısının bozulmasından kaynaklandığı düşünmekteyiz.

7. SONUÇ

Bu çalışmada; Saf halde ve farmasötik formülasyonlardaki atorvastatin'in tayini için spektrofotometrik olarak, basit bir alternatif yöntem olarak geliştirildi. Yöntem; numunede bulunan analitin kabul edilebilir düşük seviyelerdeki konsantrasyonlarının belirlenmesine olanak sağlayan, hassasiyet ve seçicilik sunmuştur. Geliştirilen yöntem, çift ışınlı spektrofotometre sayesinde düşük ekipman maliyeti ve çalışma maliyeti ile avantajlara sahiptir. Önerilen yöntem aynı zamanda; sadece bir çözücü içindeki, atorvastatin ile quinalizarin arasındaki yük transfer reaksiyonu olma avantajına sahiptir ve geliştirilebilir olma özelliği de vardır.

Farmasötik formülasyonlarda bulunan dolgu maddelerinden izolasyonuna gerek kalmadan, ısıtmaksızın, tampon veya başka çözücülere ihtiyaç duyulmadan kullanılabilen işlemdir.

Linearite, 10-100 µg/mL aralığında elde edilmiş, tespit ve nicelendirme sınırları, sırasıyla 1,49 ve 4,98 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Bu nedenle, önerilen yük aktarma kompleksi reaksiyonu, kalite kontrol laboratuarlarında atorvastatinin rutin analizlerinde pratik ve ekonomik bir seçenektir. Buna ek olarak, kızılötesi spektroskopi sayesinde de, oluşan kompleksin, yük transfer kompleksinin karakterizasyonu verilmiştir.

8-KAYNAKLAR

1. "Lipitor becomes world's top-selling drug". Crain's New York Business, 2011; p:12-28.

2. Gouda AA, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy; 2014, vol. 131, p: 138–144.

3. Amin AS, El-Sharjawy AAM, and Kassem MA, Spectrochimica Acta A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy; 2013, vol. 110, p: 262–268.

4. Hassib HB, Issa YM, Egypt, J. Chem. 39, (1996), p:329–338.

5. Mulliken RS, Molecular compounds and their spectra. III. The interaction of electron donors and acceptors, Phys. Chem. 56, 1952, p:801–822.

6. Gorog S, Ultraviolet–Visible Spectrometry in Pharmaceutical Analysis. CRC Press; 1995, Boca Raton.

7. Adedibu TC, Olabemiwo OM, Salawu MO, and Obiyenwa GK, International Journal of Physical Sciences 5, no. 4; 2010, p: 379-382.

8. Budavari S, The Merk Index. 13th ed. Whitehouse Station, NJ: Merk & Co., Inc. 1997; p-148.

9. Sweetman SC, Martindale, The Complete Drug Reference. 34th ed. London: The Pharmaceutical Press; 2005. p: 868.

10. Bloch K, Speech at the Nobel Banquet in Stockholm, December 10, 1964.

11. CNN Wire Staff (November 30, 2011**).** "Lipitor loses patent, goes generic", Retrieved November 18, 2012.

12. Steinberg D, An interpretive history of the cholesterol controversy, 2006, part-V. The discovery of the statins and the end of the controversy. J. Lipid Res. 47, p:1339–1351.

13. Scandinavian Simviastatin Survival Study Group, Randomised trial of cholesterollowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvistatin Survival Study (4S), 1994, Lancet 344, p:1383–1389.

14. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles C, Lorimer AR, Macfarlane PW, et al., West of Scotland Coronary Prevention Study Group. N. Engl. J. Med. 333, 1995, p:1301–1307.

