T.C

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI İLAÇ ETKEN MADDELERİNİN TAYİNİ İÇİN SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

Figen EREK

DOKTORA TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR
Şubat-2020

TEŞEKKÜR

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

İÇİNDEKİLER

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

1.12.1.1. Kimyasal Sapmalar…….……..…….. 14

1.12.1.2. Enstrumantal Sapmalar..…… 14

1.13. Mor Ötesi ve Görünür Bölge Spektroskopisi…….. 15

1.13.1. σ, π ve n Molekül Orbitallerindeki Elektron Geçişleri…….…….. 15

1.13.2. d ve f Elektronları ile İlgili Geçişler…….…..……... 17

1.13.3. Yük Aktarım Geçişleri……..... 18

1.14 . Mor Ötesi ve Görünür Bölge Spektroskopisinde Kalitatif Analiz …..……...….. 18

1.14.1. Spektral Verilerin Grafiğe Alınması…….……..... 18

1.14.2 . Çözücülerin Etkisi…..…….…….. 18

1.14.3. Fonksiyonel Grupların Tespiti…….…… 19

1.15. Mor Ötesi ve Görünür Bölge Spektroskopisinde Kantitatif Analiz …....…… 19

1.16. UV-Görünür Bölge Spektrofotometreleri…….…..... 22

1.16.1. Tek Işın Yollu Spektrofotometre…….…….…….…... 23

1.16.2. Çift Işın Yollu Spektrofotometreler……..…….…….. 23

1.17. Organik Maddeler Arasındaki Yük Aktarım Kompleksleri…….…….…... 24

1.18 . Kuinalizarin…….……..... 25

1.19. Ditiyokarbamik Asit Türevleri ……..…….……..... 26

1.20 . Analitik Metotların Validasyonu…….……..... 27

1.20.1. Analitik Prosedür…….....…… 27

1.20.2. Spesifiklik……...….…… 27

1.20.3. Doğrusallık…….…….. 28

1.20.4 . Aralık……...….…….. 28

1.20.5 . Doğruluk……...…….…….. 28

1.20.6 . Kesinlik……...…….……...…… 29

1.20.6.1. Tekrarlanabilirlik…….……...…. 30

1.20.6.2. Orta (Ara) Hassasiyet…….…….. 30

1.20.6.3. Tekrar Elde Edilebilirlik……..……..... 30

1.20.7. Dedeksiyon (Gözlenebilme) Sınırı (LOD)……...……... 30

1.20.8. Tayin Sınırı (LOQ)……...…….…...…….. 30

1.20.9. Sağlamlık……...…… 31

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR….……...……...……... 33

2.1. Karvedilol ile Yapılan Çalışmalar……..... 33

2.2. Nebivolol ile Yapılan Çalışmalar ……..…….. 38

2.3. Paroksetin ile Yapılan Çalışmalar…….……..... 42

3. MATERYAL VE METOT ……... 47

3.1. Materyal…….…….……..... 47

3.1.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar……..…….... 47

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler……..... 47

3.1.3. Standart Çözeltilerin Hazırlanması…….……. 48

3.1.3.1. Standart KRV Çözeltileri……...…….……. 48

3.1.3.2. Standart NBV Çözeltisi…….…….. 49

3.1.3.3. Standart PRK Çözeltisi……...……. 49

3.1.4. KUİN (1,2,5,8-tetrahidroksiantrakinon) Çözeltilerinin Hazırlanması……..... 49

3.1.5. NH_3 Çözeltilerinin Hazırlanması……..... 49

3.1.6. Cu^{2+} Çözeltisinin Hazırlanması ……...…….. 49

3.1.7. MIBK İçinde CS_2 Hazırlanması …….…… 50

3.1.8. Asetik Asit Çözeltisinin Hazırlanması …….……..…….. 50

3.2. Yük Transfer Kompleksi Oluşturma Yöntemi ……...……. 50

3.2.1. KRV Tayini için Geliştirilen Yük Transfer Kompleksi Yönteminde Optimum Koşulların Belirlenmesi…….. 50

3.2.1.1. Çözücünün Etkisi …….……... 50

3.2.1.2. KUİN Konsantrasyonunun Belirlenmesi ……...……. 51

3.2.1.3. Süre ve Sıcaklığın Etkisi ……...……...…… 51

3.2.1.4. KRV-KUİN Yük Transfer Kompleksinin Mol Oranı …….……. 51

3.2.1.5. KRV-KUİN Yük Transfer Kompleksi için Molar Absorptivite Katsayısının (Ɛ) Belirlenmesi…….…..... 51

3.3. Cu-ilaç-ditiyokarbamat Kompleksi Oluşturma Yöntemi ……. 52

3.3.1. NBV ve PRK için Geliştirilen Cu-ilaç-ditiyokarbamat Kompleksi Yönteminde Optimum Koşulların Belirlenmesi…… 52

3.3.1.1. Çözücünün Etkisi……..... 52

3.3.1.2 . NH_3 Konsantrasyonunun ve Hacminin Belirlenmesi ……..…… 53

3.3.1.3. Cu^{2+} Miktarının Belirlenmesi ……...……...……. 53

3.3. 1.4. CS_2 Konsantrasyonunun ve Hacminin Belirlenmesi …..……...……. 54

3.3.1.5. Sürenin Etkisi ……...…….……... 54

3.3.1.6. %0.5'lik Asetik Asit Derişiminin Etkisi ……..…… 55

3.4. Geliştirilen Yöntemlerin Validasyon…….……... 56

3.4.1 Kalibrasyon Eğrisinin Çizimi …….…….……... 56

3.4.2. Doğrusallık…….…… 57

3.4.3. LOD ve LOQ Hesaplanması……. 57

3.4.4. Seçicilik ……...…… 57

3.4.5 Doğruluk ……...…….…….. 58

3.4.5.1. Saf İlaçlardan % Geri Kazanım …….…….. 58

3.4.5.2. Standart Ekleme Yöntemi…… 59

3.4.5.3. t-Testi için Geliştirilen Yöntemlerin Tabletlere Uygulanması Yöntemi……. 59

