



**APIKSABANIN ELEKTROANALİTİK
İNCELEMESİ VE TAYİNİ**

Yüksek Lisans Tezi

Ülfet ERDOĞAN UZUNOĞLU

Eskişehir 2024

APIKSABANIN ELEKTROANALİTİK İNCELEMESİ VE TAYİNİ

Ülfet ERDOĞAN UZUNOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Analitik Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN
(İkinci Danışman: Prof. Dr. Hayati ÇELİK)

Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Mart 2024

ÖZET

APIKSABAN'IN ELEKTROANALİTİK İNCELEMESİ VE TAYİNİ

Ülfet ERDOĞAN UZUNOĞLU

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Mart 2024

Danışman: Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN

(İkinci Danışman: Prof. Dr. Hayati ÇELİK)

İlaç analizlerinde kromatografik ve spektrofotometrik yöntemler sıklıkla kullanılmakla beraber elektroanalitik yöntemlerin bu yöntemlere karşı düşük maliyet, kolay uygulanabilirlik, kısa süren analiz süreleri gibi üstünlükleri vardır. Elektroanalitik yöntemleri diğer yöntemlerden ayıran önemli özelliklerden biri ise ilaç aktif molekülün elektroaktif bölgesinin tayininin sağlanmasıdır. İlaç aktif moleküllerin elektron transfer mekanizmasının açığa çıkarılmasında elektroanalitik yöntemlerden olan voltametrik yöntemlere sıklıkla başvurulur. Direkt etkili oral antikoagülan grubunda yer alan Faktör Xa inhibitörü Apiksaban, 2012 yılında FDA tarafından onay almıştır. Bu çalışmada literatürdeki Apiksabanın elektrokimyasal analizi ile ilgili eksikliği kapatmak ve elektroindirgenme mekanizmasını açıklamak amacıyla elektrokimyasal çalışmalar yapılmıştır. Damlayan cıva elektrot ile indirgenme mekanizması aydınlatılıp elektroaktif bölge saptanmış, diferansiyel puls polarografisi ile etken maddenin miktar tayini metodu geliştirilmiştir ve geliştirilen yöntem Apiksabanın ticari preparatı olan Eliquis® numunesinde uygulanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Polarografi, Damlayan Cıva Elektrot, Diferansiyel Puls Polarografisi, İndirgenme, Apiksaban.

ABSTRACT

ELECTROANALYTICAL INVESTIGATION AND DETERMINATION OF APIXABAN

Ülfet ERDOĞAN UZUNOĞLU

Department of Analytical Chemistry

Anadolu University, Institution of Graduate Schools, March 2024

Supervisor: Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN

(Co-Supervisor: Prof. Dr. Hayati ÇELİK)

Although chromatographic and spectrophotometric methods are frequently used in drug analysis, electroanalytical methods have advantages such as low cost, easy applicability, and short analysis times over these methods. One of the important features that advantage of electroanalytical methods from other methods is that it provides the determination of the electroactive region of the molecule. Voltammetric techniques, one of the electroanalytical methods, are frequently used to reveal the electron transfer mechanism of pharmaceutical molecules. Factor Xa inhibitor apixaban, which is a part of the direct oral anticoagulant group, was approved by the FDA in 2012. In the present study, electrochemical analyses were conducted to address the existing gap in the literature regarding the electrochemical analysis of apixaban and to elucidate its electroreduction mechanism. In this study, the reduction mechanism was elucidated using a dropping mercury electrode, and the electroactive region was determined. A method for quantification of the apixaban using differential pulse polarography was developed, and applications were conducted using samples of apixaban's commercial preparation, Eliquis®.

Keywords: Polarography, Dropping Mercury Electrode, Differential Pulse Polarography, Reduction, Apixaban.

TEŞEKKÜR

Mezuniyet projemden itibaren laboratuvarında çalışmama imkân sağlamış; çalışma hayatımda, tamamlamış olduğum bu yüksek lisans eğitimi ve tezimin her aşamasında bana her zaman destek olmuş olan ve her zaman örnek alacağım danışman hocam Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN'a,

Laboratuvarında bana her imkânı sağlayan, eğitim hayatımdaki en büyük şansım olan ve yanında çalışmaktan çok mutlu olduğum; bilgisini, eğitimciliğin nasıl olması gerektiğini ve her şeyden önce dürüst insan olmayı bana bir baba gibi aşlamaya çalışan, her yanışımdan sonra sabırla bana doğruyu öğreten, yolumu her zaman aydınlatmak için çaba harcayan canım danışman hocam Prof. Dr. Hayati ÇELİK'e ve Melek Şirin BAYMAK hocama,

Bana analitik kimyayı ve akademiye sevdiren ve yolumun buradan geçmesini sağlayan, yanında çalışmama imkân sağlayıp tüm bilgi birikimiyle bana destek olan, kendimi geliştirmem için her zaman destek olan ve her zaman yanımda olup beni dinleyen, yardımlarını hiç esirgemeyen canım hocam Dr. Öğr. Üyesi Saniye ÖZCAN'a,

Tezin oluşmasında ve asistanlığım boyunca kendimi geliştirmemi sağlayan, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyip deneyimleriyle bana yön veren, bilgi ve birikimleriyle bana destek olan ve beni hep dinleyen canım hocam Doç. Dr. Ebru TÜRKÖZ ACAR'a,

Her zaman sevgi ve güvenlerini hissettiğim, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen güzel ailem; annem Sultan, babam Hüseyin ve kardeşim Tuğba ERDOĞAN'a,

Her koşulda yanımda ve her zaman bana destek olan, her düştüğümde beni kaldıran ve deneylerin bulaşıklarını yıkamak dâhil her zaman bana yardımcı olan sevgili eşim Batuhan'a ve ailem olan Cemile ve Mustafa Kemal UZUNOĞLU'na,

BİDEB 2210-A burs programıyla yüksek lisansımı destekleyen TÜBİTAK'a

En içten ve sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Ülfet ERDOĞAN UZUNOĞLU

İÇİNDEKİLER

Sayfa

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Antikoagülan İlaçlar	1
1.1.1. Parenteral antikoagülanlar	1
1.1.2. Oral antikoagülanlar	2
1.2. Apiksaban	3
1.2.1. Faktör Xa.....	4
1.2.2. APX'in fiziksel ve kimyasal özellikleri	4
1.2.3. APX'in farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri	5
1.2.4. APX'in kullanım şekli ve dozu	6
1.3. APX İçin Geliştirilmiş Analiz Yöntemleri.....	6
1.3.1. Spektroskopik yöntemler	6
1.3.2. Kromatografik yöntemler	7
1.3.3. Voltametrik yöntemler	10
1.4. Çalışmanın Amacı	10
2. GEREÇ VE YÖNTEM	11

2.1. Ölçme Yöntemi	11
2.1.1. Voltametri.....	12
2.1.1.1. <i>Döngüsel Voltametri</i>	13
2.1.1.2. <i>Polarografi</i>	14
2.1.1.3. <i>Diferansiyel puls polarografisi</i>	17
2.1.2. UV spektrofotometri.....	18
2.2. Sonuçların Değerlendirilmesi.....	19
2.3. Yöntem Geliştirme ve Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)	19
2.3.1. Seçicilik	19
2.3.2. Doğrusallık	20
2.3.3. Doğruluk.....	20
2.3.4. Kesinlik	20
2.3.5. Gözlenebilirlik (LOD) ve tayin sınırı (LOQ).....	21
2.3.6. Kararlılık	22
2.3.7. Sağlamlık	22
2.4. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	22
2.5. Kullanılan Kimyasal Maddeler	23
2.5.1. APX standart maddesinin saflık kontrolleri	24
2.5.2. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması	24
2.5.2.1. <i>Stok ve standart çözeltilerin hazırlanması</i>	24
2.5.2.2. <i>Tampon çözeltilerin hazırlanışı</i>	24
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	25
3.1. APX'in Saflık Kontrolleri.....	25
3.2. APX Üzerine Çalışmalar.....	25
3.2.1. APX'in polarografi çalışmaları	25
3.2.1.1. <i>Elde edilen verilere göre APX'in indirgenme mekanizmasının değerlendirilmesi</i>	30

3.2.2. APX'in CV çalışmaları.....	36
3.2.3. UV spektrofotometri ile pK _a tayini çalışmaları	38
3.2.4. Yöntem Geçerliliğinin Tayini	41
3.2.5. Geliştirilen Yöntemin Örneklerle Uygulanması	44
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	46
KAYNAKÇA.....	48
ÖZGEÇMİŞ	



TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 3.1. APX için doğrusallık ve kesinlik verileri	42
Tablo 3.2. APX'e ait geri kazanım çalışmaları.....	43
Tablo 3.3. APX standart çözeltisinin kararlılık çalışmaları (n=3).....	43
Tablo 3.4. Metot sağlamlık çalışmaları	44
Tablo 3.5. Eliquis® tablet formülasyonu sonuçları (n=6)	44

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. APX'in molekül yapısı	5
Şekil 2.1. A) 1 M hidroklorik asite ait polarogram, (B) 1 M hidroklorik asit içerisindeki 4×10^{-4} M Cd^{+2} metaline ait polarogram	15
Şekil 2.2. APX'e ait pH 4,75 asetat tamponu ortamında LOQ polarogramı (A, 0,002 mM APX, B, pH 4,75 asetat tamponu	21
Şekil 2.3. a) APX, b) BTX ve c) benzofenonun kimyasal yapıları	23
Şekil 3.1. APX'e ait IR spektrumu.....	25
Şekil 3.2. APX'in a) 0,02-0,15 mM aralığındaki derişimlerine ait polarogramları b) cıva rezervuarının yüksekliğinin değıştirilmesiyle yapılan analizlere ait polarogramı; pH 4,75	26
Şekil 3.3. APX'in a) 0,02-0,15 mM aralığındaki derişimlerinin akıma karşı grafiğı b) cıva rezervuarının yüksekliklerinin karekökünün akıma karşı grafiğı; pH 4,75	27
Şekil 3.4. 0,05 mM APX'in a) Asetat tamponu ve b) Fosfat tamponundaki pH-akım grafikleri.....	28
Şekil 3.5. 0,05 mM APX'in a) pH 4,75 asetat tamponu b) pH 7,25 fosfat tamponu ve c) 8,70 amonyak tamponundaki polarogramları	29
Şekil 3.6. 0,05 mM APX'in amonyak ve borat tamponlarında analizi; pH 8.30	30
Şekil 3.7. 0,05 mM benzofenon ve APX'in polarogramı	31
Şekil 3.8. BTX'in molekül yapısı	32
Şekil 3.9. a) Pirazolantron ve b) antron moleküllerine ait molekül yapıları	33

Şekil 3.10. APX'in tahmin edilen elektroindirgenme mekanizması	35
Şekil 3.11. 0,2 mM APX'in 100 mV/s tarama hızındaki voltamogramı; pH 4,75	36
Şekil 3.12. 0,2 mM APX'in 10-1000 mV/s tarama hızlarındaki voltamogramları; pH 4,75	37
Şekil 3.13. 0,2 mM APX'in 10-1000 mV/s tarama hızlarının karekök değerinin akıma karşı grafiği; pH 4,75	37
Şekil 3.14. 0,03 mM APX çözeltisinin 200-600 nm aralığında elde edilen UV spektrumu	39
Şekil 3.15. 0,03 mM APX çözeltisinin pH 3,75-12,50 aralığındaki çeşitli tamponlarda elde edilen UV spektrumu	39
Şekil 3.16. 0,03 mM APX çözeltisinin pH 12,30-14,00 ile pH 14,00-14,40 aralığındaki çeşitli tamponlarda elde edilen UV spektrumu	40
Şekil 3.17. 277 nm dalga boyunda 0,03 mM APX'in pH-absorbans grafiği	40
Şekil 3.18. APX'in tahmin edilen protonlanması	41
Şekil 3.19. a) Std APX çözeltisine ait polarogram, b) Eliquis® tablet çözeltisine ait polarogram, c) etken madde içermeyen psödo Eliquis® çözeltisine ait polarogramı.....	45
Şekil 4.1. a) Melagatran ve b) Dabigatrana ait kimyasal yapı	46

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

A III	: Antitrombin III
ACN	: Asetonitril
ANOVA	: Tek Yönlü Varyans Analizi
APX	: Apiksaban
BSS	: Bağlı Standart Sapma
BTX	: Betriksaban
C	: Derişim
C ₁₈	: Oktadesilmetilsilan
C ₈	: Oktildimetilsilan
CV	: Döngüsel Voltametri
DCE	: Damlayan Cıva Elektrot
DF	: Doku Faktörü
DOAI	: Direkt Oral Antikoagulan İlaçlar
DPP	: Diferansiyel Puls Polarografisi
E _{1/2}	: Yarı Dalga Potansiyeli
FDA	: ABD Gıda ve İlaç İdaresi
FXa	: Faktör X a
GA	: Güven Aralığı
GCE	: Camsı Karbon Elektrot
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
ICH	: Uluslararası Uyum Konseyi
INR	: Uluslararası Normalleştirilmiş Oran

IR	: Kızılötesi
i_a	: Absorbsiyon Akımı
i_c	: Katalitik Akım
i_d	: Difüzyon Akımı
i_k	: Kinetik Akım
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi
LOD	: Gözlenebilirlik Sınırı
LOQ	: Tayin Alt Sınırı
LSV	: Doğrusal Süpürme Voltametrisi
MS	: Kütle Spektrometresi
MWCNT/CPE	: Modifiye Edilmiş Çok Duvarlı Karbon Nanotüp Elektrot
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
NPP	: Normal Puls Polarografisi
π	: Pi
pKa	: Ayrışma Sabiti
r^2	: Korelasyon Katsayısının Karesi
σ	: Sigma
SCE	: Doygun Kalomel Elektrot
SPE	: Katı Faz Ekstraksiyon
SS	: Standart Sapma
Tl ⁺	: Talyum
UPLC	: Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi
UV-Vis	: Ultraviyole Görünür Alan

1. GİRİŞ

1.1. Antikoagülan İlaçlar

Yaşamımızın kaynağı olan kan, damar sistemi içerisinde belli bir akışkanlıkta kalmalıdır ve oluşan damar hasarı bölgesinde pıhtılaşmalıdır. Pıhtılaşma, damar dışında kanamanın durması esnasında ve damar içinde tromboz oluşumuyla meydana gelir. Sağlam bir kan-damar sisteminde pıhtılaşma oluşmaz ve tromboz engellenir. Damar bütünlüğü bozulduğunda hasarlı damar bölgesinde önce trombositler etkinleşip bölgede toplanırlar. Trombositlerin kümelenmesiyle primer hemostatik tıkaç oluşur. Damar duvarının zedelenmesi sonucu doku faktörünün (DF) oluşmasıyla koagülasyon başlar. Pıhtılaşma faktörlerinin de salgılanmasıyla koagülasyonun etkinliği artar. Trombin oluşumunda hızla artış meydana gelir ve trombin, fibrinojenin fibrine dönüşmesini sağlar. Pıhtılaşma olayı gerçekleşmiş olur. Yara iyileşmesi sonucu oluşan fibrin pıhtıları ve trombositler yıkılır [1].

Hasarlı bölgedeki kanamanın durması hemostaz olarak adlandırılır ve fizyolojik bir olaydır fakat pıhtılaşma yanlış yerde veya zamanda meydana geldiğinde patolojik bir olay halini alır. Antikoagülan ilaçlar fibrin oluşumunu zayıflatıp kanın pıhtılaşma özelliğini azaltan ilaçlardır, kanın pıhtılaşma etkinliğini ekstrinsik, intrinsik ve ortak pıhtılaşma yollarıyla inhibe ederler [2].

Antikoagülan ilaçlar, antikoagülan faktör etkinliğini artırır ve pıhtılaşma faktörlerinin oluşumunu engeller ya da bu faktörlerin etkinliğini azaltırlar. Böylece kanın pıhtılaşma mekanizmasını azaltır ve engellerler. Antikoagülan ilaçlar uygulanış yoluna göre parenteral ve oral antikoagülanlar olmak üzere ikiye ayrılırlar [1].

1.1.1. Parenteral antikoagülanlar

Parenteral antikoagülan ajanlar, aktiviteleri plazmada bulunan kofaktörlere bağlı olan indirekt parenteral antikoagülanlar ve aktivite için plazma kofaktörlerine ihtiyaç duymayan direkt parenteral antikoagülanlar olarak ikiye ayrılırlar.

Heparin, düşük molekül ağırlıklı heparin, fondaparinux ve danaparoid gibi ajanlar; indirekt parenteral antikoagülanlardır. Heparin, hızlı etki özelliğine sahip, tromboz oluşumuna akut müdahale için parenteral olarak kullanılan; sığırların akciğerlerinden ve domuzların ince bağırsak mukozasından elde edilen glukozaminoglikan yapıdır. Heparin fragmentleri içerisinde modifiye monosakkaritler bulunur. Yapıdaki sülfat gruplarının yoğunluğu sebebiyle güçlü bir anyonik maddedir. Bu nedenle heparin; katyonik ilaçlarla,

proteinlerle veya diğer maddelerle kompleks oluşturabilmektedir [3]. Heparin, Heparin kofaktörü olan antitrombin III'ü (A III) aktive eder. A III, aktif haldeki Faktör VIIa hariç, bütün enzimatik pıhtılaşma faktörlerini inhibe eder. Böylece trombin oluşumu indirekt yolla engellenir. Böylece fibrinojenin fibrine dönüşmesi engellenmiş olur. Heparinin antikoagülan etkiye diğer katkısı da damar endotelinde birikerek endotelde elektronegatif yük oluşturmaktır. Böylece damar endotelinde pıhtı oluşumunun engellenmesine katkısı olur [4]. Heparinin fazla dozda kullanımı beyin kanaması, ameliyat sırasında kanamanın meydana gelmesi gibi spontan kanamalara; uzun süreli yüksek doz heparin kullanımı ise osteoporoza sebebiyet verebilir. Heparinin terapötik indeksinin düşük olması ve az da olsa pıhtılaşma yapma eğiliminin olması etkinliğini kısıtlamaktadır. Bu sebeplerle etkinliği daha yüksek antikoagülan maddelerin sentezlenmesi gerçekleştirilmiştir [5].

Enoksaparin, dalteparin, reviparin düşük molekül ağırlıklı heparinlere örnektir. Bu ilaçlar, yüksek molekül ağırlıklı heparinlere göre daha öngörülebilir yanıt oluşturdıkları sebebiyle hasta izlemine rutin olarak ihtiyaç duyulmaz [6].

Diğer parenteral antikoagülan ilaç grubu olan direkt parenteral antikoagülan ilaçların hedefi, trombin oluşumunun doğrudan engellenmesidir. Rekombinant teknolojisi ile üretilen doğal hirudinin varyantı olan desirudin ve lepirudin klinik kullanımdadır. Direkt trombin inhibitörü olan argatroban ve indirekt trombin inhibitörü fondaparinux diğer antikoagülan ilaçlardır [4].

1.1.2. Oral antikoagülanlar

Oral antikoagülanlar çeşitli tromboembolik hastalıkları önlemek ve tedavi etmek amacıyla kullanılır. Oral antikoagülan olarak kullanılan Vitamin K antagonistleri doz yanıtındaki değişkenlik, dar terapötik indeks, ilaç- beslenme etkileşimi gibi dezavantajlarına rağmen; antikoagülan grubu ilaçları kronik olarak kullanan hastalarda parenteral antikoagülan ilaçlara göre daha çok tercih edilmektedirler. Bu durumun başlıca nedenleri; parenteral antikoagülan ilaçların parenteral uygulama gerektirmeleri ve oral antikoagülanlara kıyasla daha pahalı olmalarıdır [7].

Oral olarak kolayca alınmaları ve maliyetlerinin heparine kıyasla daha düşük olması, oral antikoagülan ilaçlar için avantajdır. Fakat oral alınmaları sebebiyle, heparin gibi akut etki göstermezler. Oral antikoagülanlar, tedaviye başladıktan en az 24 saat sonra etki gösterirken tedavi kesildikten birkaç gün sonraya kadar etkileri sürer. Oral antikoagülan ilaçlar dar terapötik indekse sahiptirler, bu sebeple dozlar hastalara göre ayarlanmalıdır. Vitamin K antagonisti olan oral antikoagülanlar kimyasal yapılarına göre

indantion türevleri ve kumarin türevleri olmak üzere ikiye ayrılırlar. Bu gruplar arasında en çok tercih edilen ilaç kumarin türevi olan sodyum varfarindir. Karaciğerde sentezlenen ve etki gösterebilmeleri için karboksillenmeleri gereken pıhtılaşma faktörleri, K vitaminine ihtiyaç duyarlar ve gama-glutamil karboksilaz tarafından katalizlenirler. Karboksilasyonun devamı için K vitamininin yeniden oluşması gerekmektedir. K vitamini antagonisti olan ve oral antikoagülan olarak kullanılan varfarin, K vitamininin yeniden oluşmasını katalizleyen enzimi inhibe ederek dolaylı yoldan koagülasyonun oluşmasını engeller [8]. Varfarin, kullanıma başladıktan 24 saat sonra etki gösterir ve tedavi sonrası birkaç gün etkileri devam eder. Hastanın antikoagülasyon düzeyi; uluslararası normalleştirilmiş oran (INR) olarak ifade edilen protrombin zamanı değeri kullanılarak takip edilir. Hastanın INR değerlerinin tedavi boyunca takibinin yapılması da varfarin kullanımının kısıtlayıcı etkileridir. Ayrıca doz aşımı beklenmedik kanamalara neden olmaktadır [9].

Yeni antikoagülan ilaçlardan olan Direkt Oral Antikoagülan İlaçlar (DOAI); sabit doz halinde alınmaları, hasta izlemi gerektirmemeleri, etkilerinin kısa sürede başlaması ve yarı ömürlerinin diğer oral antikoagülan ilaçlara göre daha kısa olması sebebiyle tercih edilirler. Bu ilaçlar direkt etkili, oral ve selektif FXa inhibitörleri olup; rivoraksaban, Apiksaban (APX), edoksaban ve piyasaya çıktıktan kısa süre sonra kullanımına son verilen betriksabandır. Farmakokinetik ve farmakodinamik etkileri daha öngörülebilirdir. Dabigatran eteksilat ise yine bu grupta yer alıp ön ilaç halinde bulunur ve FXa inhibitörlerinden farklı olarak trombin inhibitörü olan dabigatrana hidroliz olur [10].