15. Endo A, The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. J. Lipid Res; 1992, 33, p: 1569–1582.

16. Goes M, Verhoeven JW, Hofstraat H, Brunner K, Chem. Phys., Chem. 4, 2003, p: 349–358.

17. Shen XY, Yuan WZ, Liu Y, et al, Journal of Materials Chemistry c, isuue 45, 2016, p: 588-609.

18. Al-Attas AS, Habeeb MM, Al-Raimi DS, J. Mol. Liq, 148, 2009, p: 58–66.

19. Amano M, Yamamura Y, Sumita M, Yasazuka S, Kawaji H, Atake T, Saito K, J. Chem. Phys.,130, 2009, 034503.

20. Mulliken RS, *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 1950, p:4493.

21. Mulliken RS, Pearson WB, Molecular Complexes, Wiley Publishers, New York, p:1969.

22. Foster R, Charge Transfer Complexes, Academic press, London, 1969.

23. ICH Guideline, Q2 (R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, London, 2005.

24. Kazusaki M, Ueda S, Takeuchi N, Ohgami Y, Chromatography, Vol.33, No.2 2012.

25. Dehahay P, Instrumental analysis. The Macmillan Company, New York, 1967.

26. Siddiqui, Masoom Raza, Zeid A. AlOthman, and Nafisur Rahman. Arabian Journal of chemistry, 2013.

27. Velagaleti, Ranga, Philip K. Burns, and Michael Gill. Drug information journal 37. 4, 2003, p:407-438.

28. The European Pharmacopoeia, 2002, fourth ed., Council of Europe, Strasbourg.

29. Siddiqui MR, Zeid A. AlOthman, and Rahman N, "Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review." Arabian Journal of chemistry, 2013.

30. Gorog, S., 1995. Ultraviolet–Visible Spectrometry in Pharmaceutical Analysis. CRC Press, Boca Raton.

31. Snelleman W, Rains TC, Yee KW, Cook HD and Menis O, Analytical Chemistry, 42, no: 3, 1970, p: 394-398.

32. O'Haver TC, "In Modern Fluorescence Spectroscopy; Wehry, EL, Ed." 1976.

33. McWilliams IG, 1969. Anal. Chem. 41, 674–676.

34. O'Haver TC, Begley T, Anal. Chem., 53, 1961, p;1876–1878.

35. Ertugay MF, Başlar M, Gıda, 2011, 36 (1), s: 49-54.

36. The European Pharmacopoeia, 2002. fourth ed., Council of Europe, Strasbourg.

37. United States Pharmacopoeia USP 26 NF 21, 2003. Near infrared spectrophotometry, p: 2388 (Chapter 1119).

38. Moffat, Anthony C, Trafford AD, Jee RD, and Graham P, *Analyst* 125, no: 7, 2000, p: 1341-1351.

39. Luypaert J, Massart DL, and Heyden YV, Talanta 72, no. 3, 2007, p: 865-883.

40. Morrison RT and Boyd's RN, Organic chemistry, Prentice Hall, 6th ed, 1992, p:413-414.

41. Skoog DA, West DM, "Principles of Instrumental Analysis", II. Ed. 1981.

42. Blaedel WJ and Meloche VM, Elementary quantitative analysis - theory and practice. Harper and Row. 2nd ed, New York, 1964.

43. Skoog DA, Holler F and Grouch R, Principle of instrumental analysis, David Harris. 2nd ed, USA, 2007.

44. Malinin DR and Yoe JH, J. Chem., Ed. 1961, p: 38, 129.

45. Jemal M, Ouyang Z, Chen BC, Teitz D, Rapid Commun Mass Spectrom, 13, 1999, p:1003-1015.

46. Miao XS, Metcalfe CD, J Chromatography A, 2003, 998, p: 133–41.

47. Bullen WW, Miller RA, Hayes RN, J Am Soc Mass Spectrom, 1999,10, p:55–66.

48. Erk N, Extractive spectrophotometric determination of atorvastatin in bulk and pharmaceutical formulations, Anal Lett, 2003; 36, p: 2699–711.

49. Altuntas TG, Erk N, J Liq Chromatogr Relat Technol., 2004, 27, p: 83–93.

50. Verd JC, Peris C, Alergret M, Diaz C, Hernandez ZG, Sanchez RM. Br J Pharmacol. 1999;127, p:1479–85.

51. Erturk S, Aktas ES, Ersoy L, Ficicioglu S, J Pharm Biomed Anal., 2003, 33, p:1017–1023.

52. Shen HR, Liz D, Zhong MK, Pharmazie, 2006, 61, p:18–20.

53. Bleske BE, Willis RA, Anthony M, Casselberry N, Datwani M, Uhley VE, Am Heart J., 2001, 142, p:262.

54. Yadav SS, Mhaske DV, Kakad AB, Patil BD, Kadam SS, Dhaneshwar SR, Indian J Pharm Sci, 2005, 67, p:182–8.

55. McKenney JM, McCormick LS, Weiss S, Koren M, Kafonek S, Blanck DM, Am J Med., 1998, 104, p:137–43.

56. Nirogi RV, Kandikere VN, Shukla M, Mudigonda M, Maurya S, Boosi R, et al. , Biomed Chromatogr., 2006, 20, p:924–936.

57. Singh S, Inamullah, Rai J, Choudhary N, Sharma S, Bulletin of Pharmaceutical Research, 2012, 2(3) p:159-66.

58. Mateti A, Thimmaraju MK, Dr. Raghunandan N, International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences, 2(3): May-June 2012.