3.4.6. Dayanıklılık ……. 60

3.4.7. Kesinlik ……...……. 61

3.4.7.1. Tekrarlanabilirlik ……..…… 61

3.4.7.2. Tekrar Elde Edilebilirlik …..…… 61

3.4.7.3. Ara kesinlik ……..……..…….... 62

3.4.8. Sağlamlık ……..……..…….…… 62

4. ARAŞTIRMA BULGULARI..... 63

4.1. KRV için Geliştirilen Yönteme Ait Bulgular ……..... 63

4.1.1. Çözücünün Etkisi…….……..... 63

4.1.2. Kuinalizarin Derişiminin Etkisi……..…..……..…… 67

4.1.3. Sıcaklık ve Süre Etkisi……..…… 67

4.1.4. KRV-KUİN Kompleksinin Mol Oranının Belirlenmesi ……..... 69

4.1.5. KRV-KUİN Yük Transfer Kompleksinin Molar Absorptivite Katsayısının Belirlenmesi……... 71

4.1.6. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu……..... 71

4.1.6.1. Kalibrasyon Eğrisi……..…… 71

4.1.6.2. Doğruluk ……..……..... 73

4.1.6.3. Dayanıklılık Testi ……..…… 75

4.1.6.4. Tekrarlanabilirlik…….……..... 76

4.1.6.5. Tekrar Elde Edilebilirlik…….…….. 76

4.1.6.6. Ara Kesinlik…….….. 76

4.1.6.7. Karvedilolün Tablet Formulasyonunda Bulunan İnterfer Maddelerin Absorbansa Etkisi……..... 77

4.1.6.8. Geliştirilen Yöntemin Sağlamlığı……..... 78

4.2. NBV için Geliştirilen Yönteme Ait Bulgular ……..... 80

4.2.1 Çözücünün Etkisi…….……..... 80

4.2.2. NH_3 Konsantrasyonunun ve Hacminin Belirlenmesi…… 81

4.2.3. Cu^{2+} Miktarının Etkisi ……..……..……..……..... 83

4.2.4. CS_2 Miktarının Etkisi ……..……..……..…… 83

4.2.5. Sürenin Etkisi…….…….…….. 84

4.2.6. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu……..…….……..... 84

4.2.6.1. Kalibrasyon Eğrisi…… 84

4.2.6.2. Doğruluk……... 86

4.2.6.3. Dayanıklılık Testi……..... 88

4.2.6.4. Tekrarlanabilirlik ……..... 88

4.2.6.5. Tekrar Elde Edilebilirlik……... 89

4.2.6.6. Ara Kesinlik ……...……..... 89

4.2.6.7. NBV Tablet Formulasyonunda Bulunan İnterfer Maddelerin Absorbansa Etkisi... 90

4.2.6.8. Geliştirilen Yöntemin Sağlamlığı……...……..... 91

4.3. PRK için Geliştirilen Yönteme Ait Bulgular ……..…… 94

4.3.1. Çözücünün Etkisi…….…… 94

4.3.2. NH_3 Konsantrasyonunun ve Hacminin Belirlenmesi…….……. 95

4.3.3. Cu^{2+} Miktarının Etkisi..……...……..... 97

4.3.4. CS_2 Miktarının Etkisi…….....……..... 98

4.3.5. Reaksiyon Süresinin İncelenmesi ……... 99

4.3.6. % 0.5'lik CH_3COOH Miktarının Etkisi ……..... 100

4.3.7. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu …… 102

4.3.7.1. Kalibrasyon Eğrisi …….. 102

4.3.7.2. Doğruluk ……. 104

4.3.7.3. Dayanıklılık Testi ……... 105

4.3.7.4. Tekrarlanabilirlik…….. 106

4.3.7.5. Tekrar Elde Edilebilirlik …….. 107

4.3.7.6. Ara Kesinlik …… 107

4.3.7.7. PRK Tablet Formulasyonunda Bulunan İnterfer Maddelerin Absorbansa Etkisi… 108

4.3.7.8. Yöntemin Sağlamlığı…… 109

5. TARTIŞMA VE SONUÇ..... 111

6. KAYNAKLAR……..……..... 121

ÖZGEÇMİŞ…….……... 135

ÖZET

BAZI İLAÇ ETKEN MADDELERİNİN TAYİNİ İÇİN SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

DOKTORA TEZİ

Figen EREK

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

2020

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

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

Nebivolol HCl ile Paroksetin HCl için geliştirilen yöntemler, her iki ilacın da kimyasal yapısında bulunan sekonder amin grubu üzerinden renkli Cu-ilaç-ditiyokarbamat kompleksinin oluşturulmasına dayanmaktadır. Çalışmanın ilk aşamasında ilaç maddeleri bazik ortamda CS_2 ile ditiyokarbamat türevine dönüştürülmüş ve daha sonra ortama eklenen Cu^{2+} ile ditiyokarbamat türevinden renkli kompleks oluşturulmuştur. İkinci aşamada ise oluşturulan renkli Cu-ilaç-ditiyokarbamat kompleksi su fazından uygun bir organik çözücü ile ekstrakte edilmiş ve organik çözücü içinde kompleksin absorbansı ölçülmüştür. Her iki ilaç için de bu yöntem, absorbansa çözücü cinsinin, NH_3 derişiminin, CS_2 derişiminin, Cu^{2+} derişiminin ve sürenin etkisi incelenerek optimize edilmiştir. Optimum koşullar belirlendikten sonra yöntemin validasyonu yapılmış ve geliştirilen yöntem ilaçların tablet formulasyonlarına başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

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

ABSTRACT

DEVELOPMENT SPECTROPHOTOMETRIC METHODS FOR DETERMINATION OF SOME DRUG ACTIVE SUBSTANCES

PhD THESIS

Figen EREK

DICLE UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

2020

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

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

The methods developed for Nebivolol HCl and Paroxetine HCl are based on the formation of a colored Cu-drug-dithiocarbamate complexes on the basis of the secondary amine group in the structures of both drugs. In the first stage of the study, the drug substances were converted into dithiocarbamate derivatives with CS_2 in basic medium. Then, brown complexes from the dithiocarbamate derivatives were formed by adding Cu^{2+} to the medium. In the second step the complexes formed were extracted into an organic solvent phase from water phase. The methods were optimized by examining effect of type of solvent, NH_3 concentration, CS_2 concentration, Cu^{2+} concentration on the absorption for both drugs.