1.2. Apiksaban

APX, Pfizer ve Bristol-Myers Squibb (New York, ABD) firmaları tarafından geliştirilen oral kullanıma sahip geri dönüşümlü FXa inhibitörüdür [11]. Eliquis® ticari ismi ile 28 Aralık 2012 tarihinde FDA tarafından onay almıştır. APX, direkt etkili oral ve selektif FXa inhibitörüdür [12]. APX tromboembolik hastalıkların tedavisinde kullanılan, protrombinin trombine dönüşmesini sağlayan Faktör Va'nın kofaktörü olan FXa'nın selektif ve geri dönüşümlü inhibitörüdür. Serbest ve pıhtılarda bulunan FXa'nın aktivitesini inhibe eder [13].

Kalça veya diz protezi gibi ameliyat geçiren hastalar antikoagülan ilaç kullanılmadığı sürece venöz tromboembolizm riski altındadır. Bu sebeple hastalara ameliyat öncesi antikoagülan tedavi önerilmektedir. Yapılan faz iki çalışmalarında diz protez ameliyatından 12-24 saat sonra başlanılan 2,5 mg (günde 2 tablet) APX'in

varfarine göre karşılaştırılabilir fayda-risk profili göstermiştir [14]. Derin ven trombozlu hastalarda yapılan faz üç araştırmalarında ortopedik cerrahiyi takiben oluşan venöz tromboembolizmin önlenmesinde umut vaat etmiştir [15]. Atriyal fibrilasyonlu hastalarda APX'in varfarine kıyasla sistemik emboli veya inme riskini kanama riskini arttırmadan azalttığı gözlemlenmiştir [16].

APX koagülasyon testlerine göre doz ayarlaması gerektirmemesi, kanama riskini arttırmaması gibi nedenlerle derin ven trombozu ve pulmoner embolinin tedavisinde, nonvalvular atriyal fibrilasyonda tercih edilmektedir [17].

1.2.1. Faktör Xa

Pıhtılaşma faktörleri plazmada bulunan özel proteinlerdir. Faktörlerin kendi aralarında ve trombositlerle etkileşimi pıhtılaşma olayını başlatır veya pıhtılaşmaya neden olur. Çoğu pıhtılaşma faktörü plazmada zimojen veya inaktif formda bulunur ve pıhtılaşma yolağında aktif hale geçer. Roma rakamlarıyla adlandırılan faktörlerin aktif halleri harflerinin yanlarına 'a' harfi alarak adlandırılır.

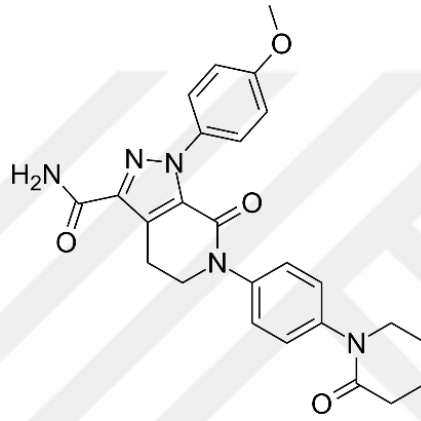
Faktör X, pıhtılaşma yolağında önemli bir proteindir ve trombin üretimini kontrol eder. İntrinsik yolak ile Faktör XII kimyasal yapısının değişmesiyle aktif hale gelerek Faktör XIIa'yı oluşturur. Faktör XIIa, Faktör XI'in Faktör XIa'ya dönüşmesini sağlar. Faktör XIa, Faktör IX'un Faktör IXa'ya aktive olmasını sağlar. Reaksiyon fosfolipit yüzeyinde gerçekleşir. Oluşan Faktör IXa da Faktör X'u aktifleştirerek FXa'ya çevirir. Kaskatın devamı ortak yolakla oluşur. DF'ye bağımlı yolak olan ekstrinsik yolakla da FXa oluşur. FXa, tripsin benzeri serin proteazdır ve protrombinin trombine dönüşümünde önemli bir rol oynar. Pıhtılaşma kaskatında fibrin pıhtısının oluşmasını sağlayan son enzimdir [18].

Damar bütünlüğünün bozulması sonucu DF salgılanır. DF'nin Ca^{2+} ve Faktör VII ile yaptığı kompleks sonucu Faktör VII aktifleşir. Bu faktör de Faktör X'u aktifleştirerek FXa'ya dönüştürür. Bir fosfolipit yüzeyindeki Faktör Va ve Ca^{2+} iyonlarıyla beraber FXa, ortak yolakta, protrombinin pıhtılaşmanın son ajanı olan trombine dönüştürülmesinden sorumlu olan protrombinaz kompleksini oluşturarak protrombini trombine dönüştürür. Trombin, fibrinojenden fibrin oluşumunu katalizler. Koagülasyon tamamlanır [1, 19]. Bu sebeple FXa, yeni oral antikoagulan ilaçların gelişiminde hedef olarak alınmıştır.

1.2.2. APX'in fiziksel ve kimyasal özellikleri

APX (Şekil 1.1), pirazolpiridin yapıya birinci pozisyonundan 4-metoksifenil grubu, 6. pozisyonundan 4-(2-oksopiperidin-1-il) fenil grubu bağlı 7-okso-4,5,6,7-1H-pirazolo

[3,4-c] piridin-3 karboksamit yapısıdır. CAS numarası 503612-47-3'tür ve molekül formülü $C_{25}H_{25}N_5O_4$ olup 459,5 g/mol molekül ağırlığına sahiptir. APX oda sıcaklığında katı, sarımsı beyaz ince toz halindedir. Suda çözünürlüğü çok az olup 0,11 mg/mL'dir [20]. Literatürde yer alan çalışmada maksimum mol çözünürlüğüne 1-4 dioksan içerisinde ulaşılmıştır. Bu çözücüyü metanol, aseton, etanol takip etmiştir ve en düşük çözünürlüğün suda olduğu gözlemlenmiştir [21]. Bu çalışmada düşük derişimlerde APX'in asetonitril (ACN) içerisinde çözündüğü gözlemlenmiştir ve deneyler için kullanılan stok çözeltiler ACN kullanılarak hazırlanmıştır.



Şekil 1.1. APX'in molekül yapısı

1.2.3. APX'in farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri

Farmakokinetik araştırmalar, ilacın oral alımından sonraki 1-2 saat içerisinde maksimum derişime ulaşp absorpsiyonunun hızlı olduğunu göstermektedir. Oral biyoyararlanımın köpek, sıçan ve insanlarda yüksek olduğu gözlemlenmiştir. İlacın damar içi enjeksiyonu sonrası eliminasyon yarı ömrü 2-11 saat olarak gözlemlenmiştir [22][23]. Serum protein bağlanması köpeklerde ortalama %96, sıçanlarda %92 oranında yüksek seyrederken; insanlarda %8'dir ve çoğunlukla albümine bağlıdır [22]. APX, büyük çoğunlukla metabolize olmadan plazma ve dışkıda rastlansa da çok düşük derişimde, tayin edilebilir olan inaktif O-dimetil Apiksaban sülfat olan metabolitlerine de rastlanmıştır. APX eliminasyonu hepatik metabolizma, renal atılım ve bağırsak, safra salgılaması dahil olmak üzere birkaç yolu içerir. APX, CYP enzimleri için substrattır bu sebeple CYP enzimlerini modüle eden ilaçlarla etkileşim gösterebilir fakat APX birden fazla eliminasyon yoluna sahip olduğu için bu tür etkileşimler önemli değildir [24].

Yapılan deneyler sonucunda 5 mg tablet ile 2,5 mg çözelti uygulanan hastaların değerlerinin orantılı olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum tablet ve çözelti biyoyararlanımının benzer olduğunu düşündürür [25]. APX absorpsiyonu büyük oranda ince bağırsakta gerçekleşir ve gastrointestinal sistem boyunca giderek azalır. Yiyecekler ilacın biyoyararlanımını etkilememektedir [26].

İlacın farmakodinamik özelliklerini belirlemeye yönelik yapılan INR, protrombin zamanı, parsiyel tromboplastin zamanı gibi pıhtılaşma testlerinde APX'in tek dozları, bu parametrelerde hızlı ve doza bağlı artışa neden olmuştur. Bu testler plazma konsantrasyonu- zaman profilinin doza bağlı artışını göstermiştir fakat APX'in pıhtılaşma önleyici etkisinin izlenmesinde yararlı olamamıştır. Geniş zaman aralığında tek dozlar halinde alınan APX iyi tolere edilmiştir. APX'in farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri tahmin edilebilir ve uyumlu bulunmuştur. İlacın gıdalarla etkileşimi gözlemlenmemiştir bu sebeple öğünlerle ilgilenilmeden ilaç alınabilir [27].

1.2.4. APX'in kullanım şekli ve dozu

APX piyasada Eliquis® müstahzar adı ile satışta olup 2,5 ve 5 mg film kaplı tablet halinde reçete edilir [12]. Diz veya kalça protez ameliyatı sonrasında gerçekleşebilecek venöz tromboembolizmden korunmak için 2,5 mg doz günde 2 defa alınması ve ilk doza ameliyattan 12-24 saat sonra başlanması tavsiye edilmektedir. Diz protez ameliyatı sonrası ilacın tavsiye edilen kullanım süresi 10-14 gün iken kalça protez ameliyatı sonrasında ilaç 32-38 güne kadar kullanılmalıdır. Non-valvuler atriyal fibrilasyon hastalarında inme riskini önlemek için APX, günde 2 defa 5 mg tavsiye edilir. Hastanın yaş, kilo gibi özellikleri göz önünde bulundurularak doz azaltılıp günde 2 defa 2,5 mg tavsiye edilebilir. Tedaviye uzun süre devam edilmelidir. Venöz tromboembolizm ve pulmoner embolizm hastalarının akut tedavisinde tavsiye edilen doz, 7 gün süre ile günde 2 defa 10 mg ve takip eden günlerde günde 2 defa 5 mg olup tekrarlayan venöz tromboembolizm ve pulmoner embolizmin önlenmesinde önerilen dozlama, günde 2 defa 2,5 mg şeklindedir [12, 28].

1.3. APX İçin Geliştirilmiş Analiz Yöntemleri

1.3.1. Spektroskopik yöntemler

Annareddy Gari Radhika vd. [29] APX ve tablet formülasyonu için sıfırıncı türev ve eğri altındaki alan olmak üzere iki farklı UV-Spektroskopi metodu geliştirmişlerdir. Sıfırıncı türev metodu için 279 nm dalga boyu, eğri altında kalan alan için dalga boyu

aralığı 269-289 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır. Çözücü olarak metanol kullanılmıştır. Doğrusallık için 5-25 µg/mL derişim aralığında çalışılmıştır. Sıfırinci türev için LOQ değeri 0,712 µg/mL, kalibrasyon katsayısı 0,9975; eğri altında kalan alan yöntemi için LOQ değeri 1,015 µg/mL, kalibrasyon katsayısı 0,9965'tir. Geliştirilen yöntemin validasyonu yapılmıştır, yöntem tekrarlanabilirliği yüksektir ve ekonomiktir. APX için iki yöntemin beraber kullanıldığı ilk metottur.

Kunala Anusha vd. [30] APX için sıfırinci derece ve birinci derece türev UV spektroskopi yöntemlerini pH 5,0 fosfat tamponu (Metot A) ve pH 7,0 fosfat tamponunda (Metot B) valide edilmiş metot geliştirmişlerdir. Sıfırinci türev yönteminde 276 nm dalga boyunda ve birinci türev yönteminde 264-305 nm dalga boyu aralığında çalışmışlardır. Metot A sıfırinci türev ve birinci türev için LOQ değerleri 0,164 µg/mL ve 1,818 µg/mL; Metot B sıfırinci türev ve birinci türev için LOQ değerleri 0,037 µg/mL ve 1,938 µg/mL olarak bulunmuş; korelasyon katsayılarının 0,9997'den yüksek olduğu ifade edilmiştir. Geliştirilen her iki yöntemin, APX'in farmasötik dozaj formundan rutin analizinde kullanılabileceği ifade edilmektedir.

1.3.2. Kromatografik yöntemler

Xavier Delavenne vd. [31] insan plazmasından APX'in analizi için LC-MS/MS metodu geliştirmiştir. 5-500 µg/L derişim aralığında çalışılmıştır ve korelasyon katsayısı 0,997 olarak bulunmuştur. Yöntem daha sonra farmakokinetik çalışma yapmak amacıyla 3 sağlıklı gönüllüye başarıyla uygulanmıştır.

Schmitz vd. tarafından [32] DOAİ grubunun üç ilacı olan APX, dabigatran ve rivaroksabanın plazmadan UPLC-MS/MS metodu ile analizini geliştirilmiştir. Derişim aralığı 23-750 ng/mL olarak belirlenmiştir. Korelasyon katsayısı 0,99'un üzerinde, LOD değeri 0,025 ng/mL değerinin altında bulunmuştur. APX için gerikazanım oranı %104'tür Doğruluk ve kesinlik çalışmaları için UPLC-MS/MS metoduyla karşılaştırma yapılabilecek çeşitli pıhtılaşma tahlilleri yapılmıştır. Yapılan pıhtılaşma testleri ile UPLC-MS/MS metodunun istatistiksel olarak birbirinden çok bağımsız olduğu gözlemlenmiştir ve bunun nedeninin klinik farklılık ile ilgili olup olmadığı hakkında bir yargıya ulaşılamamıştır. Bu nedenle DOAİ tanımlanırken pıhtılaşma testlerinin referans bir metot ile karşılaştırılmasının önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

Gous vd. [33] DOAİ kullanımında bireysel dozlamamanın önemli olduğunu düşündükleri için APX dahil DOAİ için LC-MS çalışması yapmışlardır. Analitler iç standartlarla beraber C₁₈ TurboFlow kolona enjekte edilmişlerdir. LC kısmında Fenil

Heksil kolon kullanılmıştır. Veriler tam tarama modunda çalışılan (100-2000 m/z) MS sonrası elde edilmiştir. Kalibrasyon eğrisi için 1-500 µg/L derişimi aralığında çalışılmıştır. Tüm analitler için LOQ değeri 1 µg/L olarak bulunmuştur. Geliştirilen metot ilaç izlemi için uygun bulunmuştur.

Kuhn vd. [34] plazmadan APX ve diğer DOAİ analizi için hızlı, hassas ve seçici bir metot geliştirmek amacıyla SPE-UPLC-MS/MS kullanmışlardır. APX için kalibrasyon eğrisi 0,5-760,0 µg/L derişimleri aralığında oluşturulmuş olup korelasyon katsayısı 0,99'un üzerinde, LOQ değeri 0,21 µg/L olarak bulunmuştur.

Jeong vd. [35] APX kullanan hastalarda periyodik görüntüleme gerekmemesine rağmen ameliyat ya da doz aşımından kaynaklı kanamalara neden olacağı için APX görüntüleme metoduna ihtiyaç duyulduğunu düşünerek plazmadan APX ve diğer DOAİ analizi için hızlı, hassas ve seçici bir metot geliştirmişlerdir. Mevcut kullanımdaki pıhtılaşma testlerinin dar konsantrasyon aralığı içermesi nedeniyle UPLC-MS/MS kullanmışlardır. İnsan plazmasında APX'in UPLC-MS/MS analizini 10-5000 ng/mL derişim aralığında gerçekleştirmişlerdir. 0,997 korelasyon katsayısı ve 1 ng/mL LOQ değerine ulaşmışlardır. Metot validasyonu sonucunda geliştirilen yöntemin klinik farmakokinetik çalışmalar için uygun olduğu sonucuna varmışlardır.

Noguez vd. [36] insan plazmasında Varfarin, APX ve diğer DOAİ tayini için UPLC-MS/MS metodu geliştirmişlerdir ve 5-1000 µg/mL derişim aralığını çalışma aralığı olarak almışlardır. 0,99 korelasyon katsayısı elde edip, LOQ değerini 1,50 ng/mL olarak bulmuşlardır.

Prabhune vd. [37] APX'in validasyon parametrelerinden biri olan APX'in seçiciliğini ölçmek için maddeyi zorlu bozundurma koşullarına tabi tutmuşlar ve oluşan bozunma ürünleri varlığında HPLC ile ayrımını gerçekleştirmişlerdir. Bozunma ürünlerinin APX pikine girişim yapmadığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmada 0,01-0,22 µg/mL derişim aralığında çalışılmıştır ve korelasyon katsayısı 0,99; APX LOQ değeri 0,15 µg/mL, oluşan bozunma ürünü 1'in LOQ değeri 0,024 µg/mL ve oluşan bozunma ürünü 2'nin LOQ değeri 0,026 µg/mL olarak bulunmuştur. Yöntem rutin kalite kontrol testleri için uygun bulunmuştur.

Zhang vd. [38] APX ve diğer DOAİ için farmakokinetik çalışmalar ve hastanede terapötik ilaç izleminin kolay, hızlı ve güvenilir olarak yapılması amacıyla insan plazmasında LC-MS/MS analizini gerçekleştirmişlerdir. 1,0-1000,0 µg/L ($r^2>0,99$)

derişim aralığında çalışılıp LOQ değeri 1,0 µg/L, geri kazanım %101,6 olarak bulunmuştur.

Tilea vd. [39] APX'in insan plazmasında LC-MS/MS analizini yapmışlardır. 0,994 korelasyon katsayısı 9,70 (LOQ)-970,00 ng/mL derişimi aralığında çalışılarak elde edilmiştir. Metot farmakokinetik çalışmaların yapılmasına ve klinikte terapötik ilaç izlemine uygun bulunmuştur.

Zhang vd. [40] UPLC-MS/MS kullanarak DOAİ'n, APX dahil, fare plazmasında analizini gerçekleştirmişlerdir. Metot validasyonu APX için 1,0-100,0 ng/mL derişimi aralığında çalışılmıştır ($r^2=0,9971$; LOQ 1,0 ng/mL). Çalışma farmakokinetik çalışmalara başarıyla uygulanmıştır.

Lagoutte- Renosi vd. [41] APX ve DOAİ için HPLC-MS/MS analizini insan plazmasında 25-1000 µg/L derişimi aralığında ($r^2>0,99$; LOQ 25,0 µg/L) gerçekleştirip 26 hasta örneğinde uygulamışlardır. Derişim aralığı hasta plazmasındaki APX'in izlenmesi için uygun bulunmuştur.

Landge vd. [42] APX ve zorlu bozma koşulları (asidik, bazik, oksidatif, ışık ve sıcaklık ortamları) sonucu oluşan 9 farklı bozunma ürünlerinin analizi için HPLC metodu geliştirmişlerdir. APX için LOQ 0,075 µg/mL ve korelasyon katsayısı 0,999 olarak bulunmuştur.

Gouveia vd. [43] APX için HPLC-DAD metodunu insan plazmasında geliştirmiştir. Çalışılan 0,017 (LOQ) -5,28 µg/mL derişim aralığında korelasyon katsayısı 0,993 bulunmuştur. Bu metodun avantajı metotta analiz için kullanılan HPLC'nin ilaç gelişim departmanlarında ve klinik laboratuvarlarda LC-MS/MS'e göre daha yaygın kullanılmasıdır.

Subramanian vd. [44] APX tablet formundan bilinen 9 bozunma ürününün HPLC analizini 0,10-1,95 µg/mL derişim aralığında gerçekleştirmiş olup korelasyon katsayısı 0,99 ve LOQ değeri 0,09 µg/mL olarak bulunmuştur. Metot optimizasyonu tasarım yoluyla kalite metodu ile yapılmıştır.

Zhao vd. [45] UPLC-MS/MS kullanarak APX'in insan plazmasında (kalibrasyon aralığı 5-500 ng/mL ve LOQ değeri 5,92 ng/mL) ve anne sütüne geçip geçmediğini kontrol etmek için insan sütünde (kalibrasyon aralığı 5-250 ng/mL ve LOQ değeri 4,99 ng/mL) analizini yapmışlardır ve korelasyon katsayısı 0,99'un üzerinde bulunmuştur. Metot insan sütünde gerçekleştirilen ilk APX analizidir.

1.3.3. Voltametrik yöntemler

APX'in voltametrik yöntemler kullanılarak tayinine ilişkin literatürde çok az sayıda çalışma vardır.

Mohamed Rizk vd. [46] karbon macunu ile modifiye edilmiş çok duvarlı karbon nanotüp elektrot (MWCNT/CPE) kullanarak döngüsel voltametri ve kare dalga voltametrisi metodu geliştirmişler ve APX'in yükseltgenme davranışını araştırmışlardır. APX, nötralize ftalat tamponu (pH 5,0) içerisinde 1,21 V potansiyelde geri dönüşümsüz difüzyon kontrollü oksidasyon davranışı göstermiştir. Derişim aralığı $1,99 \times 10^{-6}$ – $1,07 \times 10^{-4}$ mol/L ile çalışılmış ve korelasyon katsayısı 0,9996 olarak bulunmuştur. LOQ değeri $1,99 \times 10^{-6}$ mol/L olarak saptanmıştır ve elektroyükseltgenme mekanizması önerilmiştir. Bu çalışma kapsamında APX'in yükseltgenme mekanizması için tahmini bir mekanizma önerilmiştir fakat bu önerinin doğru olabileceğine yönelik bir açıklama veya destek çalışmalarına yer verilmemiştir. Literatürde APX ile ilgili elektroindirgenme çalışmasına rastlanmamıştır.

1.4. Çalışmanın Amacı

APX'in analiz ve miktar tayinine yönelik çok sayıda kromatografik ve spektroskopik çalışma bulunmaktadır. Tezin temel amacı APX'in elektroanalitik yöntemlerle indirgenme ve/veya yükseltgenme davranışlarının tayin edilmesidir. Diğer amacı ise diferansiyel puls polarografisi (DPP) yöntemi ile miktar tayininin yapılmasıdır. Ulaşılmak istenen hedef; APX için kolay uygulanabilir, hızlı, ucuz ve hassas bir elektrokimyasal yöntem geliştirip elektron transfer mekanizmasını aydınlatabilmektir. APX'in literatürdeki elektrokimyasal analiz çalışmalarında yer almayan indirgenme davranışı ile mekanizmasını araştırmak ve yine literatürde eksik kalan yükseltgenme davranışını tamamlamak hedeflenmektedir. Metot validasyonunun Uluslararası Uyum Konseyi (ICH) kılavuzlarına uygun olacak şekilde yapılmasıdır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Ölçme Yöntemi

Elektroanalitik teknikler elektrik ile kimya arasındaki ilişkiyi; akım, potansiyel, yük terimlerini kullanarak açıklamak amacındadır. Kimyasal ölçümler, homojen çözelti ortamında ve elektrokimyasal olaylar, bu ortam ile elektrot arasında gerçekleşir. Tayin için elektriksel sinyal kullanılır. Elektroanalitik ölçümler; numune hakkındaki bilgilerin membran etrafında oluşan potansiyelin ölçümüyle elde edildiği statik bir teknik olan potansiyometrik ve elektrot- elektrolit arasındaki yük transferine dayalı dinamik teknik olan potansiyostatik (kontrollü potansiyel) olmak üzere ikiye ayrılır. Ölçümlerde biri çalışma elektrodu diğeri sabit potansiyelde olan ve elektrolit içeriğinden etkilenmeyen referans elektrot olmak üzere en az iki elektrot kullanılır ve analiz elektrolit çözeltisi içerisinde gerçekleşir. Böylece elektrokimyasal hücre oluşmuş olur. Eğer hücreler enerjiyi harici bir kaynaktan tüketiyorsa elektrolitik, kendileri üretiyorsa galvanik hücre olarak adlandırılırlar. Potansiyostatik tekniklere voltametrik teknikler örnek verilebilir [47].