59. Banerjee N L, and Sinha B C, Talanta; 1990, vol. 37, no.10, p: 1017-1020.

60. Johnson EA, and Toogood MJ, "The determination of traces of boron with quinalizarin," Analyst; 1954, vol. 79, no. 941, p: 493– 496.

61. Rani S, and Banerji S K, Microchemical Journal, 1973, vol:18, no:6, p: 636–639.

62. Barbosa J, Bosch E, and Carrera R, Talanta, 1985, vol:32, no:11, p: 1077–1081.

63. Gouda AA and Malah ZA, Spectrochimica Acta A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy; 2013, vol: 105, p: 488–496.

64. Schneider J, Huh MM, Bradlow HL, and Fishman J, The Journal of Biological Chemistry; 1984, vol: 259, no: 8, p: 4840–4845.

65. Schneider CC, G¨otz C, Hessenauer A, G¨unther J, Kartarius S, and Montenarh M, Molecular and Cellular Biochemistry, 2011, vol: 356, no: 1-2, p: 177–184.

66. Cozza G, Mazzorana M, Papinutto E. et al, Biochemical Journal, 2009, vol: 421, no: 3, p: 387–395.

67. Feng D, Welker S, K¨orbel C et al, Angiogenesis, 2012, vol: 15, no: 2, p:243-252.

68. Barnard DL, Huffman JH, Morris JLB, Wood SG, Hughes BG, and Sidwell RW, Antiviral Research, 1992, vol: 17, no:1, p: 63–77.

69. Schinazi RF, Chu CK, Babu JR, et al, Antiviral Research, 1990, vol: 13, no: 5, p: 265–272.

70. Higuchi H, Mori K, Kato A, et al, Antiviral Research, 1991, vol: 15, no: 3, p: 205–216.

71. Mulliken RS, J. Am. Chem. Soc, 74, 1952, p: 811.

72. Mulliken RS, J. Phys. Chem. Soc, 56, 1952, p:801.

73. Roy DK, Saha A, Mukherjee AK, Spectrochim. Acta A 61, 2005, p:2017.

74. Dozal A, Keyzer H, Kim HK, Wan WW, Int. J. Antimicrob., Agent 14, 2000, p: 261.

75. Pandeeswaran M, Elango KP, Spectrochim. Acta A 75, 2010, p:1462.

76. Refat MS, El-Zayat LA, Yesilel OZ, Spectrochimica Acta Part A 75, 2010, p:745.

77. Yakuphanoglu F, Arslan M, Kucukislamoglu M, Zengin M, 2005. Sol. Energy p: 79, 96.

78. Krishnamurthy M, Surendrababu K, Muralikrishna U, Indian J. Chem. 27 A, 1988, p: 669.

79. Andrade SM, Costa SMB, Pansu R, J. Colloid Interface Sci, 226, 2000, p: 260.

80. Dabestani R, Reszka KJ, Sigman ME, 1998, J. Photochem, Photobiol. A, p: 117, 223.

81. Jakubiak R, Bao Z, Rothberg L, Synth. Met., 114, 2000, p: 61.

82. Takahasi K, Horino K, Komura T, Murata K, 1993, Bull. Chem.Soc. Jpn., vol: 66, p: 733.

83. Eychmuller A, Rogach AL, Pure Appl. Chem, 72, 2000, p:179.

84. Brueggermann K, Czernuszewicz RS, Kochi JK, J. Phys. Chem., 96, 1992, p:4405.

85. Das SK, Krishnamoorthy G, Dofra SK, Can. J. Chem,. 78, 2000, p: 191.

86. Jones G, Jimenez JAC, Tetrahedron Lett,. 40, 1999, p: 8551.

87. Smith G, Lynch DE, Byriel KA, Kennard CHL, J. Chem. Crystallogr, 27, 1997, p:307.

88. Smith G, Bott RC, Rae AD, Willis AC, Aust. J. Chem., 53, 2000, p: 531.

89. Gorog, S., and Szász Gy. J. of Pharmaceutical Sciences, Budapest, Hungary and Elsevier scientific Co., Book, 1978, pp:426.