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

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

ÇİZELGE LİSTESİ

		Sayfa
Çizelge 3.1.	Tablet ilaçlarda bulunan yardımcı maddeler	58
Çizelge 3.2.	t-dağılım değerleri	60
Çizelge 4.1.	KRV-KUİN kompleksinin absorbansı üzerine çözücünün etkisi	63
Çizelge 4.2.	Karvedilol çalışmasında kullanılan çözücülerin dielektrik sabiti	64
Çizelge 4.3.	Molar Absorptivite değeri için elde edilen sonuçlar (KRV ve KUİN 3.0 $mmol.L^{-1}$)	71
Çizelge 4.4.	KRV için geliştirilen yöntemde kalibrasyon eğrisine ait sonuçlar	72
Çizelge 4.5.	KRV için geliştirilen yöntemde gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ)	73
Çizelge 4.6.	KRV için geliştirilen yöntemde % geri kazanım	73
Çizelge 4.7.	KRV için geliştirilen yöntemde standart ekleme yöntemi ile tabletten geri kazanım	74
Çizelge 4.8.	KRV'nin tablet formulasyonu için t-testi	75
Çizelge 4.9.	KRV için geliştirilen yöntemin dayanıklılığı	75
Çizelge 4.10.	KRV için geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirliği (µg/mL)	76
Çizelge 4.11.	KRV için geliştirilen yöntemin tekrar elde edilebilirliği (µg/mL)	76
Çizelge 4.12.	KRV için geliştirilen yöntemin ara kesinliği (AK: 45 µg/mL ve 15 µg/mL)	77
Çizelge 4.13.	KRV için geliştirilen yöntemde tablette bulunan yardımcı maddelerin interfer etkisi	78
Çizelge 4.14.	KUİN hacmi ve reaksiyon sıcaklığındaki küçük değişimin absorbans üzerine etkisi	78
Çizelge 4.15.	KRV ile daha önce yapılan spektrofotometrik çalışmaların karşılaştırılması	79
Çizelge 4.16.	Absorbans üzerine çözücünün etkisi (0.2 $mmol.L^{-1}$ NBV, N=3)	80
Çizelge 4.17.	NBV için geliştirilen yöntemde kalibrasyon eğrisine ait sonuçlar	85
Çizelge 4.18.	NBV için geliştirilen yöntemde gözlenebilme sınırı(LOD) ve tayin sınırı (LOQ)	86
Çizelge 4.19.	NBV için geliştirilen yöntemde % geri kazanım	86
Çizelge 4.20.	NBV için geliştirilen yöntemde standart ekleme yöntemi ile tabletten geri kazanım	87
Çizelge 4.21.	Nebivolol HCl'nin tablet formu için t-testi sonuçları	87
Çizelge 4.22.	NBV için geliştirilen yöntemin dayanıklılığı	88
Çizelge 4.23.	NBV için geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirliği	88

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

ŞEKİL LİSTESİ

		Sayfa
Şekil 1.1.	Karvedilol molekül yapısı	5
Şekil 1.2.	Nebivolol molekül yapısı	6
Şekil 1.3.	Serotonin üretim, depolanma ve yıkım mekanizması	8
Şekil 1.4.	Paroksetin HCl molekül yapısı	10
Şekil 1.5.	Elektromanyetik spektrum	12
Şekil 1.6.	Numune üzerine gönderilen ve numuneden geçen ışığın şiddeti	13
Şekil 1.7.	Elektronik geçiş seviyeleri	16
Şekil 1.8.	Bir spektrofotometrenin genel olarak sahip olduğu bileşenler	20
Şekil 1.9.	Tek ışın yollu spektrofotometrenin bileşenleri.	23
Şekil 1.10.	Çift ışın yollu spektrofotometrenin bileşenleri	23
Şekil 1.11.	Kuinalizarin molekül yapısı	25
Şekil 1.12.	Ditiyokarbamatların metallerle oluşturduğu bağ türleri	26
Şekil 4.1.	40 $\mu g.mL^{-1}$ KRV'nin referans metanole karşı alınan UV spektrumu	65
Şekil 4.2.	Kuinalizarin'in referans metanole karşı alınan UV spektrumu	65
Şekil 4.3.	KUİN-KRV yük transfer kompleksinin UV spektrumu	66
Şekil 4.4	KUİN ile KUİN-KRV yük transfer kompleksinin UV spektrumlarının karşılaştırılması	66
Şekil 4.5.	3.0 $mmol.L^{-1}$ KUİN reaktifinin konsantrasyonunun absorbans üzerine etkisi	67
Şekil 4.6.	KUİN (3.0 $mmol.L^{-1}$) ve KRV (30 $\mu g.mL^{-1}$) arasında oluşan yük transfer kompleksi üzerine sıcaklık ve sürenin etkisi ((a):15 $^{\circ}C$, (b):20 $^{\circ}C$, (c):27, (d):35 $^{\circ}C$, (e): 40 $^{\circ}C$, (f): 45 $^{\circ}C$, (g):50$^{\circ}C$, (h):55 $^{\circ}C$, (ı):60 $^{\circ}C$)	68
Şekil 4.7.	KUİN ($2.5*10^{-4}$ $mol.L^{-1}$) ve KRV ($2.5*10^{-4}$ $mol.L^{-1}$) arasında oluşan yük transfer kompleksinin stokiyometrik oranının Job metodu ile belirlenmesi	69
Şekil 4.8.	KRV-KUİN kompleksinin oluşumu için önerilen mekanizma	70
Şekil 4.9.	KRV tayini için geliştirilen yöntem ile bulunan kalibrasyon eğrisi	72
Şekil 4.10.	Kloroform çözücüsü içinde NEBİ-Cu-ditiyokarbamat kompleksinin UV-GB spektrumu	81

Şekil 4.11. Kloroform çözücüsü içinde % 25'lik NH_3 miktarının etkisi 81

Şekil 4.12. Kloroform çözücüsü içinde % 10'luk NH_3 miktarının etkisi 82

Şekil 4.13. Kloroform çözücüsü içinde % 1'lik NH_3 miktarının etkisi 82

Şekil 4.14. Absorbansa Cu^{2+} miktarının etkisi ($2*10^{-3}$ M) 83

Şekil 4.15. Absorbansa CS_2 miktarının etkisi 83

Şekil 4.16. Reaksiyon süresinin absorbans üzerine etkisi 84

Şekil 4.17. NBV'nin geliştirilen yönteme göre kalibrasyon eğrisi 85

Şekil 4.18. MIBK çözücüsü içinde PRK-Cu-ditiyokarbamat kompleksinin UV-GB spektrumu 95

Şekil 4.19. % 25'lik NH_3 hacminin absorbansa etkisi 95

Şekil 4.20. % 10'luk NH_3 hacminin absorbansa etkisi 96

Şekil 4.21. % 1'lik NH_3 hacminin absorbansa etkisi 96

Şekil 4.22. % 0.1'lik NH_3 hacminin absorbansa etkisi (N=3) 97

Şekil 4.23. Absorbansa Cu^{2+} miktarının etkisi 97

Şekil 4.24. CS_2 Hacminin absorbansa etkisi 98

Şekil 4.25. MIBK içinde hazırlanan % 10'luk CS_2 Hacminin absorbansa etkisi 98

Şekil 4.26. MIBK içinde hazırlanan % 1'lik CS_2 Hacminin absorbansa etkisi 99

Şekil 4.27. Reaksiyon Süresinin Absorbans Üzerine Etkisi 99

Şekil 4.28. Kompleksin dayanıklılığına % 0.5'lik asetik asit miktarının etkisi 101