Voltametri, elektroaktif bileşiğin farklı pH değerlerine sahip tampon ortamlarındaki elektroanalitik olarak indirgenme- yükseltgenme davranışlarını, voltamogramlardan elde edilen akım şiddeti- yarı dalga potansiyel ($E_{1/2}$) eğrilerini kullanarak inceler [48]. Çalışmada dönüşümlü voltametri (CV), polarografi, DPP ve UV-Spektrofotometri kullanılmıştır. CV elektrokimyasal reaksiyonlar hakkında nitel bilgi elde etmek amacıyla en sık kullanılan tekniklerden biridir. CV elektrokimyasal sürecin geri dönüşümlü olup olmadığı hakkında bilgi edinilmesi, özellikle elektron alımını takip eden süreçlerin incelenmesi gibi temel çalışmalarda tercih edilen bir tekniktir. Özellikle elektroaktif bölgenin redoks potansiyellerinin hızlı şekilde bulunmasına ve çözelti ortamının redoks işlemi üzerindeki etkisinin incelenmesine olanak verir [48, 49]. Çalışmada voltametri APX'in elektron transfer mekanizmasını aydınlatmak amacıyla kullanılan ilk tekniktir.

Polarografi, 1922 yılında Jaroslav Heyrovsky tarafından Çekoslovakya'da geliştirilmiştir ve 1959 yılında Nobel Kimya Ödülü'nü getirmiştir. Voltametrinin alt çalışma alanıdır. Çalışma elektrotunun damlayan cıva elektrot (DCE) olması yöntemin polarografi olarak adlandırılmasına sebep olmuştur. Elektrot yüzeyinin yenilenebilir olması ve geniş katodik potansiyel aralığı tekniği ayıran önemli özelliklerdir. Genellikle indirgenebilir türlerin tanımlanmasında kullanılır [50]. Cıva elektrot kullanılmasının dezavantajı cıvanın elektrolitik çözünürlüğünün + 0,4 V'da (vs doymun kalomel elektrot)

olması nedeniyle daha pozitif potansiyellerde deney yapılamamasıdır. Aynı zamanda cıva toksik bir element olduğu için çalışırken dikkat edilmelidir. 25°C oda sıcaklığına sahip ve havalandırılan laboratuvarlarda cıva toksisitesinden söz edilemez. 80°C ve üzeri olan sıcaklıklarda cıvanın buhar basıncı toksik seviyelere ulaşır [51]. Çalışmada polarografi APX'in elektroindirgenme mekanizmasının aydınlatılması için kullanılmıştır.

DPP tekniği, cıva damla elektrotunun belirli aralıklarla genellikle 50 mV genlik potansiyeline sahip darbelerle doğrusal potansiyel taramaya maruz bırakılması ile oluşturulur. Darbe, çekiç yardımıyla oluşturulur ve cıvanın düşüşünün son 50 milisaniyesinde uygulanır. Akım ölçümü darbeden 15 milisaniye önce ve cıva damlasının düşmesinden 15 milisaniye önce olmak üzere 2 defa yapılır ve daha sonra akımlar arasındaki fark yarı dalga potansiyeline karşı grafiğe geçirilir. Elde edilen diferansiyel eğri pik şeklindedir ve pikin yüksekliği derişimle doğru orantılıdır. DPP voltametrik tekniklerin duyarlılığını artırır; tayin alt sınırı 10^{-7} - 10^{-8} M aralığına kadar düşmektedir [52]. Çalışmada DPP, APX'in miktar tayini ve validasyon çalışmalarını tamamlamak için kullanılmıştır.

pK_a , asit iyonlaşma sabiti olan K_a değerinin negatif logaritmik değeridir ve maddelerin çözünürlüğü, bozunma kinetiği, etki mekanizması, kompleks oluşturma yeteneği ve proteine bağlanma yeteneği hakkında bilgi verir [53]. pK_a tayini potansiyometrik titrasyon, spektrofotometrik yöntemler ve kapiller elektroforez gibi yöntemlerle yapılabilir. Eğer madde çok zayıf asit veya bazsa veya yeteri kadar çözünemiyorsa potansiyometri yerine Ultraviolet (UV)-Visible (Vis) spektrofotometri tercih edilir [54]. Çalışmada APX'in pK_a analizi için UV spektrofotometri kullanılmıştır. Spektrofotometrik yöntemlerin en önemli avantajı, molekülün analitik tayinini yüksek hassaslıkta yapmalarıdır [55]. UV spektrofotometri cihazları bir ışık kaynağı, tek dalga boylu ışın çıkışı için genellikle prizma veya kırınım ızgarası bulunduran monokromatör; opak, transparan ve aynadan oluşan ve monokromatik ışını ikiye bölen ve bir kısmını örneğe bir kısmını referansa gönderen disk, örnek ve referans numune kapları ve dedektörden oluşur. Işık kaynağı olarak döteryum lamba (180-350 nm), tungsten ve hidrojen lamba (330-900 nm) kullanılabilir [56].

2.1.1. Voltametri

Aktif farmasötik bileşiklerin ve elektroaktif maddelerin tanımlanmasında kullanılan elektroanalitik teknikler hassas, hızlı, seçici, ucuz ve çevre dostu tekniklerdir. Daha uygun olmaları, kolay uygulanabilirlikleri, kısa analiz süreleri diğer tekniklere göre

avantajlarıdır. Voltametrik teknikler elektroaktif kimyasal bileşiklerin indirgenme-yükseltgenme davranışlarının incelenmesi için en uygun tekniklerdir [57, 58].

2.1.1.1. Döngüsel Voltametri

Yenilenmeyen yüzey elektrotların kullanılarak potansiyel değiştirilirken sonuç olarak değişen akımın ölçüldüğü ve potansiyel- akım eğrilerinin elde edildiği tüm teknikler voltametri olarak adlandırılır. Doğrusal süpürme voltametrisi (LSV) ve CV olmak üzere iki ana voltaj taraması biçimi kullanılmaktadır. CV’de ileri taramadan sonra ters yönde geri tarama gerçekleşirken LSV’de keskin bir akım artışını yavaş bir akım azalması izler [49].

CV; redoks mekanizmasının termodinamiği, elektron transfer mekanizmalarının kinetiği, adsorpsiyon prosesleri hakkında hızlı ve önemli bilgiler sağlamaktadır. Elektroanalitik çalışmalarda genellikle tercih edilen ilk tekniktir. CV, sabit çalışma elektrodunun potansiyelini doğrusal olarak tarayarak üçgen şekilli potansiyel dalga formları oluşturur. Elektrottaki elektronların enerjisini modüle etmek için elektrotta potansiyostat gibi harici bir güç kaynağından voltaj uygulanır. Tarama sırasında potansiyostat, uygulanan potansiyelden kaynaklanan akımı ölçer [50]. Bu yöntem için kullanılan elektrotlar altın, platin, karbon gibi elektriksel olarak iletken yapıları elektrotlardır. Elektrokimyasal indirgenme olayı, yükseltgen maddenin elektrottan elektron transferiyle indirgenmesi sonucu gerçekleşir. Deney ortamında gerçekleşen elektron transferi sırasında elektriksel nötrlüğün korunması için iyonlar gereklidir. Bu sebeple destek elektroliti (elektrolit çözeltisi) olarak adlandırılan tuz çözeltileri (tampon çözeltiler) kullanılır. Elektrokimyasal reaksiyonun gerçekleştiği deney hücresinde üç tip elektrot yer almaktadır. Çalışma elektrodunda elektrokimyasal olay gerçekleşir. Potansiyostat ayrıca çalışma elektrodunun potansiyelini referans elektroda göre kontrol etmek için kullanılır. Potansiyostat, çalışma elektroduna bir potansiyel uygular ve çalışma elektrotu ile karşıt elektrot arasında akan akımı ölçer. Karşıt elektrot, elektrik akışını tamamlamak için kullanılır. Akım, elektronların çalışma elektrodu ile karşıt elektrot arasındaki akışı sırasında ölçülür. Böylece çalışma elektrodu yüzeyinde gerçekleşen elektrokimyasal reaksiyonların ölçüm ve kontrolü sağlanır. Çalışma elektrodu deneye uygun olacak şekilde değiştirilebilir. Yenilenemeyen yüzeye sahip katı elektrotlar kullanıldığı için her analiz sonrası elektrodun temizlenmesi gerekmektedir. Referans elektrot, elektrokimyasal hücredeki diğer elektrotlar arasında referans noktası olarak kullanılır. Doygun kalomel elektrot (SCE), standart hidrojen elektrot, Ag/AgCl elektrot

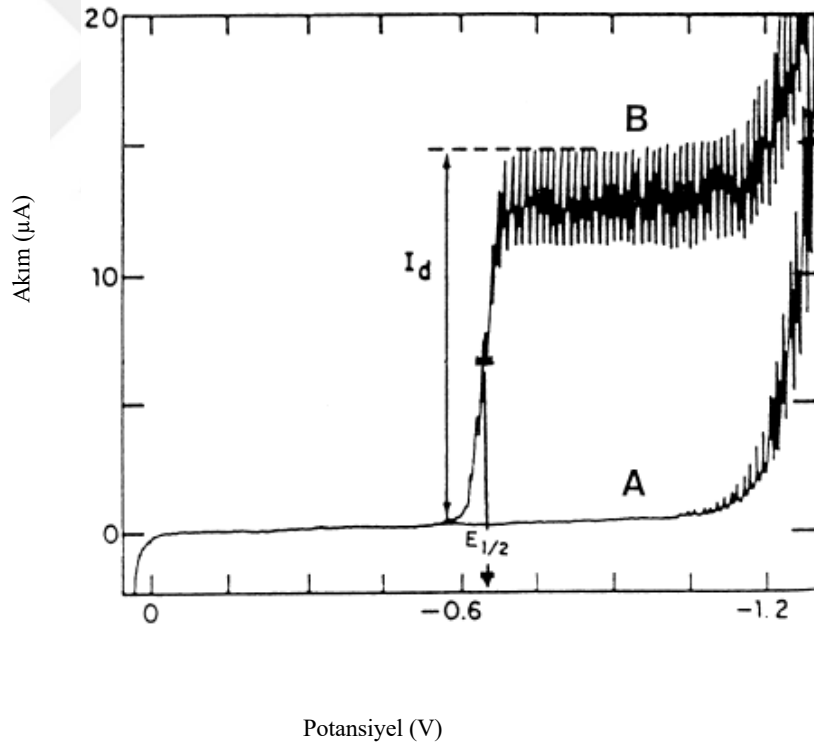
örnekleridir. Elektrokimyasal süreci oksijenin indirgenmesinden korumak için inert bir gaz olan azot gazının birkaç dakika hücre içerisinden geçmesi gerekmektedir [59, 60].

Döngüsel voltametri çalışmasında camsı karbon elektrot (GCE) kullanılmıştır. Elektrokimya, elektrot yüzeyinde gerçekleşen yük ayrımı ile ilgili olduğu için seçilecek çalışma elektrotu önemlidir; elektrotun destek elektrolit içerisinde çalıştığı potansiyel aralık dikkate alınmalı ve her zaman en kaliteli ve saf malzeme seçilmelidir. Potansiyel aralık genellikle destek elektrolitinin indirgendiği ya da yükseltgendiği potansiyel sınıra göre belirlenir. Katı elektrotlar cıva elektrotu göre daha pozitif potansiyel aralığa sahiptir, karbon elektrotta anodik aralık +2,0 V'ye kadar çıkabilir, fakat cıva elektrot gibi yenilenebilir yüzeye sahip olmadığı için tekrarlanabilirliğin kontrol edilmesi daha zordur [61]. Karbon elektrotlar camsı karbon, grafit, elmas, karbon nanotüp elektrotların olduğu grup olan homojen ve karbon pastası, modifiye karbon pastası elektrotların bulunduğu heterojen grup olmak üzere ikiye ayrılır ve farklı çeşitler halinde bulunurlar, maliyetleri kullanılan diğer elektrotlara göre uygundur. Geniş potansiyel aralığı, zengin yüzey kimyası, düşük artık akımı, kimyasal olarak inert olması ve birçok elektroaktif maddenin analizi için uygun olması sebebiyle karbon elektrotların kullanılışları yaygındır [62]. GCE yüzeyinde diğer katı elektrotlara göre daha ufak gözenekler bulunur, bu elektrotlar kolayca monte edilir, parlatılır ve yaygın olarak kullanılan destek elektrolitleri ile uyumludurlar [63].

2.1.1.2. Polarografi

Polarografi, incelenmekte olan çözeltinin elektrolizinden kaynaklanan akım değişikliğinin, yenilenebilir yüzeye sahip DCE kullanılarak uygulanan potansiyelin sürekli arttırılmasıyla, akım- yarı dalga potansiyel eğrilerinin ölçümünü sağlayan elektrokimyasal tekniktir. Çalışma elektrotunun potansiyeli doğrusal olarak değiştirilir. Cıvanın geniş potansiyel aralığı (-3,0 V- +0,4 V) birçok organik ve inorganik türlerin elektroindirgenme davranışını anlamamızı sağlar [64, 65]. Polarografi nicel ve nitel tayin sağladığı için sıkça kullanılır [66]. Cıva üzerindeki hidrojenin yüksek aşırı geriliminden dolayı cıva elektrotlar negatif potansiyellerde kullanılabilir. Ayrıca DCE'un en belirgin özelliği cıvanın sürekli yenilenmesi ve böylece ölçümün önceki elektrokimyasal işlemde etkilenmemesidir. Cıva elektrotlarla elde edilen sonuçların tekrarlanabilirliği polarografinin en önemli özelliğidir [67]. Polarografi metodunun çalışma elektrotu olan cıva elektrot; cıva rezervuarından hortum ile bağlı olduğu, içerisinde saç teli kadar boşluk bulunan bir cam kılcal borunun alt ucundan küçük cıva damlacıkları halinde oluşur.

Elektrotta gerçekleşen akım türü belirlendikten sonra akım yüksekliği kullanılarak nicel analiz olan miktar tayini çalışmaları, yarı dalga potansiyeli kullanılarak nitel tayin yapılabilir [68]. Çalışma elektrotunda elektrolize uğrayan madde olan depolarizörün tayini depolarizörün oluştuğu yarı dalga potansiyeli ile belirlenir. Polarografik analizlerde analizi yapılan maddenin akımındaki büyüklük maddenin elektrot yüzeyine ulaşma hızı ile sınırlıdır ve bu nedenle belli bir potansiyel değerden sonra akımda artış görülmez, bu akımın büyüklüğü sınırlayıcı akımdır. Elektroaktif madde elektrot yüzeyine ulaşmadan çözeltideki diğer bileşenlerden dolayı önce küçük bir akım gözlemlenir ve bu akıma da artık akım denilir. Genellikle sınırlayıcı akımın yarısına denk gelen anda potansiyel ölçülür, bu sebeple nitel tayin için ölçümün alındığı potansiyel, yarı dalga potansiyeli adını almıştır [69]. Bu potansiyel değeri maddeye özgü olduğu için nitel analiz yapılmasına imkân sağlar. Şekil 2.1’de Cd^{+2} metalinin 1 M hidroklorik asit içerisindeki analizine ait akım yüksekliği ve yarı dalga potansiyeli gösterilmiştir.



Şekil 2.1. (A) 1 M hidroklorik asite ait polarogram, (B) 1 M hidroklorik asit içerisindeki 4×10^{-4} M Cd^{+2} metaline ait polarogram (id sınır akımı, $E_{1/2}$ yarı dalga potansiyeli.) [50]

Polarografide bilinen 4 önemli sınırlayıcı akım türü vardır; difüzyon akımı, kinetik akım, katalitik akım ve adsorbsiyon akımı. Elektrotta gerçekleşen akımın türünü bulmak için depolarizör konsantrasyonu, cıva rezervuar yüksekliği, tampon çözeltinin pH değeri ve içeriği, sıcaklık gibi etkenler değiştirilerek yapılan deneyler sonucunda elde edilen veriler kullanılır [69]. Çalışma elektrotunda elektrolize uğrayan madde olan depolarizör, çözeltiden elektrot yüzeyine difüzyon kontrolü ile hareket ediyorsa akım türünün difüzyon akımı (i_d) olduğu söylenebilir. Difüzyon akımının gerçekleşmesi, depolarizörün miktar tayini ve mekanistik incelemesinin yapılmasını sağlar. Akım türünü belirlemeye yönelik iki adet çalışma yapılması gerekmektedir; madde sabit asitlik derecesine sahip destek elektrolit içerisinde farklı derişimlerde analiz edilir ve derişim-akım grafiği oluşturulur. Diğer çalışma sabit madde derişimi ve destek elektrolitinde rezervuar yüksekliğinin değiştirilerek analizlerin gerçekleştirilmesi ile tamamlanır. Bu çalışma sonucunda rezervuar yüksekliğinin kareköküne karşılık akım grafiği çizilir. Oluşturulan iki grafiğin de doğrusal olması madde üzerinde gerçekleşen indirgenmenin difüzyon akımıyla oluştuğunu gösterir. Bu durumda akım, difüzyonla taşınan madde miktarına bağlı olur. Difüzyon akımı tampon içeriği ve ortamın asitlik derecesinden bağımsızdır. Cıva damlasının damladığı andaki difüzyon akımı Ilkovic denklemiyle ifade edilir [70];

$$i_d = 708nD^{1/2}m^{2/3}t^{1/6}C \quad (2.1)$$

Burada, i_d = cıva damlasının damladığı andaki akım (amper), n = transfer edilen elektron sayısı, D = difüzyon katsayısı (cm^2/s), m =cıva akış hızı (g/s), t = cıvanın kılcaldan akış süresi (s), C = derişim (mol/cm^3)’dir.

Kinetik akım (i_k), elektrot yüzeyi veya yakınında gerçekleşen kimyasal bir reaksiyonun hızı ile sınırlandırılır. Kinetik akımın sınırlandığı maksimum hız elektrot yüzeyindeki kimyasal reaksiyonun hızı ile belirlenir. Proton transfer reaksiyonları, dehidrasyon ve halka kırılma reaksiyonlarında rastlanır. Kinetik akım tampon içeriğine bağımlı olabilir, ortamın asitlik derecesine bağımlıdır [70].

Katalitik akım (i_c), polarografik olarak inaktif olan katalistin polarografik olarak aktif olan maddenin indirgenme potansiyelini pozitif ya da oksitlenme potansiyelini daha negatif potansiyellere kaydıran katalitik etkileriyle sınırlandırılır. Tiyoal gruba sahip moleküllerin kobalt tuzlarının amonyak çözeltiğinde katalitik dalga vermesi bu akım türüne örnektir. Katalitik akım, kullanılan tampon çözeltinin içeriğine ve ortamın asitlik derecesine bağlıdır [69].

Absorbsiyon akımı (i_a), depolarizörün yükseltgenmiş veya indirgenmiş formunun, maddenin kendisinin veya ara ürününün elektrot yüzeyinde absorblanması ile oluşur. Depolarizör maddenin ya da ara ürününün elektrot yüzeyinde birikmesi ile oluşan katman, elektroliz hızının değişmesine ya da elektrolizin engellenmesine neden olabilir. Absorbsiyon akımı genellikle tampon içeriğinden ve asitlik derecesinden bağımsızdır [71].

Destek elektrolit çözeltilerinde bir miktar oksijen çözünmüş halde bulunur. Oksijen, polarografide indirgenme davranışı göstererek eşit büyüklükte iki dalga oluşturur. Oksijeni çözeltiden uzaklaştırmanın iki yolu vardır. Fiziksel yol; azot, hidrojen, helyum, argon veya diğer bazı saf ve inert gazlar gibi polarografik inaktif gazların çözeltiden birkaç dakika boyunca geçirilmesine dayanır. Diğer yol kimyasal maddelerin oksijen ile reaksiyonuna dayanır. Örneğin bazik çözeltilerde alkali metal sülfidleri çözünmüş oksijenin kimyasal indirgenmesi sağlanır ve pH 8'in üzerinde polarografik dalgaya rastlanılmaz. Reaksiyon sonucunda oluşan ürünler de polarografik inaktiftir [72]. Metot için uygulanacak en uygun yol seçilmelidir. Bu çalışmada azot gazı ile oksijenin fiziksel olarak ortamdan uzaklaştırılması yoluna gidilmiştir. Azot gazı çözeltiden 5 dk boyunca geçirilip daha sonra analizler yapılmıştır.

2.1.1.3. Diferansiyel puls polarografisi

Polarografi, farmasötik preparatlar içerisindeki elektroaktif maddelerin analizi için oldukça hassas bir tekniktir fakat farmasötik araştırmalar sırasında ilaçların biyolojik materyallerden analizi için kullanılmasında yetersiz kalmıştır. Barker ve Jenkin [73], puls voltametrisini geliştirerek analizlerde tayin limitini düşürmeyi başarmıştır.

Elektrolitik hücreye uygulanan potansiyel ile akım elde edilir ve bu akım hedef analit derişimi ile doğru orantılı olabilir. Elektrotta gerçekleşen redoks reaksiyonu, elektron transferini termodinamik veya kinetik olarak elverişli kılan potansiyel bölgede gerçekleşmiş olabilir. Burada oluşan akım Faraday'ın Elektroliz Yasası'na uyduğu için faradaik akım olarak adlandırılır. Böylece akım ile analit derişimi arasında doğru orantı kurulabilir [47].

Elektrot çift tabakası, elektrot yüzeyinde oluşan yük ile elektrolitte bulunan iyonların oluşturduğu yapıdır. Bu yapı kapasitör olarak çalışır. İki tabaka arasında ekstra yük akışı oluşur ve bir akımı temsil eder. Bu akım kapasitif akım olarak adlandırılır ve faradaik akıma ek olarak oluşur, istenmeyen bir akımdır. Çünkü özellikle düşük derişimlerde çalışırken hassasiyet ve doğruluğu etkiler. Normal polarografide kapasitif

akım yüksektir, bu durum hassasiyeti azaltır. DPP tekniği için prensip, çekiç ile mekanik darbeler oluşturarak damla süresinin kontrol edilmesidir. Çekiç, cıvanın damlama süresi ile senkronize hale getirilir. Damlanın düşmesine yakın olduğu noktada, faradaik akım maksimum ve kapasitif akım minimumdur. Böylece, DPP tekniği faradaik ve kapasitif akım arasındaki oranı yükselterek analiz edilen maddenin derişimini 10^{-8} M'a kadar düşürür [74, 75].