90. Rahman, Nafisur, Nadeem Ahmad K, and Syed Najmul Hejaz Azmi. Analytical sciences 20, no. 8, 2004, p: 1231-1235.

91. Helmy, Fatma AG, Abdel-Gawad M, and Mohamed EF, Asian Journal of Pharmaceutical Analysis 2, no.1, 2012, p: 12-19.

92. Al-Neaimy UIS and Al-Delymi AMS, Jordon journal of chemistry, 8(2), 2013, p:103-112.

93. Shaikh NB, Narayana B, and Divya K, Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences, 19, 2016, p: 8-14.

94. Ayman A, and Kasssem M, Arabian Journal of Chemistry, 2012.

95. Kumar, Saradhi SV, Sekaran CB, and Reddy TV, Chemical Sciences Journal, 2012.

96. Gouda, Ayman A, and Zakia Al Malah., Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 105, 2013, p: 488-496.

97. Shaikh NB, Narayana B, Journal of Taibah University for Science, 2016.

98. Seshamamba, Sunitha B, Satyanarayana PV, and Sekharan C, Iranian Chemical Communication 2, 2014, p: 255-268.

99. Qureshi SZ, Saeed A, and Rahman N, Chemia Analityczna, 37, no. 2, 1992, p: 227-229.

100. Bali, Alka, and Prateek Gaur. Chemistry Central Journal 5, no:1, 2011, p: 59.

101. Singh, Neeti, and Afaq Ahmad, Journal of Molecular Structure, 1127, 2017, p: 257-265.

102. Chennaiah M, Veeraiah T, Charan Singh T, and Venkateshwarlu G, Journal of the Chilean Chemical Society, 56, no. 4, 2011, p: 926-929.

103. Ayad MM, El-Hefnawy GB, Bahlol GW, Spectrochimica Acta Part A, 58, 2002, p: 161–166.

104. Kelani, Khadiga, Bebawy LI, Abdel-Fattah L, and Ahmad AKS, Analytical letters, 30, no: 10, 1997, p: 1843-1860.

105. Karadağ R, Savcı H, Dölen E, J. Pharm.Univ. Mar., 1994, 10(2), p:105-113.

106. P. Job, Anal. Chem., 9, 1939, p:133–203.

107. Mayer AS and Agres GH, J. Am. Chern. Soc., 1957, 79, p:49.

9.ÖZGEÇMİŞ

Adı	Fatih	**Soyadı**	YİĞİT
Doğum Yeri	Malatya	**Doğum Tarihi**	23.02.1978
Uyruğu	T.C.	**Tel**	0505 686 77 46
E-posta	yfatih78@hotmail.com		

EĞİTİM DÜZEYİ

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mezuniyet Yılı**
Doktora/Uzmanlık		
Tezli Yüksek Lisans		
Tezsiz Yüksek Lisans		
Lisans	Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği	2000
Lise	Kocasinan Atatürk Lisesi	1995