Şekil 4.29. PRK'nin geliştirilen yönteme göre kalibrasyon eğrisi 102

KISALTMA VE SİMGELER

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

UV-GB (UV/VIS)	: Ultraviyole-Görünür Bölge
HCI	: Hidroklorik asit
KCl	: Potasyum Klorür
NH_3	: Amonyak
CS_2	: Karbondisülfür
LMH	: Laktozmonohidrat
HPMS	: Hidroksipropilmetilselüloz
Mg Str	: Magnezyum Stearat
MKS	: Mikrokristalinselüloz
GA	: Göreceli Absorbans
GK	: Geri Kazanım
AK	: Alınan Konsantrasyon
OBK	: Ortalama Bulunan Konsantrasyon
SS	: Standart Sapma
BSS	: Bağıl Standart Sapma
BH	: Bağıl Hata
Kons	: Konsantrasyon
rpm	: Revolution Per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)
M	: Molar (mol/L)
mM	: Milimolar (mmol/L)
L	: Litre
mL	: Mililitre
ppm	: Milyonda bir birim
g	: Gram
mg	: Miligram
µg	: Mikrogram

1.GİRİŞ

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

İlaç araştırma ve geliştirme çalışmalarında, hammaddelerin ve son ürünlerin kalitesini artırmak, kullanılabilirliğini ve güvenilirliğini sağlamak için enstrümantal ve kimyasal analizler temel gereksinimlerdir. Bu analizler genel olarak spektroskopik, elektroanalitik, kromatografik yöntemlerle yapılmaktadır (Anonim1).

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

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

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

NBV ve PRK etken maddeleri için geliştirilen yöntem ilaçların Cu-ditiyokarbamat türevlerinin UV-görünür bölgede tayin edilmesi esasına dayanmaktadır. Yöntem iki aşamadan oluşmaktadır: Birinci aşamada, bu iki maddenin yapısında bulunan sekonder amin grubunun CS_2 ile bazik ortamda ditiyokarbamat türevine dönüştürülerek Cu^{2+} ile kompleks oluşturması sağlanır. İkinci aşamada ise oluşan sarı renkli kompleks, su fazından su ile karışmayan bir organik çözücüye alınarak UV-görünür bölgede uygun dalgaboyunda analiz edilir (Alpdoğan ve Sungur 1991, Gölcü ve ark 2001, Gölcü ve Yavuz 2008).

1.1 .Hipertansiyon

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

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

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

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

1.2. Antihipertansif İlaçlar

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

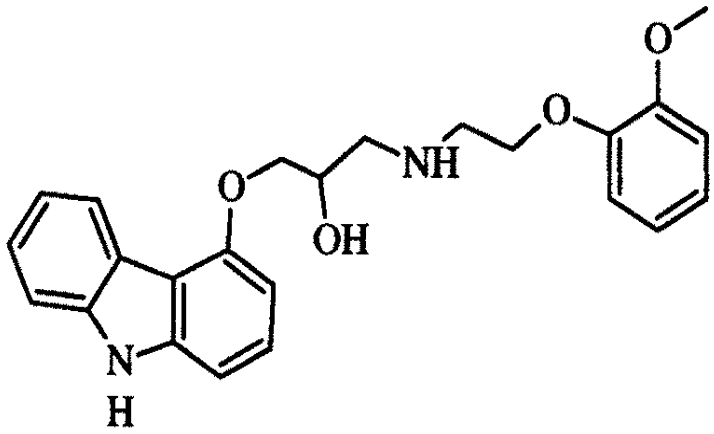
4. Santral sinir sistem üzerine etki: Özellikle lipofilik olanlarda daha fazla olmak üzere beyin sapındaki sempatik merkezlerin baskılanması ile sempatik deşarj azalmaktadır.

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

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

1.3. Karvedilol (KRV)

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



Şekil 1.1. Karvedilol molekül yapısı (Önal 2011)

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

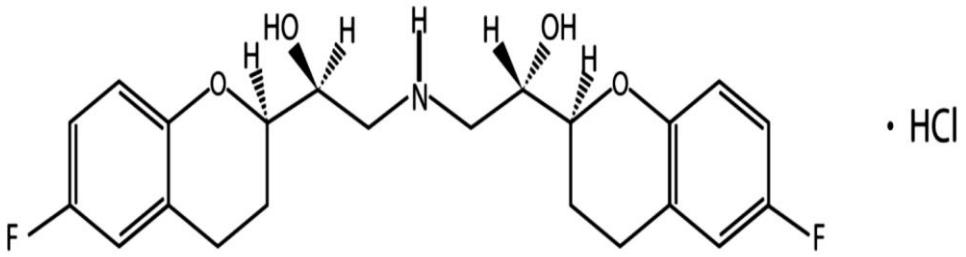
Karvedilol, nonselektif β_1-adrenoreseptör blokajı, vazodilatasyon, antioksidan aktivitelerine sahip 3. kuşak bir β-bloker ajandır. İki (R ve S) enantiyomerinin oluşmasını sağlayan bir asimetrik karbon atomuna sahiptir. (S)- enantiyomerinin β_1-adrenoreseptör blokajından sorumlu olduğu buna karşın hem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

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

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

1.4. Nebivolol Hidroklorür (NBV)

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



Şekil 1.2. Nebivolol molekül yapısı (Kıral 2012)