Normal puls polarografisinde (NPP), potansiyel başlangıç değerinde sabit tutulur ve çekiç, elektrota artan genliklerle darbe uygular. Her darbe uygulandığında akım ölçülür. Elde edilen eğri normal polarografik eğrilere benzer fakat hassasiyet normal polarografiye göre daha yüksektir [76]. DPP'de, potansiyel sabit olarak uygulanmaz, artarak devam eder. Sabit büyüklükteki darbeler, cıva damlamadan hemen önce ve damladığı anda çalışma elektrotuna uygulanır. Oluşan faradaik ve kapasitif akımlar ölçülmüş olur ve bu akımların farkı alınır. DPP, NPP'ye göre daha kısa süreli darbeler oluşturduğu için analizler daha hızlı ve süresi daha kısadır. Faradaik akım ile kapasitif akım arasındaki fark çok daha fazla olduğu için daha hassas ölçümler yapılmış olur. Elektrotta gerçekleşen akım türü difüzyon akım ise DPP tekniği miktar tayini yapmaya olanak sağlayan bir tekniktir [77].

2.1.2. UV spektrofotometri

K_a , asit iyonlaşma sabitidir. pK_a , K_a değerinin negatif logaritmik hali olup maddenin iyonlaşma yeteneği olarak tanımlanır. Maddenin çözünürlük, lipofiliklik, permeabilitesi gibi özellikleri hakkında bilgi verir. İyonize olabilen bir grup taşıyan maddeler için pK_a , maddenin %50'sinin iyonize olduğu pH olarak tanımlanır. Çoğu farmasötik madde sulu çözeltide iyonlaşmış halde bulunur. Çözünürlük veya maddelerin biyolojik aktivite gösterebilmesi için iyonize olabilen grup taşımaları gereklidir. pK_a , molekülün farklı pH değerlerinde hangi iyonik formu alacağını anlamaya yardımcı olur. İyonizasyon durumu bileşiğin difüzyon hızını ve vücutta bulunacağı ortamı da belirler. İlacın pK_a değeri ilaç metabolizması, membran geçişi [78]; emilim, dağılım, metabolizma ve atılım hakkında birçok bilgi verir [79]. Bu sebeple yeni molekül geliştirme aşamalarında K_a 'nın doğru metot ile tanımlanması önemlidir [80].

Spektrofotometrik ölçümler için tayin edilecek bileşik iyonize gruplarına yakın konumda kromofor gruba sahip olmalıdır, böylece iyonize ve nötr durumdaki bileşiğin spektral ölçümü arasındaki farkı gözlemlemek mümkün hale gelir. Spektrofotometrik yöntemlerden UV-Vis yöntemi bu amaçla kullanılır. Bileşiğin emilim spektrumu,

kullanılan tampon çözeltinin asitlik derecesinin değiştirilmesi ile değişir. En büyük değişiklik, sulu çözeltinin pH değeri bileşiğin pK_a değerine eşit olduğunda gerçekleşir [81]. Bu yöntem; morötesi (UV, 190-380 nm) ve görünür ışığın (Vis, 380-750 nm), bileşiklerle etkileşimini ölçebilen bir yöntemdir. Görünür bölge için tungsten- halojen lamba, UV bölge için döteryum, hidrojen lamba tercih edilir [82]. Bu teknik, UV ışığın analiz edilen madde tarafından Emilimini ölçerek çalışır. UV spektrofotometrisi temel olarak molekölün enerji seviyeleri arasında elektron geçişlerini incelemeye dayanır. Kullanılan temel yasa Lambert-Beer yasası olup bu yasa; Emilimin, madde derişimi ve moleköl Emilim katsayısı ile doğru orantılı olduğunu belirtir. UV spektrofotometri, pK_a tayini dışında organik ve inorganik bileşiklerin yapılarını belirlemek ve miktar tayini yapmak için de tercih edilebilmektedir [83].

2.2. Sonuçların Değerlendirilmesi

Polarografik analizler sonucu elde edilen polarogramlardan madde pikine ait akım yüksekliği ve maddenin yarı dalga potansiyeli analitik yanıt olarak alınmıştır. Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile elde edilen validasyon sonuçlarının gruplar arası uyumu Microsoft Excel kullanılarak incelenmiştir.

2.3. Yöntem Geliştirme ve Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)

Geliştirilen yöntem için ICH kılavuzunda belirtilen şekilde metod geçerliliği sağlanmıştır. Yöntemin kılavuzda belirtilen analitik kriterleri sağladığı gösterilmiştir. Bu amaçla seçicilik, çalışma aralığı, teşhis ve tayin alt sınırı, doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, sağlamlık ve kararlılık çalışmaları yapılmıştır.

2.3.1. Seçicilik

Seçicilik; analite ait sinyalin, ortamda bulunan girişim yapabilecek diğer maddelerin varlığında tayin edilebilmesidir. Spesifiklik; ortamda bulunan diğer bileşenler varlığında analitin kesin olarak değerlendirilebilmesidir. Analit için seçici olan yöntemin aynı zamanda o analit için spesifik olduğu söylenebilir. Bu amaçla tablet formülasyonu etken madde içermeyen hazırlanmış ve uygun şekilde seyreltilip analiz edilmiştir, aynı zamanda yardımcı maddeleri içeren formülasyon çözeltisine etken madde eklenerek analiz yapılmıştır. Geliştirilen miktar tayini metodunun müstahzara uygulanması sırasında da tabletin analizi gerçekleştirilmiştir.

2.3.2. Doğrusallık

Bir analitik prosedürün doğrusallığı, belirlenen çalışma aralığı içerisinde, analitin konsantrasyonu ile doğru orantılı olan veya yapılan matematiksel dönüşüm sonrasında doğru orantılı olan test sonuçları elde etme yeteneğidir. Doğrusallık kalibrasyon eğrisi oluşturulduktan sonra elde edilen kesim, eğim ve korelasyon katsayısının karesi (r^2) ile ifade edilir. Analizden elde edilen maddeye ait pikteki akım yükseklikleri kalibrasyon eğrisi oluşturmak için kullanılmıştır.

Geliştirilen yöntemin doğrusallığının belirlenmesi için stok APX standart çözeltisi %20-200'üne karşılık gelecek şekilde (0,002; 0,004; 0,006; 0,008; 0,010; 0,012; 0,015; 0,017 ve 0,020 mM) 9 farklı konsantrasyon seviyelerinde tampon çözeltilerde seyreltilip analiz edilmiştir.

Analizler en az üç tekrarlı olarak yapılmıştır, verilerin ortalamaları hesaplamada kullanılmıştır. Doğrusallık, gün içi ve günler arası olacak şekilde çalışılmıştır. Elde edilen lineer regresyon analizleri incelenmiştir.

2.3.3. Doğruluk

Analitik yöntemin doğruluğunu analiz sonucunda elde edilen değerlerin gerçek değere yakınlığı belirler. Doğruluk testleri için geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Derişimi bilinen numunenin analiz edilip daha sonra sonuçların ölçülen ve gerçek değer arasındaki karşılaştırılması amaçlanmıştır. Deneyler için üç farklı seviyede (%80, %100 ve %120) olmak üzere düşük seviyede (0,008 mM), orta seviyede (0,010 mM) ve yüksek seviyede (0,012 mM) APX tablet çözeltileri hazırlanmıştır. Her seviye için 3 paralel set hazırlanıp elde edilen sonuçların ortalama, standart sapma (SS), bağıl standart sapma (%BSS) ve güven aralığı (%95 güven seviyesinde) ile ortalama geri kazanımları hesaplanmıştır.

2.3.4. Kesinlik

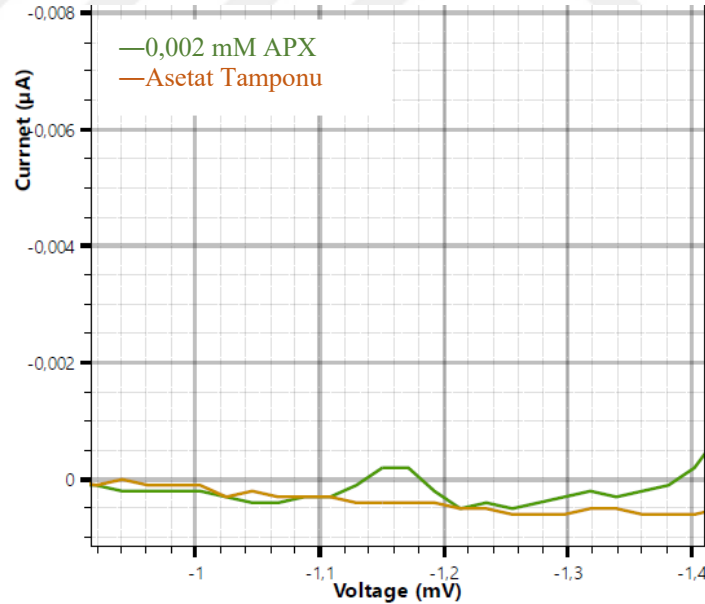
Tekrarlı analizlerin birbirine yakınlık ölçüsü kesinlik olarak tanımlanır. Kesinliğin belirlenebilmesi için gün içi tekrarlanabilirlik, ara kesinlik ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaları yapılmalıdır. Gün içi tekrarlanabilirlik çalışmaları analizin aynı laboratuvarında aynı analist tarafından bir iş gününde gerçekleştirilmesiyle tamamlanır. Ara kesinlik çalışmaları, analizin farklı analistler tarafından farklı ekipmanlarla gerçekleştirilmesiyle yapılır.

Geliştirilen metot için hazırlanan stok tablet çözeltisi standart çözeltilerin %100 noktasına gelecek derişimde (0,010 mM) seyreltilerek üç gün art arda 3 tekrarlı olarak

analiz edilmiştir. Ara kesinlik çalışmaları farklı analist tarafından yapılmış ve sonuçlar varyans analizi kullanılarak yorumlanmıştır. Sonuçların ortalama, SS, ortalama standart hata, %BSS ve güven aralığı (%95 güven seviyesinde) hesaplamaları istatistiksel olarak yapılmıştır.

2.3.5. Gözlenebilirlik (LOD) ve tayin sınırı (LOQ)

Gözlenebilirlik sınırı (LOD), analitin laboratuvar koşullarında geliştirilen metot ile analizi sonrası yarı dalga potansiyelinin ve akım yüksekliğinin tespit edilebildiği fakat kesin miktarının ölçülemediği en düşük derişimdir. LOD nitel analiz verir, analitin varlığının görüldüğü en düşük derişimdir. Tayin sınırı (LOQ) ise analitin miktarsal olarak tespit edilebildiği, kabul edilebilir doğruluk ve hassasiyetle belirlenebilen en düşük derişimdir. LOQ, LOD değerinin üç katı olarak tahmin edilebilir. Bu amaçla metot için polarogramda elde edilen gürültü sinyalinin 3,3 katını veren derişim belirlenip çözeltisi hazırlanmıştır. 6 tekrarlı olacak şekilde analizi yapılmıştır. Tayin sınırı için, gürültünün 10 katını veren derişim belirlenip çözeltisi hazırlanmıştır ve 6 tekrarlı olmak üzere analizi yapılmıştır. Şekil 2.2’de destek elektroliti ile 0,002 mM APX çözeltisine ait polarogramlar verilmiştir.



Şekil 2.2. APX'e ait pH 4,75 asetat tamponu ortamında LOQ polarogramı

(A, 0,002 mM APX, B, pH 4,75 asetat tamponu)

2.3.6. Kararlılık

Metotta veya analitte meydana gelen küçük değişikliklerden yöntemin etkilenmeden kalabilmesi kararlılık olarak değerlendirilir. Kararlılık çalışmaları yöntemin güvenilirliğini gösterir. Bu amaçla APX stok çözeltisi (10 mM) ACN ile seyreltilmiş ve belirlenen aralıklarla (24, 48 saat, üç hafta boyunca -20 °C ve üç donma-çözülme döngüsü şeklinde) analit kararlılığını incelemek için analiz edilmiştir.

2.3.7. Sağlamlık

Sağlamlık çalışmalarının amacı geliştirilen yöntemin metot parametrelerinde gerçekleşen değişikliklerden etkilenmediğinin kanıtıdır. Aynı numunelerin farklı laboratuvarlar, analistler, reaktifler, aletler gibi çeşitli koşullar altında analiziyle elde edilen test sonuçlarının tekrarlanabilirliği ile izlenir. Yöntem için sağlamlık testleri yapmak amacıyla APX stok çözeltisi %100 derişim seviyesinde analize hazırlanmıştır. Bu amaçla önce enstrümental parametreler olan cıva rezervuar yüksekliği, darbe yüksekliği, darbe genişliği, tarama hızı; daha sonra deneysel parametreler olan tamponun pH değeri ve tampon içeriğinin derişimi parametrelerinde %10 oranında azaltma ve arttırma yapılarak meydana gelen sapmalar hesaplanmıştır.

2.4. Kullanılan Araç ve Gereçler

Polarografi ve DPP deneyleri için ENTEK (Türkiye) marka Polarographic Analyzer 2017 Model 510, Entek Graph Viewer yazılım kullanılmıştır. Kapiller elektrot özellikleri; m 2 mg/s, t_i 4 saniye, rezervuar yüksekliği 64 cm'dir. Polarografik deneyler kalousek hücre kullanılarak yapılmıştır ve SCE referans elektrot olarak kullanılmıştır. Polarografi özellikleri; tarama hızı 5 mV/s, akım aralığı 0,01 mA, tarama aralığı 2,5 V -2,5 V; DPP özellikleri; darbe genliği 50 mV, darbe genişliği 50 ms, akım aralığı 0,01 mA ve tarama hızı 30 mV/s olarak ayarlanmıştır.

CV deneyleri BioLogic (ABD) marka SP-50 model potansiyostat ile EC-Lab yazılım kullanılarak yapılmıştır. Analizler üç elektrotlu cam hücre içerisinde gerçekleştirilmiştir. Çalışma elektrotu olarak GCE, referans elektrot olarak Ag/AgCl ve karşıt elektrot olarak platin tel kullanılmıştır. Analiz tarama hızı 100 mV/s, tarama aralığı 2,5 V – -2,5 V olarak ayarlanmıştır. Tüm voltametrik tekniklerle çalışılırken her analiz öncesi hücreden 5 dk süre ile azot gazı geçirilmiştir.

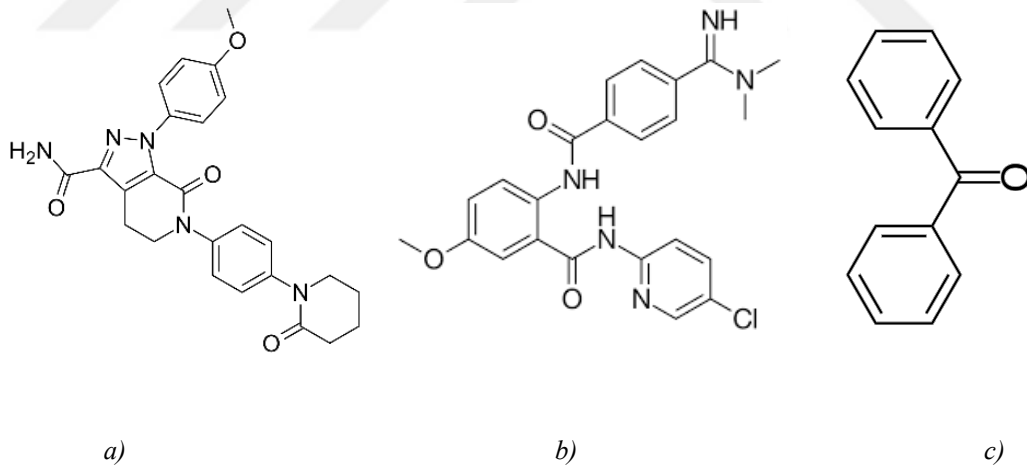
pK_a tayini için yapılan spektrofotometrik deneylerde Agilent (ABD) marka 8453 UV-Spektroskopi ve Agilent marka, ışık yolu $l=1$ cm ve 3,0 mL hacimli kuartz hücre kullanılmıştır. FT-IR spektrum analizi Perkin-Elmer (ABD) marka Spektrum One

(Version 5.0.1.1.) ile yapılmıştır. Frekanslar cm^{-1} olarak ifade edilmiştir. Erime sıcaklığı tayini için Krüss Optronic (Almanya) erime noktası ölçer kullanılmıştır.

Kullanılan diğer yardımcı araçlar; Ohaus (ABD) marka AP250D model analitik terazi, Bandelin (Almanya) marka RK 156 BH model ultrasonik banyo, Heidolph (Almanya) marka MR 3004 model manyetik karıştırıcı, Merck marka Millipore Simplicity ultra saf su cihazı, çözelti hazırlanırken 20-200 μL ve 100-1000 μL aralığında çalışabilen Rainin (ABD) marka LTS model pipetlerdir. Hazırlanan çözeltilerin pH ölçümleri için HANNA marka HI5521 model pH metre kullanılmıştır.

2.5. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Standart madde olarak kullanılan %99,9 (*a/a*) saflıkta APX ve model bileşik olarak kullanılan BTX Molekula (ABD)'dan satın alınmıştır. APX'in farmasötik preparatı olan Pfizer (ABD) firmasına ait Eliquis® eczaneden, diğer model bileşikler olan benzofenon Merck (ABD) ve Ti_2SO_4 Fluka (ABD) firmalarından satın alınmıştır. Tampon çözeltiler için kullanılan $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, H_3PO_4 ve NH_4Cl Riedel-de Haen (ABD); H_3BO_3 BioShop (Kanada), NH_3 ve HCl Merck ve CH_3COOH , NaCl ile NaOH Sigma Aldrich (ABD)'ten satın alınmıştır.



Şekil 2.3. a) APX, b) BTX ve c) benzofenonun kimyasal yapıları

2.5.1. APX standart maddesinin saflık kontrolleri

APX standart maddesi saflık kontrolü amacıyla IR spektrofotometresi ile analiz edilmiştir. Ayrıca erime sıcaklığının literatürde belirtilen aralıkta olup olmadığı kontrol edilmiştir.

2.5.2. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması

2.5.2.1. Stok ve standart çözeltilerin hazırlanması

Voltametik çalışmalarda kullanılan APX, BTX ve benzofenon stok çözeltileri 10 mM derişimlerde ACN içerisinde hazırlanıp oda sıcaklığında, ışıktan korunarak muhafaza edilmiştir. Stok çözeltiler her analiz öncesi taze hazırlanmıştır. Analiz için gerekli seyreltmeler voltametik hücrelerde yapılmıştır. Her analiz öncesi voltametik hücre içerisindeki destek elektrolitinden 5 dk süre ile azot gazı geçirilmiştir.

APX'in pK_a tayini için yapılan UV-Vis çalışmalarda stok APX çözeltisi ACN içerisinde 1 mM derişimde hazırlanmıştır. Stok çözelti, analiz için gerekli olan tampon çözeltilerde son derişim 0,03 mM olacak şekilde seyreltilmiştir.

2.5.2.2. Tampon çözeltilerin hazırlanışı

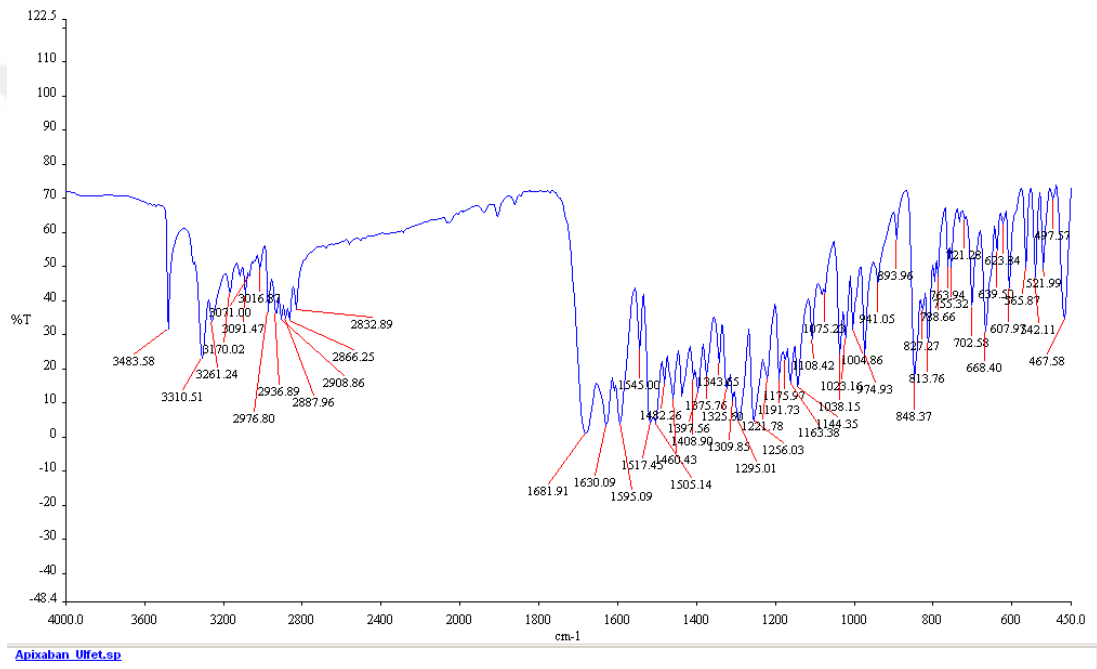
APX'in indirgenme davranışının araştırılması ve mekanistik çalışmalar için 0,00-12,50 pH aralığında sulu tampon çözeltiler hazırlanmıştır. Temel çalışma aralığı 3,75-12,50 pH olarak belirlenmiştir. Tampon çözeltileri oluşturan bileşiklerin derişimlerindeki farklılıklardan kaynaklı ölçülen akım üzerindeki farklılıkların minimuma indirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla asidik ve bazik bileşiklerin derişimleri tüm tamponlar için sabit tutulup 0,01 M ile 0,10 M aralığında hazırlanmıştır. pH 0,00 ile 2,00 aralığındaki çözeltiler HCl/NaCl kullanılarak hazırlanmıştır. 3,75-5,75 pH aralığı için CH_3COOH/CH_3COONa tamponu, 8,30-10,30 pH aralığı için NH_4Cl/NH_3 ve $H_3BO_4/NaOH$ kullanılarak tampon çözeltileri hazırlanmıştır. Fosfat tamponları diğer tamponlama aralıkları için; 1,15-3,15 pH aralığı için H_3PO_4/NaH_2PO_4 tamponu, 5,80-7,80 pH aralığı için NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 tamponu, 10,50-12,50 pH aralığı için Na_2HPO_4/Na_3PO_4 tamponu kullanılarak hazırlanmıştır. UV-Vis ile pK_a tayini deneyleri için ihtiyaç duyulan bazik pH ortamları NaOH çözeltileriyle hazırlanmıştır. Metot validasyonu için uygulanan DPP çalışmaları, en yüksek akım cevabının alındığı 0,1 M CH_3COOH ve 0,1 M CH_3COONa içeren pH 4,75 tampon çözeltisi içerisinde gerçekleştirilmiştir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. APX'in Sıfık Kontrolleri

APX'in sıfık kontrolleri için yapılan erime sıcaklığı deneylerinde erime sıcaklığı aralığının 236,3- 236,8 °C olduğu ve bu sıcaklık aralığının literatür ile uygun olduğu tespit edilmiştir [84]–[86].

