

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SİLDENAFİL VE TADALAFİL ETKEN MADDELERİNİN
YASAL/SAHTE İLAÇLARDA, ENERJİ İÇECEKLERİNDE VE
ATIKSU ÖRNEKLERİNDE YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI
KROMATOĞRAFİSİ İLE EŞZAMANLI TAYİNLERİ**

ALİ KEMAL FİDAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. SEZGİN BAKIRDERE**

İSTANBUL, 2016

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİLDENAFİL VE TADALAFİL ETKEN MADDELERİNİN
YASAL/SAHTE İLAÇLARDA, ENERJİ İÇECEKLERİNDE VE
ATIKSU ÖRNEKLERİNDE YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI
KROMATOĞRAFİSİ İLE EŞZAMANLI TAYİNLERİ**

Ali Kemal FİDAN tarafından hazırlanan tez çalışması 29.11.2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya Programı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Sezgin BAKIRDERE
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Sezgin BAKIRDERE
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Yücel ŞAHİN

Yıldız Teknik Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Fatih POLAT

Gaziosmanpaşa Üniversitesi



Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün 2015-01-02-YL07 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Öncelikle askerlik görevimde tanışmış olduğum ve o dönemde askeriye yapmış olduğu katkılar, bizlere kattığı bilgi birikimlerinden dolayı kendisiyle çalışmaktan onur duyduğum ayrıca yüksek lisans tezi çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübesiyle her adımımı titizlikle takip eden asteğmenim ve danışman hocam Sayın Doç. Dr. Sezgin BAKIRDERE'ye;

Deneysel çalışmalarım sırasında desteğini ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Fatma TURAK, Arş. Gör. Çağdaş BÜYÜKPINAR ve Dotse Selali CHORMEY'e, ayrıca dostluklarıyla yanımda olan arkadaşlarım Hakan ŞİMŞEK, Tuğba GÜNGÖR ve Hakkı GÖNÜL'le ayrıca teşekkür ederim.

Tezimin hazırlanmasında yardım ve desteklerini benden esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Hakan SERBEST, Tuğçe UNUTKAN ve Elif Seda KOÇOĞLU'na teşekkürü bir borç biliyorum.

Son olarak, yüksek lisans çalışmalarım boyunca her zaman beni destekleyen eşim Gülay FİDAN, babam M. Şerif ve FİDAN ailesine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Kasım, 2016

Ali Kemal FİDAN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	x
ÇİZELGE LİSTESİ	xiv
ÖZET	xv
ABSTRACT	xvii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı	2
1.3 Hipotez.....	2
BÖLÜM 2	
FOSFODİESTERAZ-5.....	4
2.1 Fosfodiesteraz -5 ile İlgili Genel Bilgiler	4
2.2 Eretil Disfonksiyonun Tanı ve Tedavisinde FDE-5'in Yeri	4
2.2 FDE-5 inhibitörü olan moleküller	5
2.2.1 Sildenafil.....	5
2.2.1.1 Sildenafilin Kimyasal Özellikleri.....	5
2.2.1.2 Sildenafilin Farmakokinetik Özellikleri.....	6
2.2.1.3 Sildenafilin İlaç Endüstrisindeki Yeri.....	6
2.2.1.4 Prostat Kanseri Tedavisinde Sildenafil Kullanımı.....	7
2.2.2 Tadalafil.....	7
2.2.2.1 Tadalafilin Kimyasal Özellikleri.....	7
2.2.2.2 Tadalafilin FDE-5'deki Yeri.....	7
2.2.2.3 Tadalafilin Farmokokinetik Özellikleri	8
2.2.2.4 Tadalafilin İlaç Endüstrisindeki Yeri	8
2.3 Akılcı İlaç Kullanımı	9

BÖLÜM 3

İLAC ETKEN MADDE MİKTAR TAYİN YÖNTEMLERİ	11
3.1 Spektrofluorometrik Yöntemler	11
3.2 Spektroskopik Yöntemler	12
3.3 Elektroanalitik Yöntemler	13
3.4 Kromatografik Yöntemler	14