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

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

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

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

1.5. Depresyon

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

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

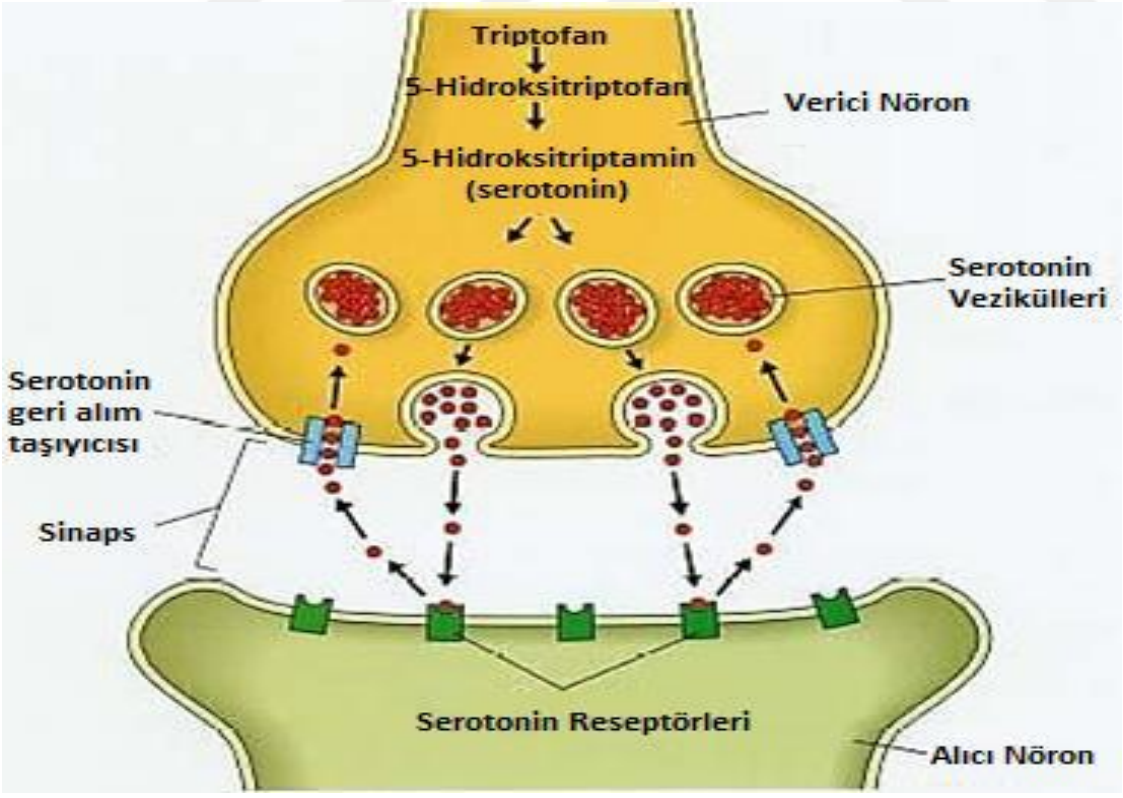
1.6. Serotonin Mekanizması

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

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

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

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



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

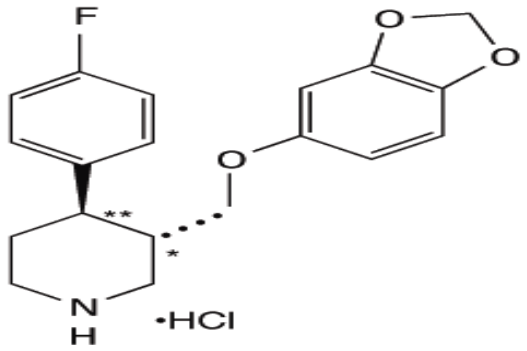
1.7. Seçici Serotonin Geri Alım İnhibitörleri (SSRI'lar)

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

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

1.8. Paroksetin HCl (PRK)

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



Şekil 1.4. Paroksetin HCl molekül yapısı (FDA)

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

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

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

1.9. İlaç Analizlerinin Önemi

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

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

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

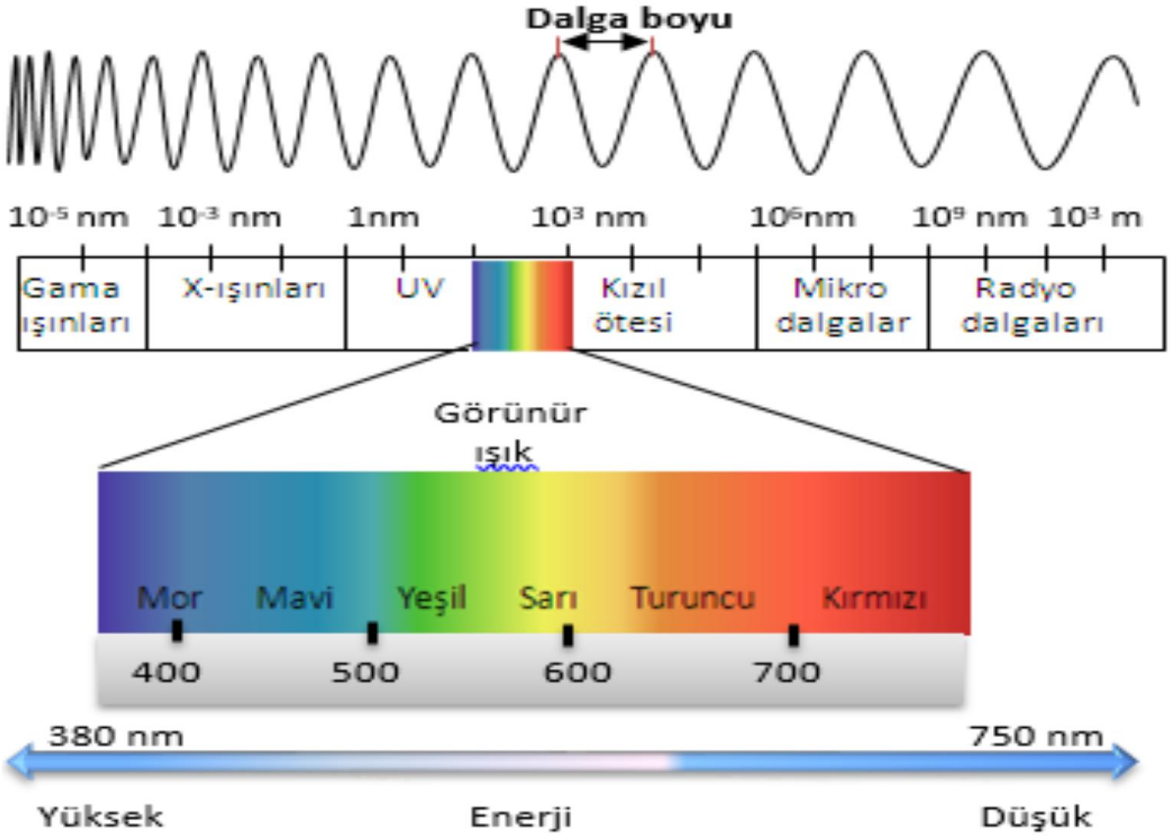
"Farmasötik kimyasallar" ve bunlardan hazırlanan dozaj formlarının standardizasyonu hayati bir rol oynar; bu sayede hasta "ilacı" izin verilen etki ve tolerans sınırları dahilinde alır. (Kar 2005)

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

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

1.10. Spektroskopi

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



Şekil 1.5. Elektromanyetik spektrum (Demir 2017)