APX'in spektrofotometrik özelliklerini incelemek amacıyla IR spektrofotometresi ile analizi yapılmıştır. Şekil 3.1'de görüldüğu gibi yapıya özđü fonksiyonel gruplar belirlenmiştir.



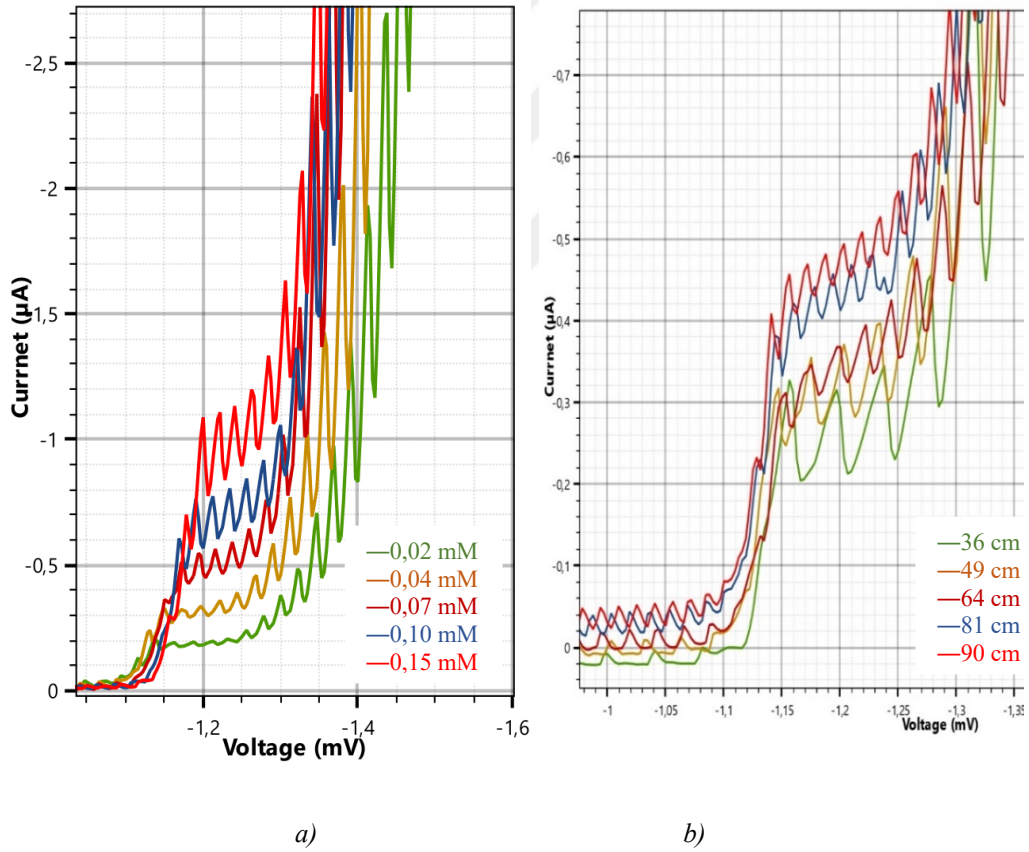
Şekil 3.1. APX'e ait IR spektrumu

3.2. APX Üzerine Çalışmalar

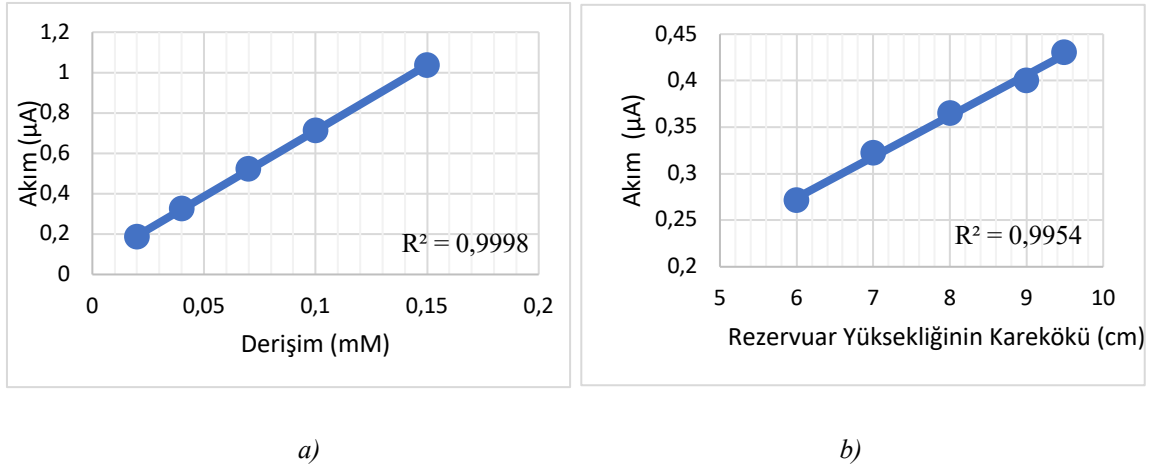
3.2.1. APX'in polarografi çalışmaları

APX'in indirgenme çalışmalarına başlanılmadan yapılan polarografik çalışmalarda Tl^+ analizi yapılmıştır. Çünkü Tl^+ 'nin pH 4,75 destek elektrolit içerisinde -0,44 V ile -0,45 V arasındaki yarı dalga potansiyelinde indirgendiği literatürde bilinmektedir [87]. Bu sebeple polarografik çalışmalarda referans elektrotun doğru çalışıp çalışmadığını anlayabilmek için her çalışma öncesinde pH 4,75 tamponunda Tl^+ analizi yapılmıştır. Beklenen yarı dalga potansiyeli görüldükten sonra analizler yapılmıştır.

APX'in polarografik ön çalışmaları pH 0,00-12,50 aralığındaki tampon çözeltilerde gerçekleştirilmiştir. APX stok çözeltisi 10 mM derişimde ACN içerisinde hazırlanmış olup analizi yapılacak uygun derişimlere, tampon çözeltiler içerisinde seyreltilmiştir. Çalışma derişiminin belirlenmesi ve akım türünün tespiti için 0,02-0,15 mM aralığındaki farklı APX derişimleri analiz edilip en uygun çalışma derişimi belirlenmiş ve derişimlerin akım yüksekliklerine karşı grafiğı oluşturulmuştur. Daha sonra APX 0,05 mM derişimde sabit tutulup cıva rezervuarının yüksekliğı değıştirilmiştir; deneyler için APX pikinin kolayca takip edilebildiğı pH 4,75 asetat tamponu tercih edilmiştir. Analizlere ait polarogramlar Şekil 3.2'de görölmektedir. Rezervuar yüksekliğinin kareköküne karşı akım grafiğı oluşturulmuştur.



Şekil 3.2. APX'in a) 0,02-0,15 mM aralığındaki derişimlerine ait polarogramları b) cıva rezervuarının yüksekliğinin değıştirilmesiyle yapılan analizlere ait polarogramlar; pH 4,75

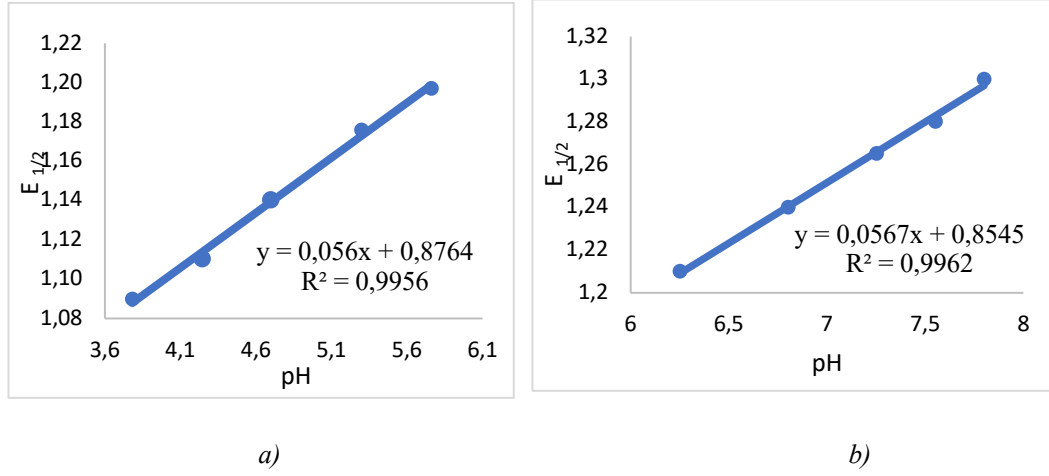


Şekil 3.3. APX'in a) 0,02-0,15 mM aralığındaki derişimlerinin akıma karşı grafiği b) cıva rezervuarının yüksekliklerinin karekökünün akıma karşı grafiği; pH 4,75

Derişim-akım ve rezervuar yüksekliğinin karekökü-akım grafiklerinin doğrusal olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.3). Bu bulgular ışığında akım türünün difüzyon akımı olduğuna karar verilmiştir. Bu akım türü miktar tayini ve elektron transfer mekanizmasının aydınlatılmasına olanak sağlamaktadır.

Farklı derişimlerdeki APX analizleri sonrasında maddenin farklı pH değerlerine sahip tamponlardaki analizi için en uygun derişimin polarografik maksimanın meydana gelmediği derişim olan 0,05 mM olmasına karar verilmiştir. Cıva rezervuar yüksekliğinin 64 cm olmasına karar verilmiş olup deneyler bu koşullarda yürütülmüştür.

0,05 mM derişiminde APX pH 0,00-3,15 aralığı için HCl/NaCl kullanılarak hazırlanan çözeltiler ve fosfat tampon çözeltileri hazırlanıp analiz edilmiştir. Kuvvetli asidik ortamda APX'in hidroliz olduğu düşünüldüğü için destek elektrolitinin asitlik derecesi olan 3,75 pH altındaki tampon çözeltilerde gerçekleştirilen analizler mekanistik çalışma için uygun bulunmamıştır. pH 3,75-5,75 aralıkları için asetat tamponu, pH 5,80-7,80 aralıkları için fosfat tamponu, pH 8,30-10,30 aralıkları için amonyak ve borat tamponları ile pH 10,50-12,50 aralıkları için ise yine fosfat tamponu çözeltileri hazırlanıp 0,05 mM derişiminde APX analiz edilip destek elektrolitinin asitlik değerine karşı yarı dalga potansiyel grafiği çizilmiştir (Şekil 3.4).



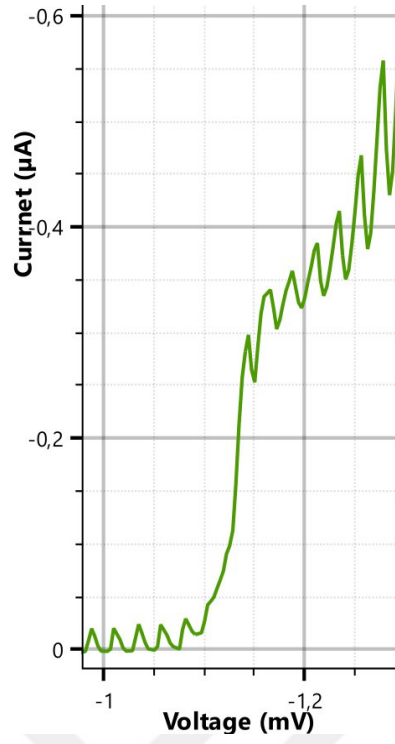
Şekil 3.4. 0,05 mM APX'in a) Asetat tamponu ve b) Fosfat tamponundaki pH-akım grafikleri

Aşağıda yer alan eşitlikte,

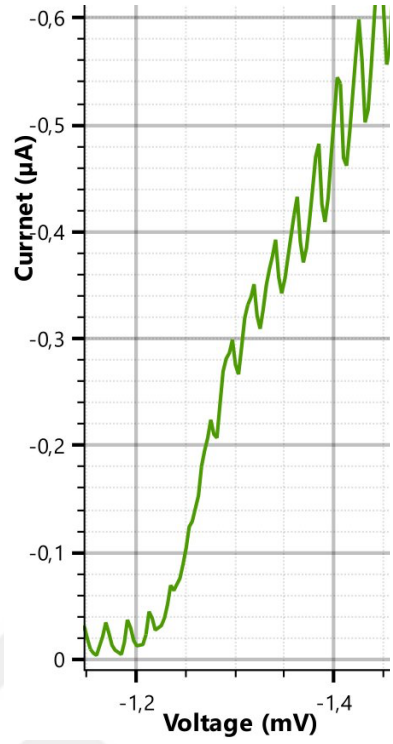
$$dE_{1/2} / dpH = 0,059p/\alpha n \quad [88] \quad (3.1)$$

p = transfer edilen proton sayısı, α = difüzyon akımı gerçekleştiği için 0,5 değerini ve n = transfer edilen elektron temsil etmektedir. İlk elektron transferinden önce bir proton transferinin gerçekleştiği ileride detaylı şekilde anlatılacaktır. Yarı dalga potansiyelinin ($E_{1/2}$) çözeltinin asitlik değerine karşı grafiğinin eğiminin 56 mV/pH bulunması eşitlikten anlaşılabileceği üzere APX molekülünün iki elektron transfer ettiğini göstermektedir.

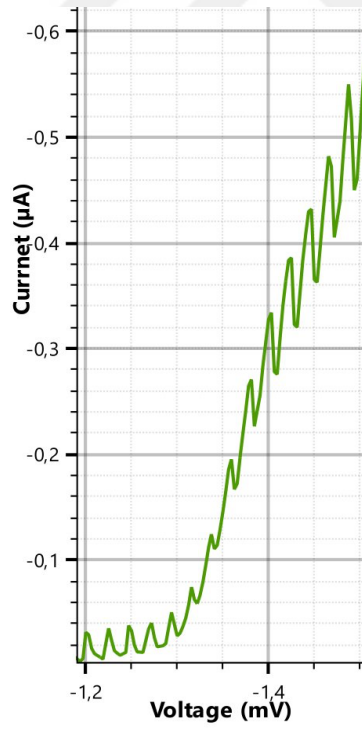
pH 3,75'te APX'in yarı dalga potansiyeli -1,09 V'ta görülmüştür. Analizler süresince akım yüksekliği 0,44 μA 'de sabit kalmış ve pH arttıkça $E_{1/2}$ değerinde daha negatif potansiyel değerine kayma olduğu görülmüştür. pH 8,70'te potansiyel -1,35 V'a kadar ilerlemiş ve bu pH değerinden sonraki çözeltilerde APX indirgenme piki destek elektrolitinden daha negatif potansiyel değerinde indirgendiği için APX molekülüne ait dalga gözlenmemiştir. Polarogramlar Şekil 3.5'te yer almaktadır.



a)



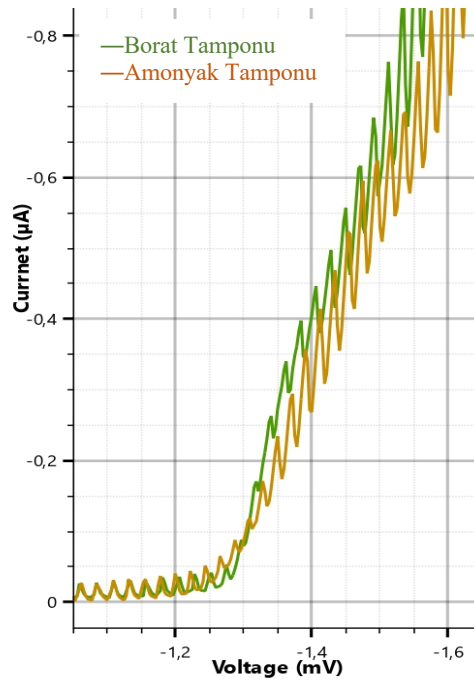
b)



c)

Şekil 3.5. 0,05 mM APX'in a) pH 4,75 asetat tamponu b) pH 7,25 fosfat tamponu ve c) 8,70 amonyak tamponundaki polarogramları

Yapılan polarografik çalışmalar sırasında APX'in destek elektroliti içerisindeki elektron davranışını ölçmek amacıyla pH 8,30-10,30 tampon aralığında amonyak ve aynı asitlik derecesine sahip borat çözeltileri hazırlanmıştır ve APX'in aynı asitlik derecesine sahip farklı destek elektrolitleri içerisindeki indirgenme davranışı analiz edilmiştir. Maddenin akım yüksekliği ve yarı dalga potansiyelinin asitlik dereceleri aynı fakat içerikleri farklı olan tamponlarda değişmediği gözlemlenmiştir. Tampon çözeltisinin içeriğinin değiştirilmesinin APX'in indirgenme davranışı üzerinde etkisi olmadığı görülmüştür (Şekil 3.6).

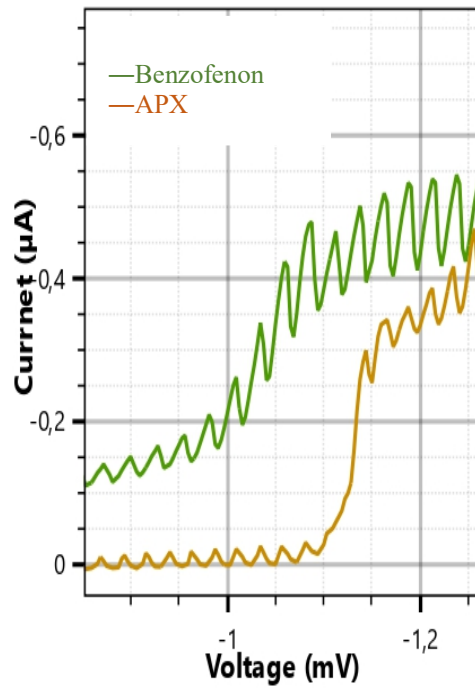


Şekil 3.6. 0,05 mM APX'in amonyak ve borat tamponlarında analizi; pH 8,30

3.2.1.1. Elde edilen verilere göre APX'in indirgenme mekanizmasının değerlendirilmesi

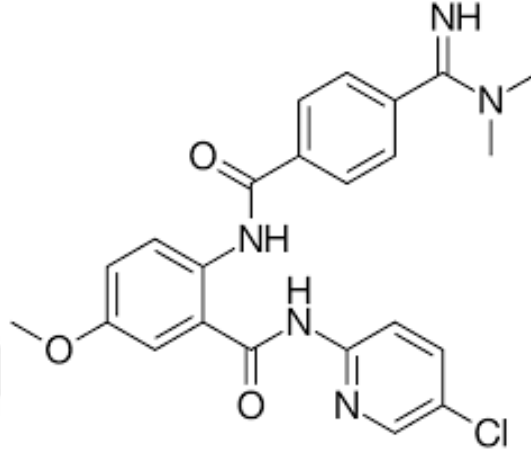
APX üzerine yapılan polarografik çalışmalar sonucunda maddede gerçekleşen elektron transfer davranışının difüzyon akımıyla gerçekleştiğinin gözlemlenmiştir. Bu akım türüne dayanarak APX'in transfer ettiği elektron sayısının ve elektron transfer mekanizmasının araştırılabileceğine karar verilmiştir. Çünkü difüzyon akımı elektron transfer sayısı ve mekanizmasının araştırılması için en uygun akım türüdür.

Benzofenonun elektroindirgenme mekanizmasının karbonil grubu üzerinden gerçekleştiği ve iki elektron alarak indirgendiği bilinmesi sebebiyle mekanizma çalışmalarını güçlendirmek amacıyla model bileşik olarak benzofenon kullanılmasına karar verilmiştir. [89]. Benzofenon stok çözeltisi 10 mM derişiminde ACN içerisinde hazırlanıp APX ile aynı derişimde (0,05 mM) ve aynı tampon çözeltilerde analiz edilmiştir. Analizler sonucunda akım yüksekliğinin APX ile benzer olduğu gözlemlenmiştir (APX için 0,36 μA ve benzofenon için 0,34 μA). Akım yüksekliğinin toplam transfer edilen elektron sayısı ile ilişkisinden dolayı hem APX hem de benzofenonun aynı sayıda elektron transfer ettiği ispatlanmıştır. Akım değerlerindeki küçük farklılıklar, iki maddenin Ilkovic denkleminde [70] bulunan difüzyon katsayılarının farkından kaynaklanmaktadır. Analizlere ait polarogramlar Şekil 3.7’de yer almaktadır.



Şekil 3.7. 0,05 mM benzofenon ve APX'in polarogramı

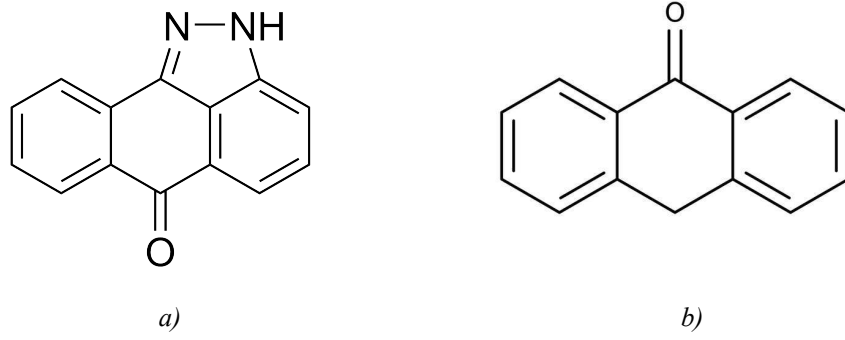
Potola Pharmaceuticals (ABD) tarafından Bevyxxa® ticari ismiyle piyasaya sunulan DOAİ grubuna dahil olan FXa inhibitörü BTX, FDA tarafından 23 Temmuz 2017 yılında onay almıştır fakat kısa bir süre sonra bağımsız ticari nedenler açıklamasıyla ilaç piyasadan çekilmiştir [90]. BTX, akut tıbbi hastalığı olan hastalarda venöz tromboembolizmin önleyici tedavisinde kullanılan FDA onaylı tek DOAİ'ydi [91]. Kimyasal yapısı Şekil 3.8'de verilmiştir.