BÖLÜM 4

YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC)	17
4.1 HPLC Cihazının Donanımları	18
4.1.1 Mobil Faz	18
4.1.2 Pompa	18
4.1.3 Enjektör	18
4.1.4 Kolon	18
4.1.5 Dedektör	19
4.1.6 Görüntüleme Sistemi	19
4.2 Kromatografik Ayrımı Etkileyen Parametreler	19
4.2.1 Sıcaklık	19
4.2.2 pH	19
4.2.3 Mobil Fazdaki Tampon Çözelti Konsantrasyonu	20
4.3 Literatürde HPLC ile İlgili Yapılan Çalışmalar	20

BÖLÜM 5

EKSTRAKSİYON	23
5.1 Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu	23
5.2 Katı Faz Ekstraksiyonu	24
5.3 İyon Değiştirme	24
5.4 Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu	25

BÖLÜM 6

DENEYSEL ÇALIŞMALAR	26
6.1 Kullanılan Cihazlar	26
6.1.1 HPLC Donanımı	26
6.1.2 Diğer Ekipmanlar	26
6.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler	27
6.3 Optimizasyon	27
6.4 Sistem Analitik Performansının Tespiti	30
6.5 Farklı Marka Tabletlerde Tadalafıl ve Sildanafıl Etkin Maddelerinin Kantitatif Tayinleri	34
6.5.1 Marka A	36
6.5.2 Marka B	40
6.5.3 Marka C	43
6.5.4 Marka D	45
6.5.5 Marka E	47
6.5.6 Marka F	49
6.5.7 Marka G	51

6.5.8	Marka H.....	52
6.5.9	Marka I.....	56
6.6	Sildenafil ve Tadalafil Etken Maddelerinin Atıksu Örneklerinde Tayinleri.....	58
6.7	Sildenafil ve Tadalafil Etken Maddelerinin Piyasada Satılan Enerji İçeceklerinde Tayinleri.....	63
6.7.1	Marka X.....	64
6.7.2	Marka Y.....	65
6.7.3	Marka Z.....	68
BÖLÜM 7		
SONUÇ VE ÖNERİLER.....		69
KAYNAKLAR.....		72
ÖZGEÇMİŞ.....		81



SİMGE LİSTESİ

Ca	Kalsiyum
L	Litre
min	Dakika
mg	Miligram
mL	Mililitre
mmol	Milimol
ng	Nanogram
nm	Nanometre
µg	Mikrogram
°C	Derece Celsius

KISALTMA LİSTESİ

ACN	Asetonitril
c-AMP	Siklik Adenozin Monofosfat
c-GMP	Siklik Guanil Monofosfat
CPMAS	Cross-Polarization Magic Angle Spinning
CYP	Sitokrom P450
DAD	Diode Array Detection
DOSY	Difüzyon Sıralı Spektroskopisi
ED	Erektile Disfonksiyon
ESI-MS	Electrospray Ionisation Mass Spectrometry
FDA	Food Drug Administration
FDE-5	Fosfodiesteraz-5
GC	Gaz Kromatografisi
HPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
IR	Kızılötesi
LC-MS	Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantitation
MWCNT	Çok Duvarlı Karbon Nano Tüp
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
RI	Refraktif İndeks
RSD	Relative Standard Deviation
TAD	Tadalafil
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
UHPLC	Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
UV-VIS	Ultraviyole-Görünür Bölge