İŞ DENEYİMİ

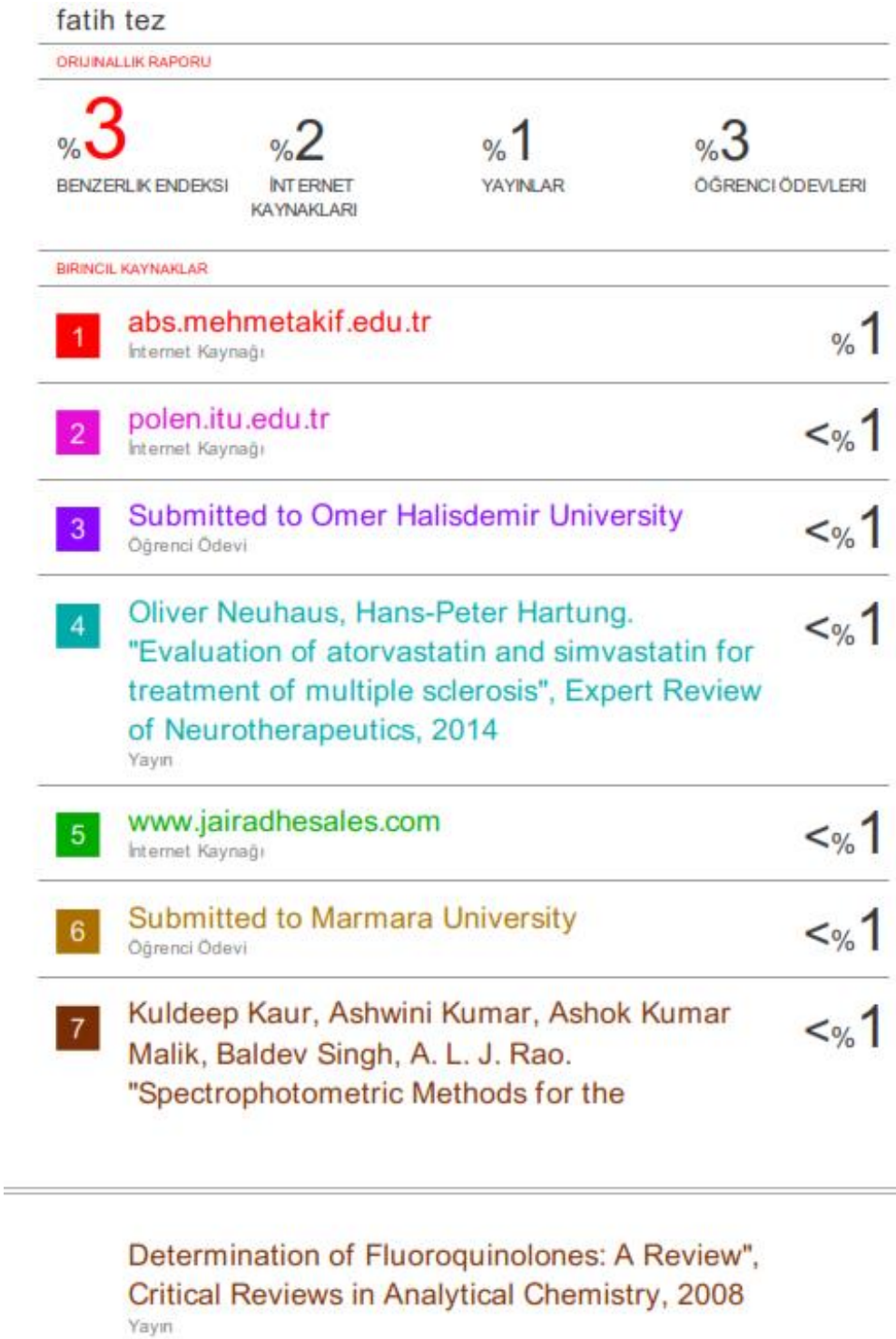
Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
Mühendis	Asil Deri A.Ş.	2002-2003
Mühendis	Eti Maden Genel Müdürlüğü	2003-2007
Daire Başkanı	Adli Tıp Kurumu Kimya İht.Dai.Bşk.	2007-.....

Yabancı Dil Sınav Notu								
ÜDS/YDS	YÖKDİL	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
43,5								

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
ALES Puanı	72,3	68,49	57,64
(Diğer) Puanı			

10. EKLER

10.1.Turnitin Orjinallik Raporu



fatih tez

ORIJINALLIK RAPORU

%3	%2	%1	%3
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

BIRINCIL KAYNAKLAR

1	abs.mehmetakif.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
2	polen.itu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
3	Submitted to Omer Halisdemir University Öğrenci Ödevi	<%1
4	Oliver Neuhaus, Hans-Peter Hartung. "Evaluation of atorvastatin and simvastatin for treatment of multiple sclerosis", Expert Review of Neurotherapeutics, 2014 Yayın	<%1
5	www.jairadhesales.com İnternet Kaynağı	<%1
6	Submitted to Marmara University Öğrenci Ödevi	<%1
7	Kuldeep Kaur, Ashwini Kumar, Ashok Kumar Malik, Baldev Singh, A. L. J. Rao. "Spectrophotometric Methods for the Determination of Fluoroquinolones: A Review", Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2008 Yayın	<%1

10.2.t-Tablosu .