Şekil 3.8. BTX'in molekül yapısı

BTX yapısının APX'in pirazol halkasının kırılmış haline benzemesi sebebiyle model bileşik olarak APX ile aynı derişimde (0,05 mM) ve aynı tampon çözeltilerde analizi yapılmıştır. Farklı tamponlardaki pH değerlerine karşı gösterdikleri akım ve yarı dalga potansiyel davranışlarının benzer olduğu gözlemlenmiştir. Ancak BTX molekülünde gerçekleşen akım türünün mekanizma aydınlatılması için uygun olmadığı gözlemlenmiştir. Bu sebeple BTX, APX'in mekanizma aydınlatılması çalışmaları için kullanılmamıştır.

APX molekülünde yer alan ve elektroindirgenmenin gerçekleştiği aktif kısım olduğu düşünülen pirazolün indirgenmesi ile ilgili çalışmaya literatürde ulaşılamamıştır. Louis Meites tarafından yazılan Polarographic Techniques kitabında pirazolantron molekülünün indirgenmesinin -1,20 V'ta ve antron molekülünün (Şekil 3.9) benzer asitlik değerinde -1,31 V olduğu bulunmuştur [92]. Mekanizmanın aydınlatılması konusunda literatürde yer alan sadece bu bilgiye başvurulmuştur.

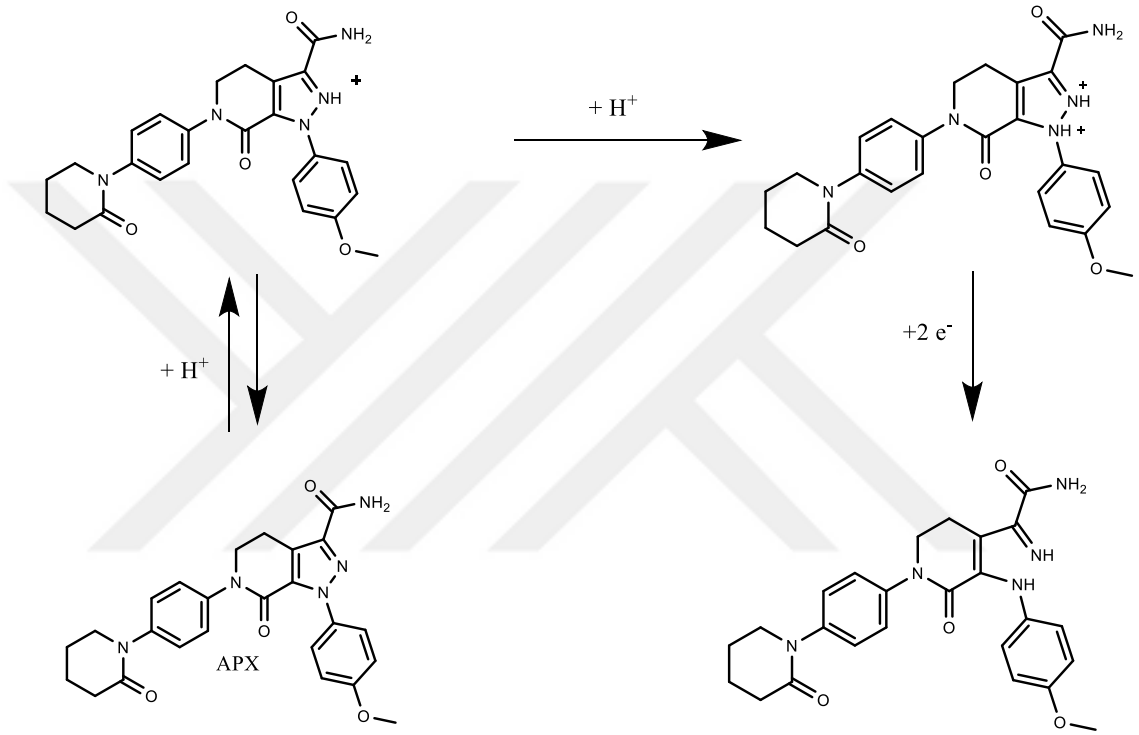


Şekil 3.9. a) Pirazolantron ve b) antron moleküllerine ait molekül yapıları

APX'in akım yüksekliğinin model madde olan benzofenon ile benzer değerde olması toplamda iki elektron transferi olduğunu göstermektedir. Ayrıca yarı dalga potansiyelinin pH'a karşı grafiğinden elde edilen eğim değeri de toplamda iki elektron transferi olduğunu desteklemektedir. Benzofenonun indirgenme potansiyeli ile APX'in indirgenme potansiyel değeri karşılaştırıldığında yaklaşık 120 mV fark vardır. APX daha negatif potansiyelde indirgenirken π bağlarının kırıldığı düşünülmektedir. N-N tek bağının indirgenmesi polarografik deney şartlarında nadir görülmekte olup daha çok destek çözeltiden (tampon) daha negatif değerlerde rastlanır. Ancak APX molekülünün asitlik sabit değerinin (ChemAxon 13,07; deneysel veri $\geq 14,00$) altında pH değerlerinde çalışıldığı için pirazol halkası halihazırda protonlanmıştır. Ayrıca yarı dalga potansiyel değerinin pH arttıkça daha negatif değere kayması ilk elektron transferinden önce protonlanmanın gerçekleştiğini göstermektedir. Dolayısıyla hali hazırda protonlanmış olan yapıya elektron transferinden önce bir proton daha transfer edildiğinin, elektrot yüzeyinde iki proton transferi gerçekleşmiş formunun indirgendiği öngörülmüştür. Bu öngörü hem indirgenme potansiyelinin pH değişimiyle değişmesine hem de indirgenme potansiyelinin benzofenonun indirgenme potansiyeline yaklaşmasıyla açıklanmıştır. Normalde π bağının indirgenmesi her zaman σ bağından daha pozitif potansiyel değerinde gözlemlenir. Ancak protonlanma sonucu iki protonlu hale gelen APX formunun indirgenmesinin kolaylaşmasından dolayı APX'e ait indirgenme piki gözlemlenmiştir. Tüm bunların üzerine, açıklanan mekanizmaya ait bir diğer kanıt pirazol halkasının aromatik yapısıdır. Aromatik yapı ve iki protonlu form N-N tek bağının indirgenmesini kolaylaştırmıştır. Literatürde bu konuda hiçbir bilimsel çalışmaya rastlanılmaması bu çalışmanın en önemli çıktısıdır.

Antron ve pirazolantron molekülleri hakkında literatürden elde edilen veriler ve çalışma şartları çok net ve açıkça belirtilmemekle beraber antronun alkali ortamda bir elektron ile indirgendiği, pirazolantronun ise benzer deneysel şartlarda iki elektron ile indirgendiği belirtilmiştir. Bu iki molekül arasındaki temel fark pirazol halkasının varlığıdır. Pirazol grubu, antron molekülünün daha aromatik bir yapıya dönüşmesini sağlamış olup karbonil grubu yerine, bu çalışmadaki bulgularımız ışığında, pirazol grubundaki N-N tek bağının indirgenmesini sağladığı düşünülmüştür. Literatürde pirazolantronun iki elektron ile indirgendiği ancak antronun tek elektron ile indirgendiği belirtilmiştir. Antronun alkali ortamda tek elektron ile indirgenmesi literatürde bilinen bir veridir. Ancak pirazolantronun daha pozitif potansiyelde indirgenmesi ve iki elektron transferinin gözlemlenmiş olması pirazol grubunun hem aromatikliği artırması hem de protonlanması, indirgenmenin pirazolantron molekülünün pirazol halkası üzerindeki N-N tek bağının indirgenmesiyle olduğunu göstermekte olup bu çalışma kapsamında elde edilen verileri desteklemektedir. Pirazolantron molekülünün indirgenmesinden sonra görülen diğer piklerin kinetik karakterde olduğu ve hızlı bir şekilde hidroliz olduğu belirtilmiştir [92]. APX çalışmamızda da ana pikten sonra destek pikinden önce akımda hızlı bir yükseliş gözlemlenmiştir. Bu gözlem elimizdeki deneysel veriler ışığında APX'in indirgenme ürünü olan imin yapısının hidrolizi olduğunu düşündürmüştür. Bu akım, hidroliz olan yapının imin ($C=N-H$) olduğunu net olarak ispat etmemektedir fakat imin yapısının kolaylıkla hidroliz olduğu literatürde belirtilmiştir [93].

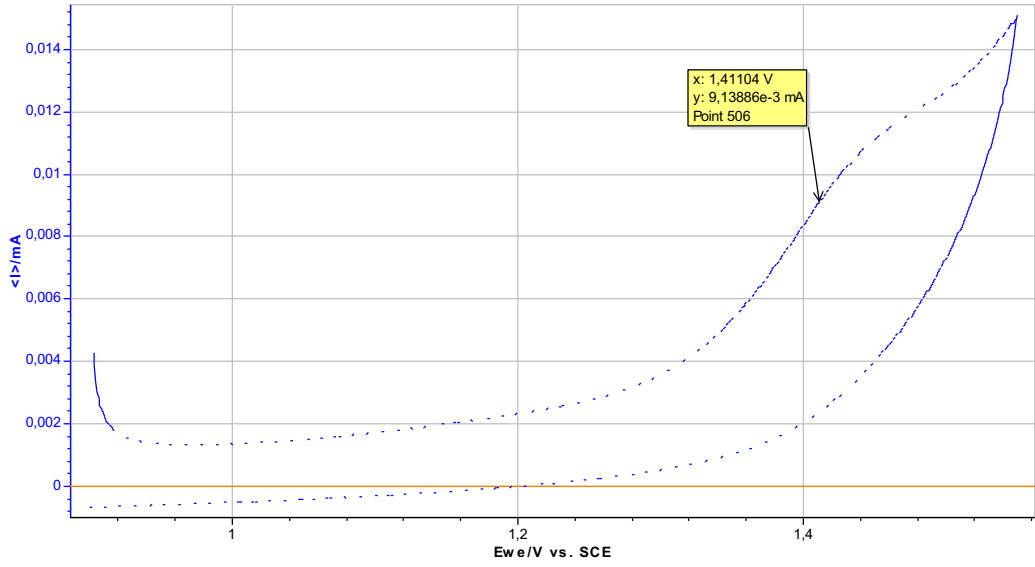
Bu çalışmadan elde edilen deneysel veriler ile literatür bilgilerinin ışığında APX molekülünün iki protonlu formunun iki elektron transferi ile indirgendiği sonucuna ulaşılmıştır ve tahmin edilen elektroindirgenme mekanizması Şekil 3.10'da verilmiştir.



Şekil 3.10. APX'in tahmin edilen elektroindirgenme mekanizması

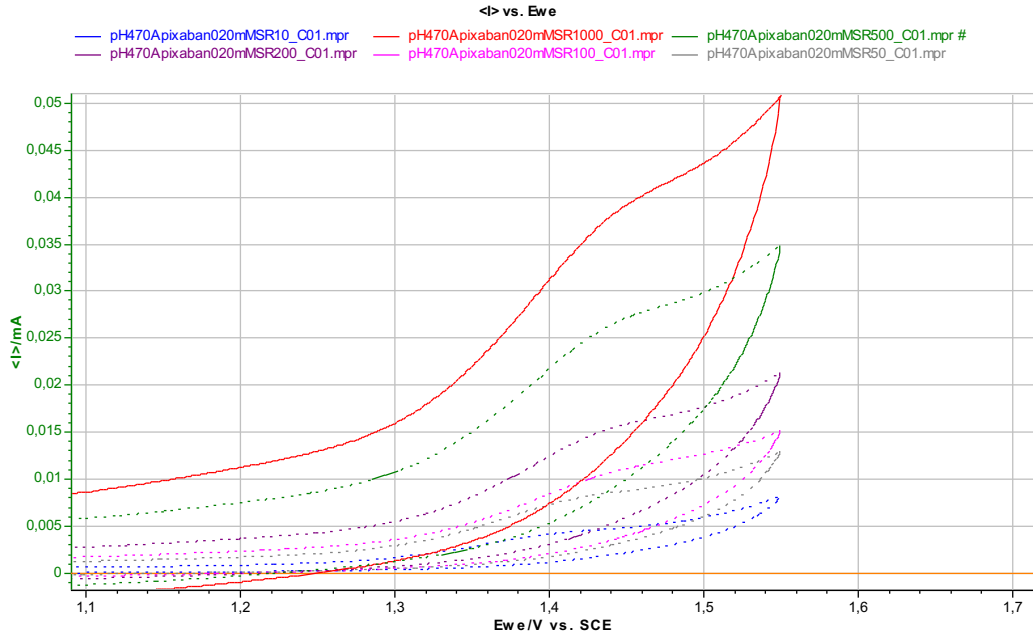
3.2.2. APX'in CV çalışmaları

CV 3,75-12,50 pH aralığındaki asetat, fosfat, amonyak tamponlarında; 0,2 mM APX derişiminde çalışılmıştır. Çalışma elektrodu olarak altın elektrot denenmiştir fakat sonuç alınamamıştır. Daha sonra GCE çalışma elektrodu olarak seçilmiş ve SCE referans elektrot olarak kullanılmıştır. Molekülün GCE'de yükseltgenme davranışı gösterdiği gözlemlenmiştir (Şekil 3.11).

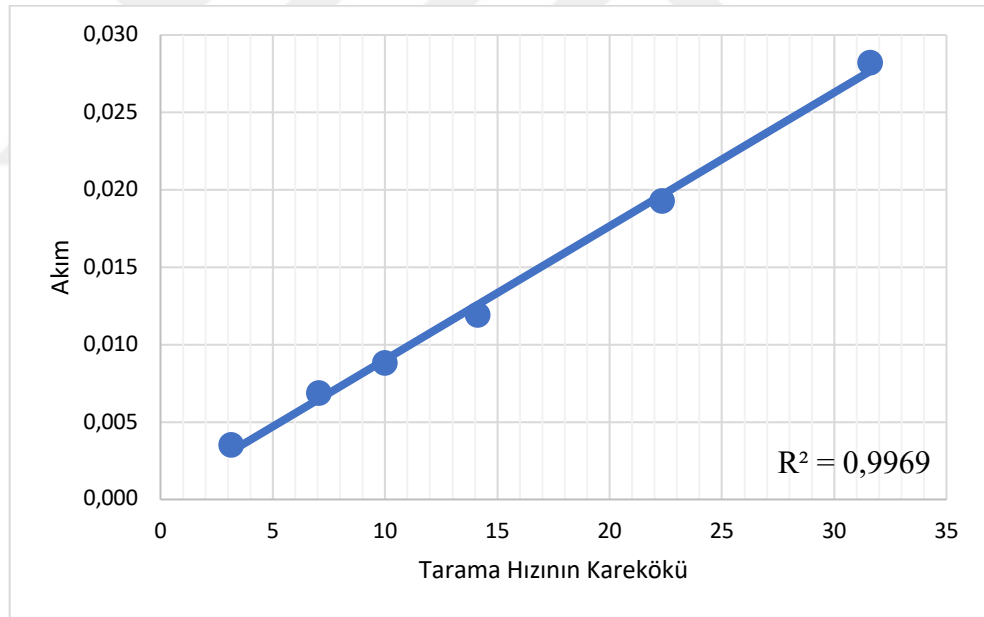


Şekil 3.11. 0,2 mM APX'in 100 mV/s tarama hızındaki voltamogramı; pH 4,75

pH 4,75 asetat tamponunda 0,2 mM APX, 10-1000 mV/s aralığındaki farklı tarama hızlarında kaydedilerek tarama hızı-akım arasındaki ilişki incelenmiştir. Deneylere ait voltamogramlar Şekil 3.12'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde tarama hızının karekökü ile akımın doğrusal olarak arttığı ve potansiyelde 50 mV daha pozitif potansiyele kayma gözlemlenmiştir. Doğrusallık, akım türünün difüzyon akımı olduğunu göstermektedir (Şekil 3.13).



Şekil 3.12. 0,2 mM APX'in 10-1000 mV/s tarama hızlarındaki voltamogramları; pH 4,75



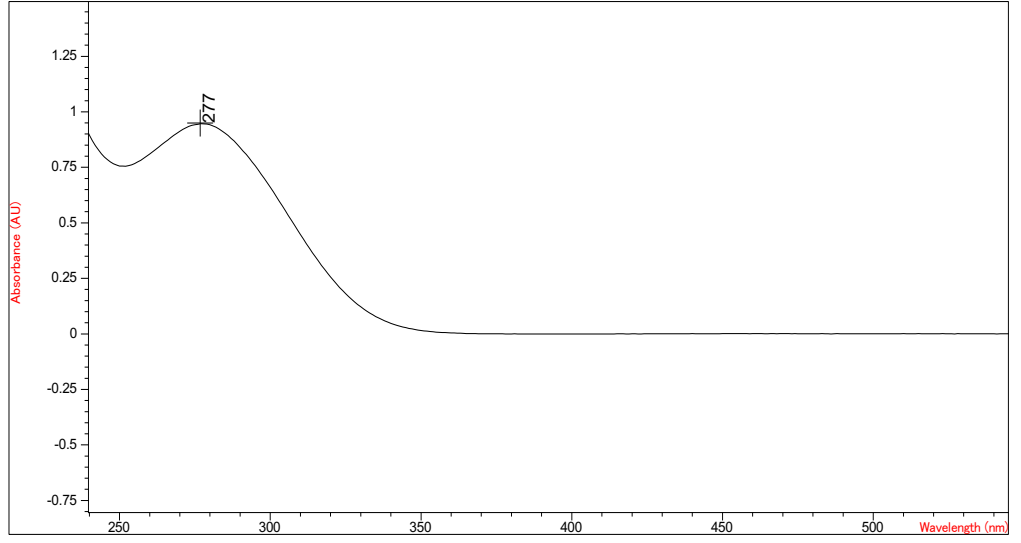
Şekil 3.13. pH 4,75 Asetat tamponu içerisinde 0,2 mM APX'in 10-1000 mV/s tarama hızlarının karekök değerinin akıma karşı grafiği

Voltamogramlarda geri dönüş pikine rastlanılmaması ve tarama hızının artmasıyla pik potansiyelinde kayma gerçekleşmesi reaksiyonun geri dönüşsüz olduğunu göstermektedir.

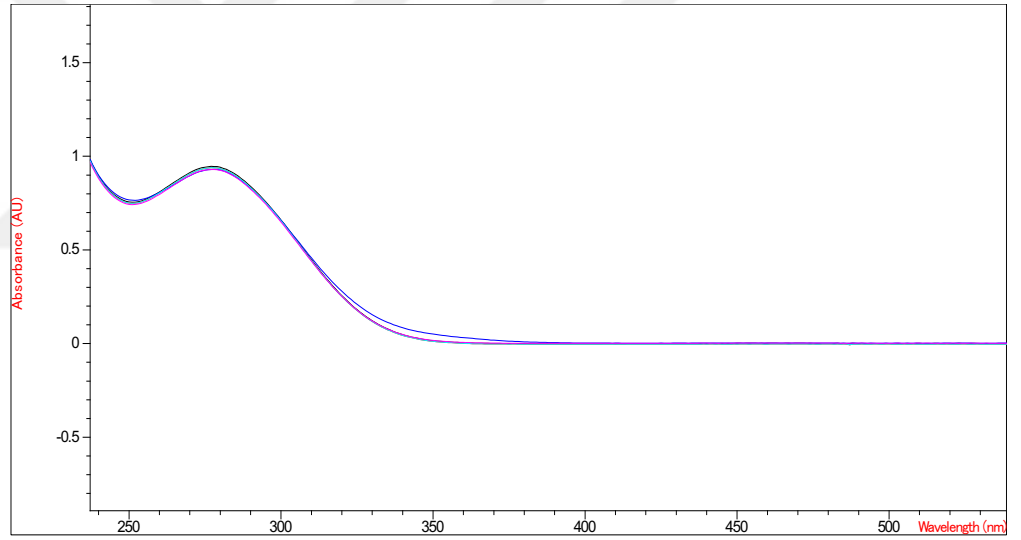
Literatürde yer alan APX'in yükseltgenme çalışmaları [46] ile ilgili veriler desteklenip CV çalışmalarına devam edilmemiştir. Elektroindirgenme mekanizmasının aydınlatılması amacıyla indirgenme çalışmalarına ağırlık verilmiştir.