1.11. Absorpsiyon Spektroskopisi

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

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

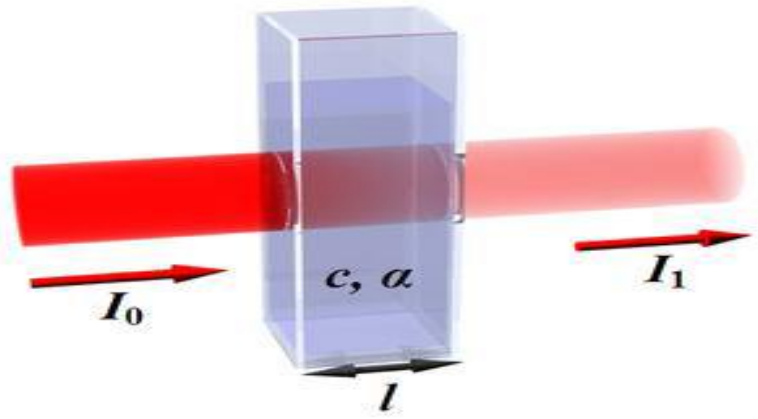
Çözelti içindeki madde miktarını çözeltiden geçen veya çözeltinin tuttuğu ışın miktarından faydalanarak ölçme işlemine **fotometri** denir.

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

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

1.12. Lambert-Beer Eşitliği

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



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

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

$A = \log (I_0 / I) = Є.b.C$

Є = Molar Absorpsiyon katsayısı ($L.mol^{-1}.cm^{-1}$), b = Işının etkileştiği yol (cm), C=Konsantrasyon ($mol.L^{-1}$)

I/I_0 oranına geçirgenlik denir ve T ile gösterilir.

$$I/I_0=T=10^{-ЄbC}$$

Absorbans ile geçirgenlik arasında

$$A=-\log (T) =2 – \log (\%T)$$

bağlantısı vardır. %T, % Geçirgenlik adını alır.

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

$$A_T=A_1+ A_2+ \ldots+ A_n= Є_1.b.C_1+ Є_2.b.C_2 +\ldots.+ Є_n.b.C_n$$

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

1.12.1. Lambert-Beer Yasasından Sapmalar

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

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

1.12.1.1. Kimyasal Sapmalar

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

1.12.1.2. Enstrumantal Sapmalar

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

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

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

1.13. Mor Ötesi ve Görünür Bölge Spektroskopisi

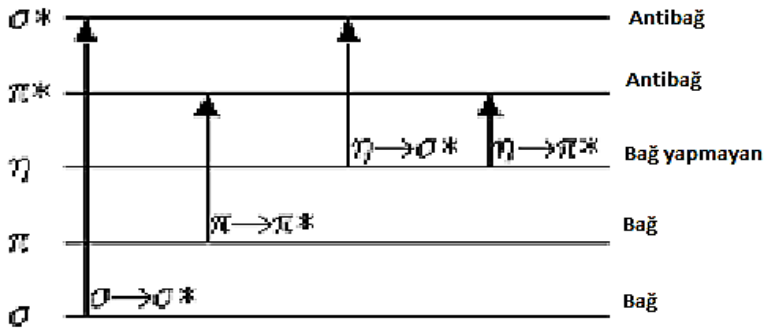
Lambert-Beer eşitliğine göre moleküllerin monokromatik ışınları absorplayarak uyarılmasına dayanmaktadır (Yaman 2005). Moleküllerdeki mor ötesi ve görünür bölge ışınlarının soğurulması elektronik uyarılmaya neden olur. Bu uyarılma yanında titreşim ve dönme uyarılmaları da olduğu için mor ötesi spektrumda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

1.13.1. σ, π ve n Molekül Orbitallerindeki Elektron Geçişleri

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

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

σ, π ve n molekül orbitallerindeki elektron geçişleri birçok organik molekül ve iyonlarda ayrıca bazı inorganik anyonlarda da görülmektedir. Işınların soğrulması ile σ-σ*, n-σ*, n-π* ve π-π* geçişleri olabilir (Skoog ve ark).



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

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

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

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

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

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

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

1.13.2. d ve f Elektronları ile İlgili Geçişler

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

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

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

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

Geçiş metallerinin her biri birer elektron çifti barındırabilen beş adet kısmen

dolu d orbitaline sahip olmalarıyla (birinci seride 3d ve ikinci seride 4d orbitalleri) nitelenirler.

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

-kristal alan teorisi

-molekül orbital yaklaşımı

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

1.13.3. Yük Aktarım Geçişleri

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

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

Metal-ligant komplekslerinde yük-aktarım geçişi yaygın olarak görülmektedir. Metalden ligaanta geçişlerde metalin bir yörüngesindeki bir elektronun ligantın bir yörüngesine aktarılması veya metalin bir yörüngesi boş ise ligantın bir yörüngesindeki elektronun metalin boş yörüngesine aktarımı yapılır (Skoog ve ark 1998., Anonim5).

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

1.14. Mor Ötesi ve Görünür Bölge Spektroskopisinde Kalitatif Analiz

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

1.14.1. Spektral Verilerin Grafiğe Alınması

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

1.14.2. Çözücülerin Etkisi

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

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

1.14.3. Fonksiyonel Grupların Tespiti

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

1.15. Mor Ötesi ve Görünür Bölge Spektroskopisinde Kantitatif Analiz

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

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

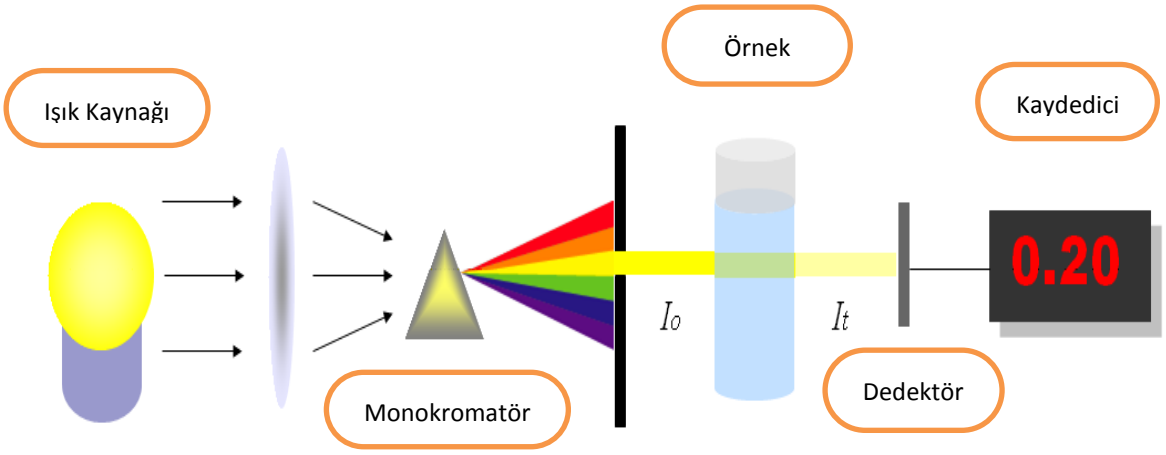
UV-Görünür bölgede ışın absorplayan organik ve inorganik türlerin nicel analizleri doğrudan yapılmaya elverişlidir. Ancak bu bölgelerde ışın absorplamayan türler çeşitli reaktiflerle muamele edilerek ışın absorplayan ürünlere dönüştürülürler (Skoog ve ark 1998).