t Table

cum. prob	$t_{.50}$	$t_{.75}$	$t_{.80}$	$t_{.85}$	$t_{.90}$	$t_{.95}$	$t_{.975}$	$t_{.99}$	$t_{.995}$	$t_{.999}$	$t_{.9995}$
one-tail	0.50	0.25	0.20	0.15	0.10	0.05	0.025	0.01	0.005	0.001	0.0005
two-tails	1.00	0.50	0.40	0.30	0.20	0.10	0.05	0.02	0.01	0.002	0.001
df											
1	0.000	1.000	1.376	1.963	3.078	6.314	12.71	31.82	63.66	318.31	636.62
2	0.000	0.816	1.061	1.386	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	22.327	31.599
3	0.000	0.765	0.978	1.250	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	10.215	12.924
4	0.000	0.741	0.941	1.190	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	7.173	8.610
5	0.000	0.727	0.920	1.156	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	5.893	6.869
6	0.000	0.718	0.906	1.134	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.208	5.959
7	0.000	0.711	0.896	1.119	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.785	5.408
8	0.000	0.706	0.889	1.108	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	4.501	5.041
9	0.000	0.703	0.883	1.100	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.297	4.781
10	0.000	0.700	0.879	1.093	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.144	4.587
11	0.000	0.697	0.876	1.088	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.025	4.437
12	0.000	0.695	0.873	1.083	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.930	4.318
13	0.000	0.694	0.870	1.079	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.852	4.221
14	0.000	0.692	0.868	1.076	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.787	4.140
15	0.000	0.691	0.866	1.074	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.733	4.073
16	0.000	0.690	0.865	1.071	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.686	4.015
17	0.000	0.689	0.863	1.069	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.646	3.965
18	0.000	0.688	0.862	1.067	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.610	3.922
19	0.000	0.688	0.861	1.066	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.579	3.883
20	0.000	0.687	0.860	1.064	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.552	3.850
21	0.000	0.686	0.859	1.063	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.527	3.819
22	0.000	0.686	0.858	1.061	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.505	3.792
23	0.000	0.685	0.858	1.060	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.485	3.768
24	0.000	0.685	0.857	1.059	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.467	3.745
25	0.000	0.684	0.856	1.058	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.450	3.725
26	0.000	0.684	0.856	1.058	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.435	3.707
27	0.000	0.684	0.855	1.057	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.421	3.690
28	0.000	0.683	0.855	1.056	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.408	3.674
29	0.000	0.683	0.854	1.055	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.396	3.659
30	0.000	0.683	0.854	1.055	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.385	3.646
40	0.000	0.681	0.851	1.050	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	3.307	3.551
60	0.000	0.679	0.848	1.045	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	3.232	3.460
80	0.000	0.678	0.846	1.043	1.292	1.664	1.990	2.374	2.639	3.195	3.416

Tek Örneklem T-Testi Formülü

$$t = \frac{\overline{X} - \mu}{\frac{S}{\sqrt{n}}}$$

Ortalamanın Tahmini Standart Hatası

μ evrene ait ortalama

$\overline{X}$ örnekleme ait ortalama

S: Örnekleme ait standart sapma

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ İNTİHAL FORMU

ÖĞRENCİ BİLGİLERİ	
ADI VE SOYADI	Fatih YİĞİT
ÖĞRENCİ NO	16878008
EĞİTİM – ÖĞRETİM YILI	2018-2019
YARIYIL	☐ Güz ☒ Bahar
ANABİLİM DALI	Analitik Kimya ABD
PROGRAM	Yüksek Lisans
TEZ KONUSU	Atorvastatin Tayini için Yeni Bir Spektrofotometrik Yöntem
İNTİHAL RAPORU BİLGİLERİ	
RAPOR TÜRÜ	Tez Savunma Sınavı Sonrası
SAYFA SAYISI	54
BENZERLİK ORANI	%3
RAPORLAMA TARİHİ	31/05/ 2019

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın kapak sayfası, giriş, ana bölümler, sonuç ve tartışma kısımlarından oluşan toplam 54 sayfalık kısmına ilişkin, 31/05/2019 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 3'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

☒Kabul/Onay sayfaları hariç,
☒Kaynakça hariç
☒Alıntılar hariç/dâhil
☐Diğer

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Programlarda Tez Çalışması İntihal Raporu Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edilmesi durumunda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Fatih YİĞİT
31/05/2019

Prof. Dr. Işıl AYDIN 31/05/2019	Prof. Dr. Işıl AYDIN Analitik Kimya Anabilim Dalı Başkanı 31/05/2019

Formdaki bilgiler bilgisayar ortamında doldurulmalıdır. El yazısı ile doldurulan formlar geçersiz sayılmaktadır.