3.2.3. UV spektrofotometri ile pK_a tayini çalışmaları

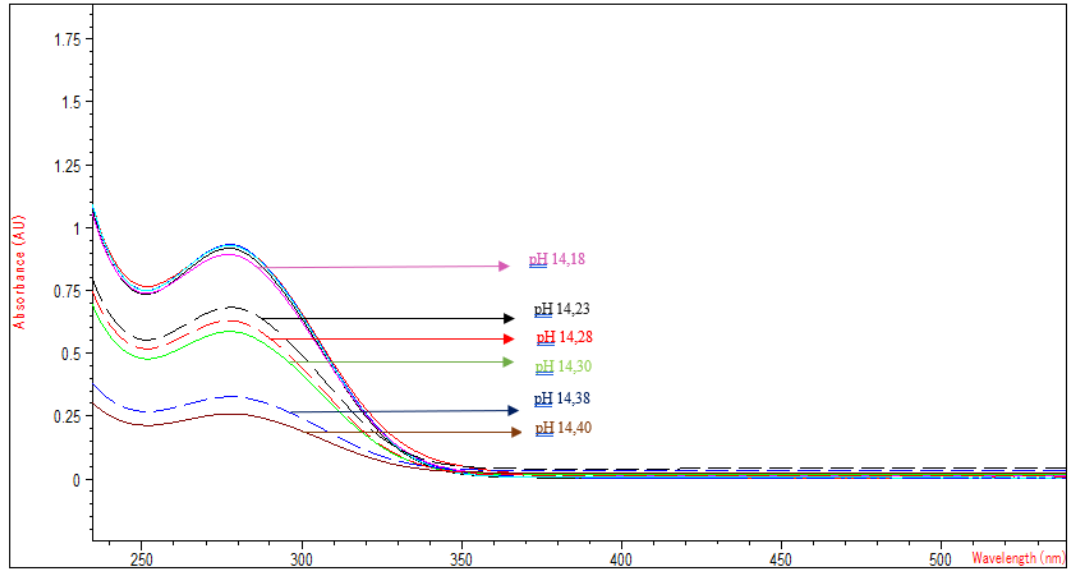
Literatürde APX'in dalga boyunu Boehr vd. 280 nm [94], Radhika vd. 279 nm [29] olarak tespit etmişlerdir. Bu çalışmadaki UV ile pK_a tayini için 1 mM APX stok çözeltisi ACN ile hazırlanmıştır. Spektroskopi çalışmaları için bu stok çözeltiden farklı tamponlar içerisinde son derişim 0,03 mM olacak şekilde çözeltiler hazırlanıp analizler yapılmıştır. Madde aynı derişimde ACN içerisinde hazırlanıp 220-600 nm dalga boyunda UV-Vis ile analiz edilmiştir ve absorbans yaptığı dalga boyunun 277 nm olduğu görülmüştür (Şekil 3.14). pK_a tayini için analizler, daha önce hazırlanan pH 3,75- 12,50 aralığındaki tamponlarda gerçekleştirilmiş ve absorbansta bir değişiklik gözlemlenmemiştir (Şekil 3.15). pH 12,30-14,40 aralığındaki pH değerlerini sağlaması amacıyla 0,02 M- 2,50 M derişimleri aralığında NaOH çözeltileri hazırlanmıştır ve stok çözelti hazırlanan çözeltiler içerisinde 0,03 mM derişimde olacak şekilde seyreltilip analiz edilmiştir. pH 12,30-14,00 dahil olmak üzere bu aralıktaki pH değerlerine sahip çözeltiler içerisinde maddenin absorbans yaptığı dalga boyu ve absorbansı değişmemiştir. pH 14'ün üzerinde yapılan analizlerde maddenin 277 nm'de gösterdiği absorbans değerinin düştüğü gözlemlenmiştir (Şekil 3.16). pH ile absorbanstaki değişim grafik haline getirilince maddenin pK_a değerinin ≥ 14 olduğu söylenebilir (Şekil 3.17). Yine bu ortamda maddenin 277 nm'deki absorbansının pH 14 üzerinde zamana bağlı olarak düştüğü görülmüştür. Absorbansta yaşanan azalmanın, maddenin yüksek bazik ortamda hidroliz olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



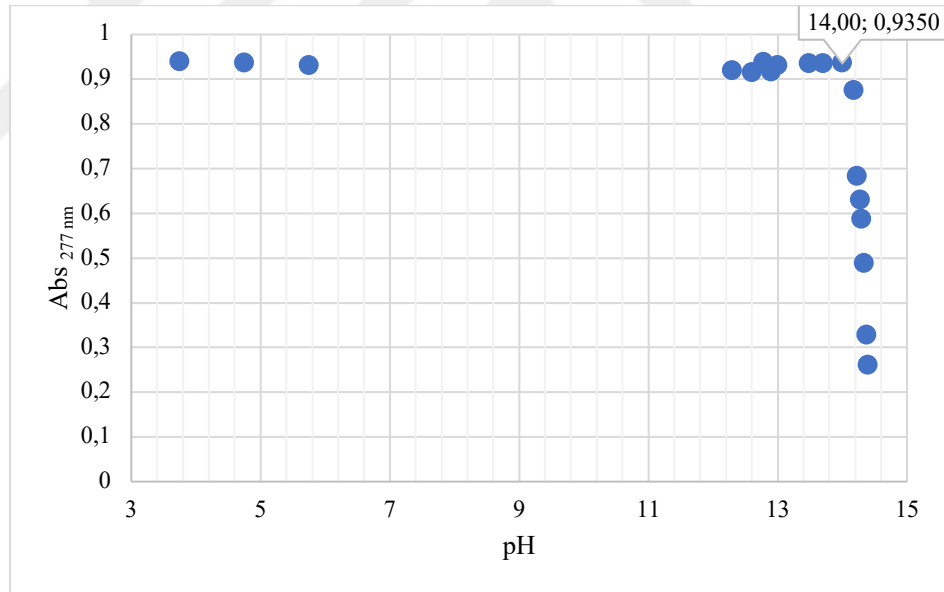
Şekil 3.14. 0,03 mM APX çözeltisinin 200-600 nm aralığında elde edilen UV spektrumu



Şekil 3.15. 0,03 mM APX çözeltisinin pH 3,75-12,50 aralığındaki çeşitli tamponlarda elde edilen UV spektrumu

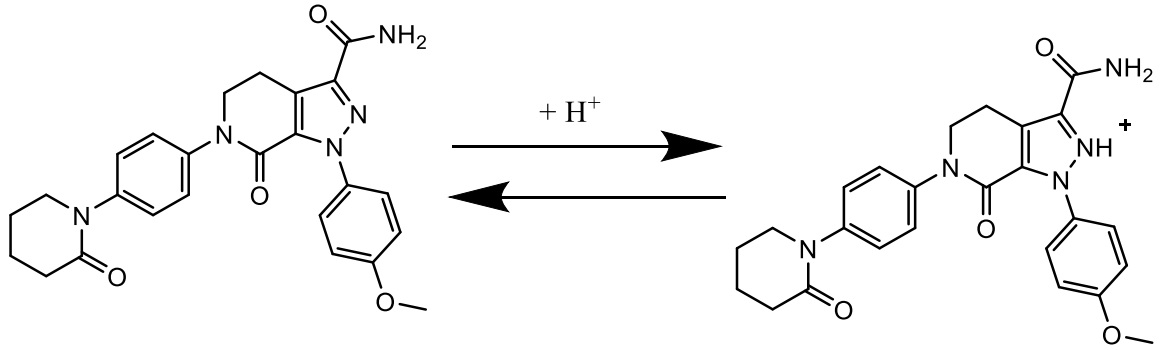


Şekil 3.16. 0,03 mM APX çözeltisinin pH 12,30-14,00 ile pH 14,00-14,40 aralığındaki çeşitli tamponlarda elde edilen UV spektrumu



Şekil 3.17. 277 nm dalga boyunda 0,03 mM APX'in pH-absorbans grafiği

Yapılan çalışmalar ışığında pirazol halkasının ikinci konumundaki azotun protonlanma için en uygun grup olduğu düşünülmektedir (Şekil 3.18)



Şekil 3.18. APX'in tahmin edilen protonlanması

3.2.4. Yöntem Geçerliliğinin Tayini

DCE ile yapılan ilk araştırmada gerçekleşen akımın türüne karar verebilmek için rezervuar yüksekliği 64, 70, 90, 100 ve 110 cm olmak üzere değiştirilerek 0,05 mM derişiminde analizler yapılmıştır ve oluşturulan rezervuar yüksekliği-akım kalibrasyon eğrisinin doğrusal olduğu gözlemlenmiştir. Aynı şekilde madde derişiminin arttırılması ile akım yüksekliğinin doğru orantılı olduğu gözlemlenmiştir. Doğrusallık, akım türünün difüzyon akımı olduğunun ispatıdır ve bu sebeple geliştirilen metotta analit derişimine karşı akım yüksekliği kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır.

Tüm metot geçerliliği parametreleri DPP yöntemiyle incelenmiş ve doğrulama parametreleri değerlendirilmiştir.

Geliştirilen yöntemde analit derişimine karşı akım yüksekliği hesaba katılarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. DPP analizi için geliştirilen yöntemin hesaplanan doğruluk ve kesinlik verileri Tablo 3.1'de verilmiştir. Metot çalışma aralığı için analiz edilebilecek en düşük APX derişimleri hazırlanmıştır.

APX için 3 farklı derişimde birbirinden bağımsız 3 analiz yapılarak geri kazanım olarak adlandırılan doğruluk çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Geri kazanım çalışmalarına ait veriler Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.1. APX için doğrusallık ve kesinlik verileri

Parametre	DPP
Doğrusal aralık	0,002-0,030 mM
Eğim±SH^a (gün içi, n=10)	0,3120±0,0057
Kesim±SH^a (gün içi, n=10)	-0,0003±0,00
Tanımlayıcılık katsayısı (gün içi, n=10)	0,9974
Teşhis alt sınırı (LOD)	0,0006 mM
Tayin alt sınırı (LOQ)	0,0020 mM
Eğim±SH^a (günler arası, k=3, n=30)	0,3092 ± 0,0054
Kesim±SH^a (günler arası, k=3, n=30)	-0,0002 ± 0,00
Tanımlayıcılık katsayısı (günler arası, k=3, n=30)	0,9973
ANOVA	F (2,30) = 0,00028 P=0,99972 (P>0,05)
Tekrarlanabilirlik (gün içi, ortalama, n=6)	0,00277
Tekrarlanabilirlik (gün içi, SS^b, n=6)	0,00008
Tekrarlanabilirlik (gün içi, BSS^c, n=6)	2,95
Tekrarlanabilirlik (gün içi, OSH^d, n=6)	0,00003
Tekrarlanabilirlik (gün içi, GA^e, n=6)	0,00006
Tekrarlanabilirlik (günler arası, ortalama, n=18)	0,00273
Tekrarlanabilirlik (günler arası, SS^b, n=18)	0,00010
Tekrarlanabilirlik (günler arası, BSS^c, n=18)	3,78
Tekrarlanabilirlik (günler arası, OSH^d, n=18)	0,00004
Tekrarlanabilirlik (günler arası, GA^e, n=18)	0,00008
ANOVA	F (2,15) = 2,5 P= 0,11560 (P>0,05)

^a Standart hata, ^b Standart sapma, ^c Bağlı standart sapma, ^d Ortalamanın standart hatası, ^e %95 güven seviyesinde güven aralığı

Tablo 3.2. APX'e ait geri kazanım çalışmaları

	Eklenen (mM)	Bulunan(mM) $\pm$ GA*	SS	Kesinlik		Doğruluk
				BSS(%)	Geri Kazanım (%)	Hata (%)
DPP	0,008	0,0080 $\pm$ 0,0002	0,0002	2,02	99,83	-0,17
	0,010	0,0099 $\pm$ 0,0003	0,0003	3,11	99,23	-0,77
	0,012	0,0115 $\pm$ 0,0002	0,0002	1,58	98,15	-1,85

* %95 Güven Seviyesinde

APX için yapılan kararlılık çalışmaları için analit 24 saat ve 48 saat boyunca oda sıcaklığında ve -20 °C'de üç hafta boyunca bekletilerek ve üç dondur- çöz döngüsü olacak şekilde analiz edilmiştir. Analizler üçer tekrarlı yapılmıştır ve sonuçlar Tablo 3.3.'te verilmiştir.

Tablo 3.3. APX standart çözeltisinin kararlılık çalışmaları (n=3)

0,010 mM Eklenen Derişim		
24 s, oda sıcaklığı	Bulunan (Ortalama $\pm$ GA*)	0,0101 $\pm$ 0,0005
	GK	101,5
48 s, oda sıcaklığı	Bulunan (Ortalama $\pm$ GA*)	0,0100 $\pm$ 0,0005
	GK	100,43
3 hafta, -20°C	Bulunan (Ortalama $\pm$ GA*)	0,0101 $\pm$ 0,0004
	GK	101,5
Dondurma-çözme kararlılığı	Bulunan (Ortalama $\pm$ GA*)	0,0095 $\pm$ 0,0002
	GK	95,09

* %95 Güven Seviyesinde

Yöntem geçerliliğinin sağlanması için diğer önemli çalışma da metot sağlamlığıdır. Metot sağlamlığı çalışmalarında iki önemli unsur vardır; metot bileşenlerinde meydana gelen değişikliklere karşı metodun gösterdiği direnç, diğeri ise metodun sınırlarının belirlenmesidir. Sağlamlık çalışmalarında analistin gerekli hassasiyeti göstermesi önemlidir. Çünkü sağlamlık çalışmaları analizin sınırlarını ifade eder. DPP çalışmaları için yapılan çalışmalarda önce enstrümental parametreler olan cıva rezervuar yüksekliği, darbe yüksekliği, darbe genişliği, tarama hızı parametrelerinde; daha sonra deneysel parametreler olan tamponun pH değeri ve tampon içeriğinin derişimi parametrelerinde meydana gelen değişimler hesaplanıp veriler Tablo 3.4'te verilmiştir.

Tablo 3.4. Metot sağlamlık çalışmaları

			Akım Yüksekliği		Potansiyel	
	Deney Koşulları	+%10 - %10	Gözlenen Değer	Gözlenen Değişim(%)	Gözlenen Değer	Gözlenen Değişim(%)
Rezervuar Yüksekliği	64 cm	57,6 cm	0,0028±0,0001	-0,012±2,09	1,19±0,01	-0,59±1,02
		70,4 cm	0,0032±0,0001	14,44±5,52	1,18±0,01	-0,59±1,02
pH	4,75	4,28	0,0029±0,0001	7,22±2,09	1,20±0,01	0,58±1,01
		5,23	0,0027±0,0002	-1,22±5,52	1,20±0,01	0,72±0,92
Tampon Bileşimi	0,1 M	- %10	0,0033±0,0002	20,47±5,52	1,18±0,01	-1,17±1,02
		+ %10	0,0028±0,0002	2,40±5,52	1,18±0,01	-0,59±1,02
Tarama Hızı	30 mV/s	27 mV/s	0,0030±0,0001	8,42±3,61	1,19±0,01	-1,18±0,92
		33 mV/s	0,0031±0,0002	10,83±8,35	1,20±0,01	0,35±1,11
Darbe Yüksekliği	50 mV	45 mV	0,0029±0,0002	3,00±7,66	1,19±0,00	0,00±0,00
		55 mV	0,0032±0,0001	15,65±5,11	1,17±0,00	-1,76±0,00
Darbe Genliği	50 mV	45 mV	0,0028±0,0001	-0,61±2,55	1,17±0,00	-1,76±0,00
		55 mV	0,0034±0,0001	21,07±2,55	1,18±0,00	-0,88±1,25

3.2.5. Geliştirilen Yöntemin Örneklere Uygulanması

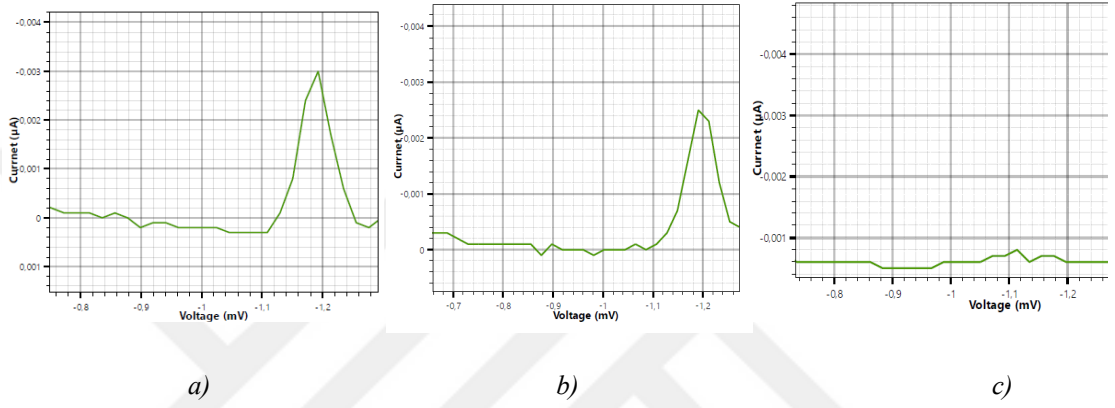
Geliştirilen metodun örneklere uygulanması ile yöntemin tekrarlanabilir ve uygulanabilirliğinin kanıtlanması sağlanır. Bu çalışmalarla metot kendini tekrar kanıtlar. Bu metot çalışması için APX'in 5 mg tablet formülasyonu olan Eliquis® numune uygulamaları için hazırlanmış ve 6 tekrarlı analizleri yapılmıştır. Bu analizler sonucunda tam validasyonu yapılmış geliştirilen metodun uygulanabilirliği gösterilmiştir. Sonuçlar Tablo 3.5'te verilmiştir.

Tablo 3.5. Eliquis® tablet formülasyonu sonuçları (n=6)

	DPP
Ortalama (mg)	4,81
Minimum (mg)	4,68
Maksimum (mg)	5,00
Standart sapma (mg)	0,16
%BSS	3,30
OSH (mg)	0,06
%Bias	3,73
GA*	±0,13

*%95 Güven Seviyesinde

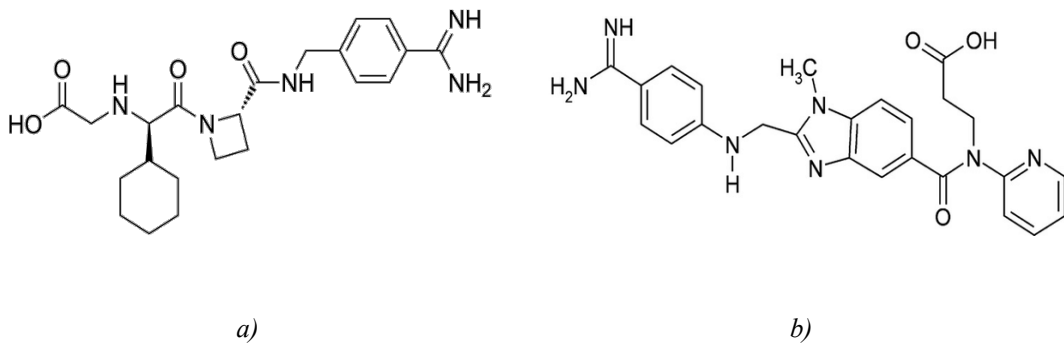
Analizler sonucu optimize edilmiş metot ile elde edilen standart APX'e ait polarogram ve Eliquis® tablet formülasyonuna ait polarogram şekil 3.19'da verilmiştir. Eliquis® tablet formülasyonunda kullanılan yardımcı maddeler kullanılarak içerisinde APX etken maddesinin bulunmadığı stok çözelti hazırlanıp seyreltilmiş ve analiz edilmiştir. Analiz sonucunda polarogramda yardımcı madde girişiminin olmadığı teyit edilmiştir (Şekil 3.19).



Şekil 3.19. a) Std APX çözeltisine ait polarogram, b) Eliquis® tablet çözeltisine ait polarogram, c) etken madde içermeyen psödo Eliquis® çözeltisine ait polarogram

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

FXa inhibitörü DOAİ grubundaki bir diğer ilaç molekülü olan BTX'in yapısı APX ile karşılaştırıldığında APX molekülünün yapısında imin grubu bulunmuyorken BTX'in yapısında imin grubunun bulunması dikkat çekmektedir. DOAİ grubunda değerlendirilen ve ön ilaç olarak kullanılan bir diğer molekül ximelagatran, vücutta trombin inhibitörü olan melagatrana metabolize olur ve melagatran da BTX gibi imin yapısı içerir (Şekil 4.1). Melagatran, BTX'te olduğu gibi piyasada kullanılmaya başlandıktan kısa süre sonra piyasadan çekilmiştir [95]. Bu ilaç moleküllerinin onay almasının üzerinden kısa bir süre sonra piyasadan çekilmiş olması; APX'te olduğu gibi diğer antikoagulan ilaç moleküllerinde indirgenme ürünü üzerinden imin oluşumunun, doğrudan imin varlığından daha önemli olduğu sonucunu düşündürmüştür. Fakat yine ön ilaç olarak kullanılan dabigatran eteksilat imin yapıları bir ön ilaçtır, imin yapısı içeren dabigatrana metabolize olur (Şekil 4.1) [96]. Dabigatran eteksilat, 2008 yılında FDA tarafından onay almıştır ve ilacın kullanımına devam edilmektedir [97]. Bu sebeple imin yapısının veya imin yapıları ilaç moleküllerinin toksisiteyi doğrudan etkileyip etkilemediği araştırma konusu olabilir. Dabigatrandaki elektron delokalizasyonunun melagatrana göre daha az olduğu da göz önünde bulundurulmalıdır. Buradaki en önemli olay iminin hidroliz olmaması olduğu düşünülmektedir. Hidrolize uğramayan stabil iminin ilaç olarak işlevli olduğu APX çalışmalarından elde edilen verilere göre öngörülmektedir.



Şekil 4.1. a) Melagatran ve b) Dabigatrana ait kimyasal yapı

APX'in elektroindirgenmesi sonucu ara ürün olarak imin yapısının oluştuğu ve iminin kararsız yapısından dolayı hemen hidroliz olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmayı daha ileri bir noktaya taşımak için potansiyel kontrollü elektroliz çalışmaları yapılarak

oluşan ürünün yapısının aydınlatılmasına yönelik çalışmalar yapılabilir. Ayrıca ileride yapılacak araştırmalar için, APX'in, elektron yönünden zengin gruplar taşıması sebebiyle metallerle kompleks yapıp yapmadığı ve nükleofilik katılım gösterip göstermediğinin araştırılması önerilebilir. APX'in elektroyükseltgenme mekanizmasını aydınlatmak için ayrıntılı bir çalışma yapılması önerilmektedir. Bu çalışma kapsamında altın, platin, bizmut, elmas, grafit, karbon gibi katı elektrotlar veya modifiye edilmiş elektrotlar kullanılarak yükseltgenmenin gerçekleştiği fonksiyonel grubun tespiti ve miktar tayini için analitik metot geliştirilmesi önerilmektedir.

Elektron transferinin gerçekleştiği fonksiyonel grubun tespit edildiği bu çalışma ışığında aktif bölgeye, indirgenmeye etki edebilecek yakınlıkta elektron veren ya da elektron alan grupların modifikasyonu ile daha kısa sürede etki eden, yan etkisi penceresi daha dar yeni ilaç adayları moleküller sentezlenebilir.

DOAI olarak kullanılan APX'in farklı asitlik derecelerine sahip destek elektrolitleri içerisinde polarografik çalışmaları tamamlanmış; model bileşikler ve literatür araştırması yapılmış ve bu çalışmanın en önemli sonucu olan APX'in elektron transfer sayısı tespit edilip elektroindirgenme mekanizması aydınlatılmıştır. APX molekülünde elektroindirgenmenin gerçekleştiği fonksiyonel grup önerilmiştir. APX üzerinde protonlanan fonksiyonel grup tahmin edilip UV kullanılarak pK_a tayini yapılmıştır. APX için validasyonu ICH kurallarına uygun olarak yapılmış; ucuz, tekrarlanabilirliği yüksek, doğru, seçici ve çevre dostu bir yöntem olan DPP yöntemi ile miktar tayini metodu geliştirilmiştir.