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

UV-Görünür bölge spektrofotometresi ile kantitatif analiz yapılırken ilk olarak dalgaboyu seçilmelidir. Belirlenen dalga boyunda, farklı derişimlerde hazırlanan

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

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



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

Işın Kaynağı: D_2 (Döteryum), W (Tungsten), H_2 ve Xe (Ksenon) gibi sürekli ışın kaynakları kullanılır. Yaygın olarak Tungsten ve Döteryum lambaları kullanılmaktadır.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

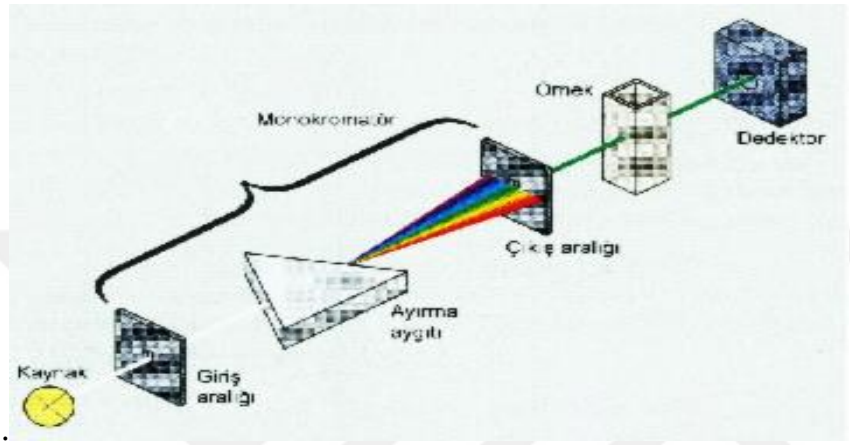
Küvetler dikdörtgen prizma şeklinde olup, genişlikleri 0,1-10 cm arasında değişir. En çok kullanılan küvetler ise genişliği 1 cm olanlardır (Yavaş 2019, Skoog ve ark 1998).

1.16. UV-Görünür Bölge Spektrofotometreleri

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

1.16.1. Tek Işın Yollu Spektrofotometre

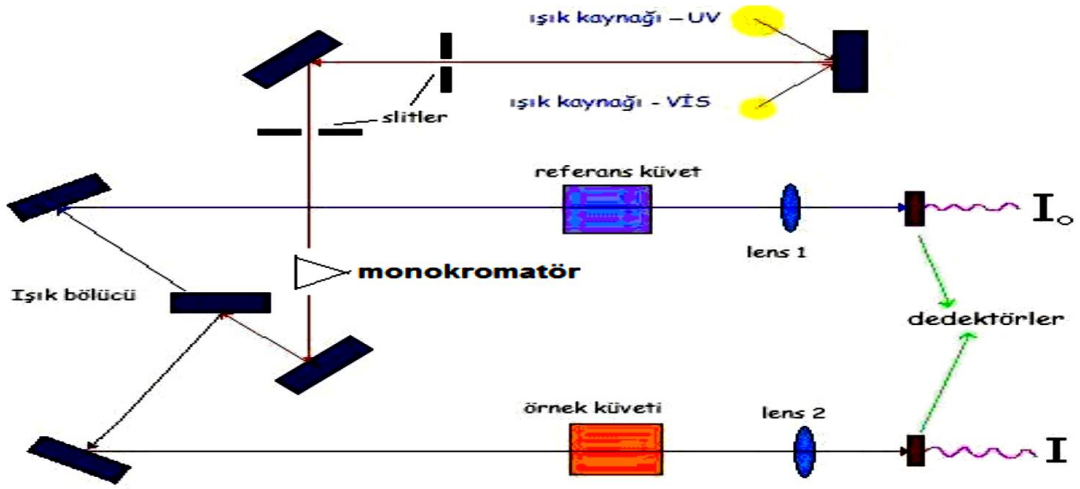
Kaynaktan çıkan ışın bir mercek ile toplanarak monokromatöre gönderilir, dalgaboyu seçiminden sonra örnekle etkileştirilir. Örneğin ışığı absorplama miktarı uygun bir dedektörle ölçülür, bu sinyal çoğaltılır ve galvanometrede okunur. Böyle her bir bileşenin aynı ışın yoluna koyulduğu cihazlara tek ışık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



Şekil 1.9. Tek ışın yollu spektrofotometrenin bileşenleri (Gümüştaş)

1.16.2. Çift Işın Yollu Spektrofotometreler

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



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

1.17. Organik Maddeler Arasındaki Yük Aktarım Kompleksleri

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

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

$$\mathbf{D : A \longleftrightarrow D^{+} A^{-}}$$

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

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

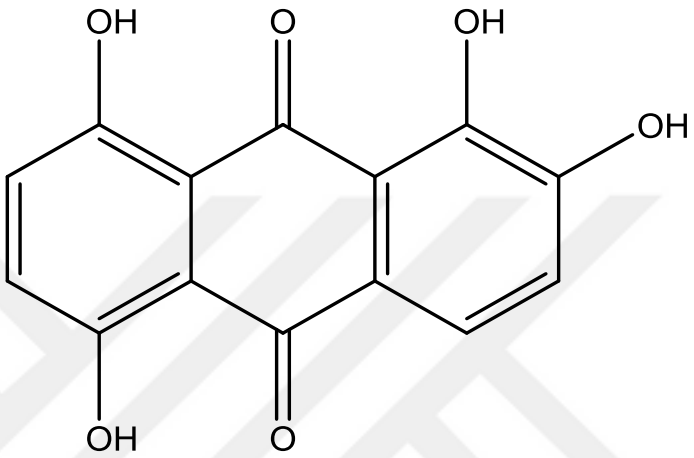
Kel ve Ulu (2011) π akseptörü olan 7,7,8,8-tetrasiyankinodimetan (TCNK) ve 2,3-dikloro-5,6-disiyano-1,4 benzkuinon (DDK) ile bisoprolol ilacının yük transfer reaksiyonunu çalışmışlardır.

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

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

1.18. Kuinalizarin

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



Şekil 1.11. Kuinalizarin molekül yapısı (Temel 2019)

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

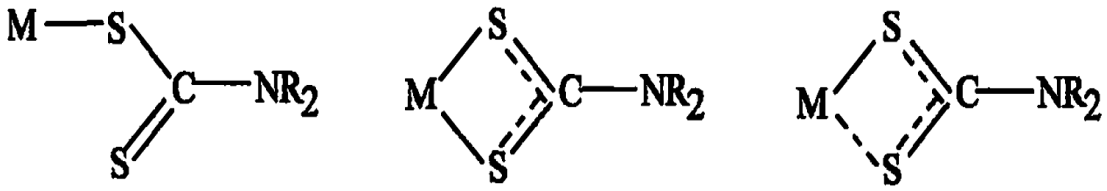
Piroksicam, tenoksicam, albendazol, azitromisin, sefaleksin, sumatriptan süksinat gibi ilaç etken maddelerinin spektrofotometrik tayininde kromojenik reaktif olarak kullanılmıştır. Bu ilaç tayinlerinin metodları daha çok yük transfer reaksiyonuna dayanmaktadır (Al-Neaimy ve Al-Delymi 2013).

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

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

1.19. Ditiyokarbamik Asit Türevleri

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



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

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

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

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

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

Alpdoğan ve Sungur (1999) metoprolol tartaratın tabletlerden tayini için spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde ilaç maddesi bazik ortamda CS_2 ile ditiyokarbamat türevine dönüştürülerek Cu^{2+} ile sarı renkli kompleks oluştruması sağlanmıştır.

El-Ries ve ark (2000) propranolol HCl ve metoprolol tartaratın tabletlerden tayini için spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. . Bu yöntemde ilaç maddesi bazik ortamda CS_2 ile ditiyokarbamat türevine dönüştürülerek Cu^{2+} ile sarı renkli kompleks oluştruması sağlanmıştır. Alpdoğan ve Sungur'un çalışmasından farklı olarak

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

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

1.20. Analitik Metotların Validasyonu

1.20.1. Analitik Prosedür

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

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

-Spesifiklik

-Doğrusallık

-Aralık

-Doğruluk

-Kesinlik

-Gözlenebilme ve tayin sınırı

-Sağlamlık (Harris 2015)

1.20.2. Spesifiklik

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

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

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

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

1.20.3. Doğrusallık

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

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

1.20.4. Aralık

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

1.20.5. Doğruluk

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

Analitik prosedürün bilinen saflıktaki bir analite uygulanması, önerilen analitik

prosedürün sonuçlarının doğruluğu belirtilmiş ikinci bir iyi bilinen prosedürün sonuçlarıyla karşılaştırılması veya standart ilavesi gibi çeşitli yöntemlerle belirlenebilir.

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

Mutlak Hata: ε_m = I$y_g - y_y$I

Bağıl Hata: ε_b = I$y_g - y_y$I / y_g

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

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

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 (Yiğit 2019).

1.20.6. Kesinlik

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

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

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

BSS = s / μ (μ : Örneklem ortalaması)

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

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

VK = BSS x 100

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

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

1.20.6.1. Tekrarlanabilirlik

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

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

1.20.6.2. Orta (Ara) Hassasiyet

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

1.20.6.3. Tekrar Elde Edilebilirlik

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

1.20.7. Dedeksiyon (Gözlenebilme) Sınırı (LOD)

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

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

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

1.20.8. Tayin Sınırı (LOQ)

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

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

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

1.20.9. Sağlamlık

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

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

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

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

.

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Karvedilol ile Yapılan Çalışmalar

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

El-Didamony ve ark (2015) tabletlerden ve biyolojik sıvılardan Telmisartan (TEL), propranolol (PRO), bisoprolol (BIS) ve karvedilol (KRV) ilaçlarının bromokresol yeşili (BKY) ve bromotimol mavisi (BTM) ile spektrofotmetrik taynini yapmışlardır. Yöntemde pH ve tampon cinsi, reaktif konsantrasyonunu, ekstraksiyon çözücüsünü, çalkalama süresini incelemişler ve Job metodu ile iyon çifti komplekslerinin stokiyometrisini belirlemişlerdir. KRV için BKY ve BTM ile geliştirdikleri yöntemde; pH 2, tampon hacmini ve türünü 2 mL KCl-HCl, BKY ve BTM konsantrasyonunu 2 mL 1.0 $mmol.L^{-1}$, ekstraksiyon çözücüsünü diklormetan, çalkalama süresini 2 dk optimal koşullar olarak belirlemişlerdir. İyon çiftlerinin stokiyometrisini 1:1 bulmuşlardır. KRV-BTM iyon çifti için molar absorptivite katsayısını $5.86*10^4$ L $mol^{-1}cm^{-1}$, çalışma aralığını 1.0-11 µg /mL, LOD değerini 0.4980 µg /mL, LOQ değerini 1.6583 µg /mL; KRV-BKY iyon çifti için molar absorptivite katsayısını $5.02*10^4$ L $mol^{-1}cm^{-1}$, çalışma aralığını 1.0-12 µg /mL, LOD değerini 0.6675 µg /mL, LOQ değerini 2.2229 µg /mL bulmuşlardır. Tablet ilaçlar, idrar ve kan serumunda ort % geri kazanımı % 99.99 elde etmişlerdir. Yöntemin bu örneklerin her birine başarılı bir şekilde uygulanacağını göstermişlerdir.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Sreevidya ve Narayana (2009) KRV'nin tayini için spektrofotometrik iki yöntem geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri yöntemlerden biri bazik ortamda 402 nm'de maksimum absorbans veren iminyum tuzunu oluşturan ninhidrin ile karvedilolün reaksiyonuna diğeri ise bazik ortamda 558 nm'de maksimum absorbans veren bir kompleks oluşturan sodyum nitroprussid ve asetaldehit ile karvedilolün reaksiyonuna dayanmaktadır. Kalibrasyon grafiklerinin karvedilol-ninhidrin ve KRV-asetaldehit-nitroprussid yöntemleri için sırasıyla 0.2-1.20 ve 0.6-2.0 $\mu g.mL^{-1}$ lineer aralığında olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışma aralıklarında LOD nin sırasıyla 0.139, 0.418 $\mu g.mL^{-1}$ ve LOQ nun sırasıyla 0.157, 0.222 $\mu g.mL^{-1}$, molar absorptivite değerlerinin de sırasıyla 2.571xl0^4 ve 1.617x10^4 $L.mol^{-1}cm^{-1}$ olduğunu tespit etmişlerdir. Bu yöntemleri karvedilolün tayininde farmasötik formulasyonlara başarılı bir şekilde uygulamışlardır.

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