KAYNAKÇA

- [1] Kayaalp, O. (2009). Antitrombotik İlaçlar: Antikoagulan İlaçlar, Antitrombositik İlaçlar ve Trombolitik İlaçlar, O. Kayaalp (Ed.) *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji* içinde (s. 486-489) Ankara: Pelikan Yayıncılık.
- [2] Hilal-Dandan R. ve Brunton L. (2017). Kan Pıhtılaşması ve Antikoagulan, Fibrinolitik ve Antitrombositik İlaçlar. *Goodman ve Gilman'ın Farmakoloji ve Tedavi El Kitabı* içinde (s. 523-526). (Çev: R. Erdem). Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri.
- [3] Garcia, D. A., Baglin, T. P., Weitz, J. I., Samama, M. M. (2012). Parenteral Anticoagulants, *Chest*, 141 (2) 24-43.
- [4] Casu, B. (1985). Structure and Biological Activity of Heparin, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 43 (C), 51–134.
- [5] Hirsh, J., Warkentin T. E., Shaughnessy S.G., Anand S.S., Halperin J. L., Raschke R., Granger C., Ohman E. M., Dalen J. E. (2001). Heparin and low-molecular-weight heparin Mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing, monitoring, efficacy, and safety. *Chest*, 115 (6), 64-94.
- [6] Weitz, J. (1997). Low molecular weight heparins. *N. Engl. J. Med.*, 337 (10), 688-698.
- [7] Garcia, D., Libby, E. , Crowther, M. A. (2010). The new oral anticoagulants. *Blood, J. Am. Soc. Hematol.*, 115 (1)15–20.
- [8] Kayaalp, O. (2009). Antitrombotik İlaçlar: Antikoagulan İlaçlar, Antitrombositik İlaçlar ve Trombolitik İlaçlar, O. Kayaalp (Ed.) *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji* içinde, (s. 495-497). Ankara: Pelikan Yayıncılık.
- [9] Anderson K., Smith, K. (2019). Anticoagulants and Antiplatelet. *Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology* içinde, (s. 279-280). Wolters Kluwer.
- [10] Baglin, T., Hillarp, A., Tripodi, A., Elalamy, I., Buller, H., Ageno, W. (2013). Measuring oral direct inhibitors of thrombin and factor Xa: A recommendation from the Subcommittee on Control of Anticoagulation of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J. Thromb. Haemost.*, 11 (4),756–760.
- [11] Eriksson, B. I., Quinlan, D. J., Weitz, J. I. (2009). Comparative pharmacodynamics and pharmacokinetics of oral direct thrombin and factor Xa inhibitors in development. *Clin. Pharmacokinet.*, 48 (1), 1-22.

- [12] Food and Drug Administration. (2016). Eliquis (Apixaban) prescribing Information. *FDA*, 1-44. Available: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/202155s000lbl.pdf
- [13] Pinto D. J. P., Orwat M. J., Quan, M. L., Han, Q., Galemme, R. A., Amparo, E., Wells, B., Smallwood, A., Wong, P., Luetttgen, J. M., Rendina, A. R., Knabb, R. M., Mersinger, L., Kettner, C., Bai, S., He, K., Wexler, R. R., Lam, P. Y. S. (2007). Discovery of 1-(4-Methoxyphenyl)-7-oxo-6-(4-(2-oxopiperidin-1-yl)phenyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-pyrazolo[3,4c]pyridine-3-carboxamide (Apixaban, BMS-562247), a Highly Potent, Selective, Efficient, and Orally Bioavailable Inhibitor of Blood Coagulation Factor Xa. *J. Med. Chem.* 50 (22), 5339-5336.
- [14] Lassen, M. R., Davidson, B. L., Gallus, A., Pineo, G., Ansell, J., Deitchman, D. (2007). The efficacy and safety of apixaban, an oral, direct factor Xa inhibitor, as thromboprophylaxis in patients following total knee replacement. *J. Thromb. Haemost.*, 5 (12), 2368-2375.
- [15] Buller, H., Deitchman, D., Prins, M., Segers, A. (2008). Efficacy and safety of the oral direct factor Xa inhibitor apixaban for symptomatic deep vein thrombosis. The Botticelli DVT dose-ranging study. *J. Thromb. Haemost.*, 6 (8). 1313-1318.
- [16] Connolly, S. J., Eikelboom, J., Joyner, C., Diener, H. C., Hart, R., Golitsy, S., Flaker, G., Avezum, A., Hohnloser, S. H., Diaz, R., Talajic, M., Zhu, J., Pais, P., Budaj, A., Parkhomenko, A., Jansky, P., Commerford, P., Tan, R. S., Sim, K. H., Lewis, B. S., Mieghem, W. V., Lip, G., Kim, J. H., Lanus- Zanetti, F., Gonzalez-Hermosillo, A., L. Dans. A., Munawar, M., O'Donnell, M., Lawrence, J., Lewis, G., Afzal R., Yusuf, S., Phil, D. (2011). Apixaban in Patients with Atrial Fibrillation. *N. Engl. J. Med.*, 364 (9), 806–817.
- [17] Zehnder, J. (2020). Koagulasyon ve Bozukluğunda Kullanılan İlaçlar. *Temel ve Klinik Farmakoloji* içinde. (Çev: M. Karataş) Nobel Tıp Kitabevleri.
- [18] Pinto, D. J. P., Smallheer, J. M., Cheney, D. L., Knabb, R. M., Wexler, R. R. (2010). Factor Xa inhibitors: Next-generation antithrombotic agents. *J. Med. Chem.*, 53 (17), 6243-6274.
- [19] Nilsson, I. M. (1987). Coagulation and fibrinolysis. *Scand. J. Gastroenterol.*, 22 (137), 11-18.
- [20] National Center for Biotechnology Information. (2023). PubChem Compound Summary for CID 10182969, Apixaban.

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Apixaban>.

- [21] Du, C., Cong, Y., Zhang, Y., Xue, Y., Qiao, B., Ye, T., Wang, M. (2020). Dissolution behavior and thermodynamic properties of apixaban in pure and mixed solvents. *J. Chem. Thermodyn.*, 144, 105949.
- [22] He, K., Luettggen, J. M., Zhang, D., He, B., Grace, J. E. (2011). Preclinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of apixaban, a potent and selective factor Xa inhibitor, 36, 129-139.
- [23] Vakkalagadda, B., Frost, C., Byon, W., Boyd, R. A., Wang, J., Zhang, D., Yu, Z., Shenker, A., LaCreta, F. (2016). Effect of Rifampin on the Pharmacokinetics of Apixaban , an Oral Direct Inhibitor of Factor Xa. *Am. J. Cardiovasc. Drugs*, 16 (2), 119-127.
- [24] Raghavan N., Frost C. E., Yu Z., He K., Zhang H., Humphreys G., Pinto D., Chen S., Bonacorsi S., Wong P. C., Zhang, D. (2009). Apixaban Metabolism and Pharmacokinetics after Oral Administration to Humans. *Drug Methabolism and Disposition*, 37 (1), 74-81.
- [25] Frost C., Wang, J., Nepal, S., Schuster, A., Barrett, Y. C., Mosqueda- Garcia, R., Reeves, R. A., LaCreta, F. (2013). Apixaban , an oral , direct factor Xa inhibitor : single dose safety , pharmacodynamics and food effect in healthy subjects. *Br. Journak Clin. Pharmacol.*, 75 (2), 476-487.
- [26] Byon, W., Nepal, S., Schuster, A. E., Shenker, A., Frost, C. E. (2018). Regional Gastrointestinal Absorption of Apixaban in Healthy Subjects. *J. Clin. Pharmacol.*, 58 (7), 965-971.
- [27] Barrett, Y. C., Wang, Z., Frost, C., Shenker, A. (2010). Clinical laboratory measurement of direct factor Xa inhibitors : Anti-Xa assay is preferable to prothrombin time assay. *Thromb. Haemost.*, 104 (12), 1263-1271.
- [28] European Medicines Agency (EMA). (2021). Eliquis (Apixaban). 44, (0), 1-2. Available: https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/mylotarg-epar-summary-public_en.pdf
- [29] Gari, R. A. (2018). Comparative Studies Of Apixaban In Bulk And Its Formulations By Uv-Spectroscopy (Zero Derivatives And Area Under Curve). *Int. J. Pharm. Biol. Sci.*, 8 (4), 1002-1008.
- [30] Anusha, K., Sowjanya, G., Ganapaty, S. (2019) Development And Validation Of Uv Spectrophotometric for Apixaban in Tablets. *Eur. J. Biomed. Pharm.*, 5 (4),

929-933.

- [31] Delavenne, X., Mismetti, P., Basset, T. (2013). Rapid determination of apixaban concentration in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: Application to pharmacokinetic study. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 78 (79), 150-153.
- [32] Schmitz E. M. H., Boonen, K., Van Den Heuvel, D. J. A., Van Dongen, J. L. J., Schellings, M. W. M., Emmen, J. M. A., Van Der Graaf, F., Brunsveld, L. Van de Kerkhof. (2014). Determination of dabigatran, rivaroxaban and apixaban by ultra-performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) and coagulation assays for therapy monitoring of novel direct oral anticoagulants *J. Thromb. Haemost.*, 12 (10), 1636-1646.
- [33] Gous, T., Couchman, L., Patel, J. P., Paradzai, C., Arya, R., Flanagan, R. J. (2014). Measurement of the direct oral anticoagulants apixaban, dabigatran, edoxaban, and rivaroxaban in human plasma using turbulent flow liquid chromatography with high-resolution mass spectrometry. *Ther. Drug Monit.*, 36 (5), 597-605.
- [34] Kuhn J., Gripp, T., Flieder, T., Hammerschmidt, A., Hendig, D., Faust, I., Knabbe, C., Birschmann, I. (2018). Measurement of apixaban, dabigatran, edoxaban and rivaroxaban in human plasma using automated online solid-phase extraction combined with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its comparison with coagulation assays. *Clin. Chim. Acta*, 486, 347- 356.
- [35] Jeong, H. C., Kim, T. E., Shin, K. H. (2019). Quantification of apixaban in human plasma using ultra performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Transl. Clin. Pharmacol.*, 27 (1), 33-41.
- [36] Noguez J. H., Ritchie, J. C. (2016). Quantitation of the oral anticoagulants dabigatran, rivaroxaban, apixaban, and warfarin in plasma using ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). *Clin. Appl. Mass Spectrom. Drug Anal. Methods Protoc.*, 1383, 21-27.
- [37] Prabhune, S. S., Jaguste, R. S., Kondalkar, P. L., Pradhan, N. S.. (2014). Stability- Indicating High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Apixaban in the Presence of Degradation Products. *Sci. Pharm.*, 82 (4), 777-786.
- [38] Zhang, M., Moore, G. A., Chin, P. K. L. (2020). Simultaneous Determination of Dabigatran , Rivaroxaban , and Apixaban in Human Plasma by Liquid

- Chromatography / Tandem Mass Spectrometry. *Ther. Drug Monit.*, 42 (3), 473-480.
- [39] Țilea I., Popa D. S., Xantus, T. S., Primejdie, D., Grigorescu, B., Țilea, B., Bocicor, A. E., Varga, A. (2015). Determination of Apixaban Levels in Human Plasma by a High-Throughput Liquid Chromatographic Tandem Mass Spectrometry Assay. *Rev. Rom. Med. Lab.*, 23 (1), 115-125.
- [40] Zhang, W. L., Lou, D., Zhang, D. T., Zhang, Y., Huang, H. J. (2016). Determination of rivaroxaban, apixaban and edoxaban in rat plasma by UPLC–MS/MS method. *J. Thromb. Thrombolysis*, 42 (2), 205-211.
- [41] Lagoutte-Renosi, J., Poupon, J. L., Girard, A., Montange, D., Davani, S. (2018). A simple and fast HPLC-MS/MS method for simultaneous determination of direct oral anticoagulants apixaban, dabigatran, rivaroxaban in human plasma. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 1100–1101, 43-49.
- [42] Landge, S. B., Jadhav, S. A., Dahale, S. B., Solanki, P. V., Bembalkar, S. R., Mathad, V. T. (2015). Development and Validation of Stability Indicating RP-HPLC Method on Core Shell Column for Determination of Degradation and Process Related Impurities of Apixaban—An Anticoagulant Drug.” *Am. J. Anal. Chem.*, 6 (06), 539-550.
- [43] Gouveia F., Bicker, J., Santos, J., Rocha, M., Alves, G., Falcao, A., Fortuna, A. (2020). Development, validation and application of a new HPLC-DAD method for simultaneous quantification of apixaban, dabigatran, edoxaban and rivaroxaban in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 181, 113109.
- [44] Subramanian, V. B., Katari, N. K., Dongala, T., Jonnalagadda, S. B. (2020). Stability-indicating RP-HPLC method development and validation for determination of nine impurities in apixaban tablet dosage forms. Robustness study by quality by design approach. *Biomed. Chromatogr.*, 34 (1), 1-8.
- [45] Zhao, Y., Couchman, L., Kipper, K., Arya, R., Patel, J. P. (2020). A UHPLC-MS/MS method to simultaneously quantify apixaban, edoxaban and rivaroxaban in human plasma and breast milk: For emerging lactation studies. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 1144, 122095.
- [46] Rizk, M., Sultan, M. A., Taha, E. A., Attia, A. K., . Abdallah, Y. M. (2017). Sensitive validated voltammetric determination of apixaban using a multi-walled carbon nanotube-modified carbon paste electrode application to a drug product and

- biological sample. *Anal. Methods*, 9(17), 2523-2534.
- [47] Wang, J. (2000). Fundamental Concepts. *Analytical Electrochemistry*, (p.1-4). New York: John Wiley & Sons, INC.
- [48] Wang, J. "Study of Electrode Reactions," in *Analytical Electrochemistry*, (s. 28-30). New York: Wiley-VCH.
- [49] Zuman, P. (2006). Principles of applications of polarography and voltammetry in the analysis of drugs. *FABAD J. Pharm. Sci.*, 2 (31), 97-115.
- [50] Wang, J. (2000). Controlled- Potential Techniques. *Analytical Electrochemistry*, (s. 62-67). New York: Wiley-VCH.
- [51] Zuman, P. (2006). Current examples of practical and fundamental applications of DC polarography. *J. Solid State Electrochem.*, 10, 841-851.
- [52] Bontempelli, G., Dossi, N., Toniolo, R. (2019). *Voltammetry | polarography*. Elsevier Inc.,
- [53] Benet, L. Z., . Goyan, J. E (1967). Potentiometric Determination of Dissociation Constants. *J. Pharm. Sci.*, 56 (6), 665-680.
- [54] Cookson, R. F. (1974). The Determination of Acidity Constants. *Chem. Rev.*, 74 (1), 5-28.
- [55] Poole, S. K., Patel, S., Dehring, K., Workman, H., Poole, C. F. (2004). Determination of acid dissociation constants by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 1037 (1-2), 445-454.
- [56] Günter, G., Moore, D. S. (2014). UV/VIS Spectrometers. *Handbook of Spectroscopy*, (s. 63-66). Weinheim: Wiley-Vch.
- [57] Zuman, P. (2000). Current Status of Polarography and Voltammetry in Analytical Chemistry. *Anal. Lett.*, 33 (2), 163-174.
- [58] Baymak, M. S., Celik, H., Bakırhan, N. K., Uslu, B., Ozkan, S. A. (2018). Polarographic Investigation of Dienogest. *J. Electrochem. Soc.*, 165 (10), 128-132.
- [59] Elgrishi, N., Rountree, K. J., McCarthy, B. D., Rountree, E. S., Eisenhart, T. T., Dempsey, J. L. (2018). A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *J. Chem. Educ.*, 95 (2), 197-206.
- [60] Evans, D., O'Connell, K., Petersen, R., Kelly, M. (1983). Cyclic voltammetry. *J. Chem. Educ.*, 60 (4), 290-292.
- [61] Sibel, O., Kauffmann, J.-M., Zuman, P. (2015). Solid Electrodes in Drug Analysis.

- Electroanalysis in Biomedical and Pharmaceutical Sciences Voltammetry, Amperometry, Biosensors, Applications*, (s. 83-108). Springer,
- [62] Uslu, B., Ozkan, S. A. (2007). Electroanalytical application of carbon based electrodes to the pharmaceuticals. *Anal. Lett.*, 40 (5), 817-853.
- [63] Van der Linden W. E., Dieker, J. W. (1980). Glassy carbon as electrode material in electro- analytical chemistry. *Anal. Chim. Acta*, 119 (1), 1-24.
- [64] Zuman, P., Meites, L. (1967). *Handbook Series in Organic Electrochemistry*. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- [65] Zuman, P., Meites, L. (1967). *Handbook Series in Inorganic Electrochemistry*. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- [66] Heyrovsky J., Zuman, P. (1968). Principles of Polarography. *Practical Polarography* (s. 1-4). Londra ve New York: Academic Press.
- [67] Heyrovsky J., Kuta, J. (1965). *Principles of Polarography*. Londra ve New York: Academic Press.
- [68] Riley T., Watson, A. (1987). Classical DC Polarography. *Polarography and other Voltammetric Methods*, (s. 1-39). A. James, Ed..
- [69] Heyrovsky, J., Zuman, P. (1968). Polarographic Curves and their Interpretation. *Practical Polarography* (s. 30-42). New York: Academic Press.
- [70] Zuman, P., Perrin, C. (1965). Some Techniques in Organic Polarography. *Organic Polarography*, (s. 225-232). New York: John Wiley & Sons, INC.
- [71] Zuman, P. (1969). The Elucidation of Organic Electrode Processes. *Current Chemical Concepts*, (s. 6-11). L. Meites (Ed). New York: Academic Press.
- [72] Heyrovsky J., Zuman, P. (1968). Introduction. *Practical Polarography*, (s. 26-29). New York: Academic Press.
- [73] Barker C., Jenkins, I. L. (1952). Square-Wave Polarography. *Analyst*, 77, 685-695.
- [74] Riley T., Watson, A. (1987). Pulse Polarographic Techniques. *Polarography and other Voltammetric Methods*, (s. 159-172). A. James, Ed. New York: John Wiley & Sons.
- [75] Zuman, P. (2002). Polarography in solution of some problems in organic chemistry: Recent applications. *Microchem. J.*, 72 (3), 241-250.
- [76] Parry, E. P., Osteryoung, R. A. (1965). Evaluation of Analytical Pulse Polarography. *Anal. Chem.*, 37 (13), 1634- 1637.

- [77] Ozkan, S. A., Oliveira-Brett, A. M., Brett, C. M. A. (2015). Electroanalytical Techniques Most Frequently Used in Drug Analysis. *Electroanalysis in Biomedical and Pharmaceutical Sciences Voltammetry, Amperometry, Biosensors, Applications*. (s. 45-62). Springer.
- [78] Perrin, D. D., Dempsey, B., Serjeant, E. P. (1981). Introduction. *pKa Prediction for Organic Acids and Bases*, (s. 1-11). London: Chapman & Hall.
- [79] Avdeef, A. (2001) Physicochemical Profiling (Solubility, Permeability and Charge State). *Curr. Top. Med. Chem.*, 1, 277-351.
- [80] Foulon, C., Duhal, N., Lacroix-callens, B., Vaccher, C., Bonte, J. P, Goossens, J. F. (2007). Determination of pKa values of benzoxa-, benzothia- and benzoselenazolinone derivatives by capillary electrophoresis Comparison with potentiometric titration and spectrometric data. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 31, 165-171.
- [81] Celik, H. Buyukaga, M., Celebier, M., Turkoz Acar, E., Baymak, M. S., Gokhan Kelekci, N., Palaska, E., Erdogan, H. (2013). Determination of pKa Values of Some Benzoxazoline Derivatives and the Structure – Activity Relationship. *J. Chem. Eng. Data*, 58, 1589-1596.
- [82] Workman, J. (1998). Ultraviolet, Visible, and Near-Infrared Spectrometry. *Applied Spectroscopy*, (s. 29-34). New York: Academic Press.
- [83] Skoog, D., Holler, J., Crouch, S. (2018). Molecular Spectroscopy. *Principles of instrumental analysis*, (s. 305-342).
- [84] Islam, M. S., Renner, F., Foster, K., Oderinde, M. S., Stefanski, K., Mitra, S. (2022). Enhanced aqueous dissolution of hydrophobic apixaban via direct incorporation of hydrophilic nanographene oxide. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 216.
- [85] Barbas, R., Puigjaner, C., Prohens, R. (2018). Assembling the Puzzle of Apixaban Solid Forms. *Mol. Pharm.*, 15 (5), 1909-1916.
- [86] American Chemical Society. Apixaban. (2022). <https://www.acs.org/molecule-of-the-week/archive/a/apixaban.html>
- [87] Heyrovsky, J., Zuman, P. (1968). Tables of Half- Wave Potentials. *Practical Polarography*, (s. 198). New York: Academic Press.
- [88] Kissenger, P. T., Heineman, W. R. (1996). *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*. New York: R. Marcel Dekkel INC.
- [89] Baymak, M. S., Celik, H., Ozkan, S. A. (2015). The Application of Differential

- Pulse Polarography to the Analysis of Capecitabine and Investigation of Its Electroreduction Mechanism. *J. Electrochem. Soc.*, 162 (6), 29-35.
- [90] P. Pharmaceuticals, "CLINICAL INFORMATION AMENDMENT," 2020. <https://www.fda.gov/media/143144/download#:~:text=As embodied in the Notice,market for independent business reasons.>
- [91] Skelley, J. W., Thomason, A. R., Nolen, J. C. (2018). Betrixaban (Bevyxxa): A direct-acting oral anticoagulant factor Xa inhibitor. *P T*, 43 (2), 85-120.
- [92] Meites, L. (1965). *Polarographic Techniques*, 2nd ed. John Wiley & Sons, INC.
- [93] Celik, H., Ekmekci, G., Ludvík, J., Pícha, J., Zuman, P. (2006). Electroreduction of aromatic oximes: Diprotonation, adsorption, imine formation, and substituent effects. *J. Phys. Chem. B*, 110 (13), 6785-6796.
- [94] Boehr S., Haen, E. (2017). Development of an UHPLC-UV-method for quantification of direct oral anticoagulants: Apixaban, rivaroxaban, dabigatran, and its prodrug dabigatran etexilate in human serum. *Ther. Drug Monit.*, 39 (1), 66-76.
- [95] AstraZeneca, "Withdrawal of Ximelagatran," 2006. https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/withdrawal-letter-ximelagatran-36-mg-film-coated-tablets_en.pdf
- [96] Wienen, W., Stassen, J. M., Priepeke, H., Ries, U. J., Huel, N. (2007). Effects of the direct thrombin inhibitor dabigatran and its orally active prodrug, dabigatran etexilate, on thrombus formation and bleeding time in rats. *Thromb. Haemost.*, 98 (2), 333-338.
- [97] Ahrens, I., Lip, G. Y. H., Peter, K. (2010). New oral anticoagulant drugs in cardiovascular disease. *Thromb. Haemost.*, 104 (1), 49-60.

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Ülfet ERDOĞAN UZUNOĞLU