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2. 1 Sildenafilin kimyasal yapısı.....	5
Şekil 2. 2 Tadalafil moleküler yapısı	7
Şekil 4. 1 HPLC sisteminin şematik gösterimi	17
Şekil 6. 1 100 mg L ⁻¹ tadalafil standardının Thermo HPLC-UV sistemi ile elde edilen kromatogram	28
Şekil 6. 2 100 mg L ⁻¹ sildenafil sitrat standardının Thermo HPLC-UV ile elde edilen kromatogram	29
Şekil 6. 3 50 mg L ⁻¹ tadalafil ve sildenafil sitrat standart karışımlarının Thermo HPLC sisteminde elde edilen kromatogram	30
Şekil 6. 4 0.10-100 mg L ⁻¹ aralığında tadalafil ve sildenafil sitrat standartlarının Thermo HPLC sistemine enjeksiyonu ile elde edilen kromatogramlar	31
Şekil 6. 5 HPLC sisteminde optimum şartlar altında elde edilen tadalafil etken maddesine ait kalibrasyon doğrusu.....	31
Şekil 6. 6 HPLC sisteminde optimum şartlar altında elde edilen sildenafil sitrat etken maddesine ait kalibrasyon doğrusu	32
Şekil 6. 7 20 mg L ⁻¹ tadalafil ve sildenafil sitrat analitlerinin Agilent HP-1100 sistemine enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram (Rezölüsyonu: 8.4, simetri faktörü 1.2 'dir)	32
Şekil 6. 8 LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanması için en düşük derişim 0.10 mg L ⁻¹ standartların Thermo HPLC-UV sistemine 6 kez gönderilmesiyle elde edilen kromatogramlar	33
Şekil 6. 9 Çizelge 6.1'de belirtilen şartlar altında HPLC cihazına hazırlanmış olan Sildenafil sitrat (1.5-140 mg L ⁻¹ sildenafil) ve Tadalafil (2.0-200 mg L ⁻¹) standartlarının kromatogramları.....	35
Şekil 6. 10 1.5-140 mg L ⁻¹ sildenafil standardının Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen doğrusal kalibrasyon grafiği.....	35
Şekil 6. 11 2.0-50 mg L ⁻¹ tadalafil standardının Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen doğrusal kalibrasyon grafiği	36
Şekil 6. 12 Marka A'ya ait fotoğraf.....	36
Şekil 6. 13 Marka A'nın Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogram.....	37
Şekil 6. 14 20 mg L ⁻¹ sildenafil sitrat ve tadalafil standardı ile Marka A'nın Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar	37
Şekil 6. 15 Marka A'nın Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Thermo HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar (3 paralel).....	38

Şekil 6. 16	20 mg L ⁻¹ sildenafil sitrat ve tadalafil standardı ile Marka A'nın Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Thermo HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar	39
Şekil 6. 17	Marka B ya ait fotoğraf.....	40
Şekil 6. 18	Marka B'nin Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogram.....	40
Şekil 6. 19	20 mg L ⁻¹ sildenafil ve tadalafil standardı ile Marka B'nin Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar	41
Şekil 6. 20	Marka B'nin Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Thermo HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar (3 paralel).....	41
Şekil 6. 21	20 mg L ⁻¹ sildenafil ve tadalafil standardı ile Marka B'nin Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Thermo HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar	42
Şekil 6. 22	Marka C ye ait fotoğraf.....	43
Şekil 6. 23	Marka C'nin Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogram.....	43
Şekil 6. 24	20 mg L ⁻¹ sildenafil ve tadalafil standardı ile Marka C'nin Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar	44
Şekil 6. 25	Marka C'nin Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Thermo HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar (3 paralel örnek)...	44
Şekil 6. 26	Mix sildenafil ve tadalafil standardı ile Marka C'nin Çizelge 6.1' de görülen şartlar altında Thermo HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar	45
Şekil 6. 27	Marka D' ye ait fotoğraf.....	46
Şekil 6. 28	Marka D'nin Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogram.....	46
Şekil 6. 29	20 mg L ⁻¹ sildenafil sitrat ve tadalafil standardı ile Marka D'nin Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar	47
Şekil 6. 30	Marka E'ye ait fotoğraf	47
Şekil 6. 31	Marka E'nin Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogram.....	48
Şekil 6. 32	20 mg L ⁻¹ sildenafil sitrat ve tadalafil standardı ile Marka E'nin Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar	48
Şekil 6. 33	Marka F' ye ait fotoğraf	49
Şekil 6. 34	Marka F'nin Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogram.....	50
Şekil 6. 35	20 mg L ⁻¹ sildenafil sitrat ve tadalafil standardı ile Marka F'nin Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar	50
Şekil 6. 36	Marka G' ye ait fotoğraf	51
Şekil 6. 37	Marka G'nin Çizelge 6.1'de görülen optimum şartlarda Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogram.....	51
Şekil 6. 38	20 mg L ⁻¹ sildenafil sitrat ve tadalafil standardı ile Marka G'nin Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar	52

Şekil 6. 39	Marka H' ye ait fotoğraf	52
Şekil 6. 40	Marka H'nin Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogram.....	53
Şekil 6. 41	20 mg L ⁻¹ sildenafil sitrat ve tadalafil standardı ile Marka H'nin Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar	53
Şekil 6. 42	Marka H'nin Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Thermo HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogram.....	54
Şekil 6. 43	20 mg L ⁻¹ sildenafil sitrat ve tadalafil standardı ile Marka H'nin Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Thermo HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar	54
Şekil 6. 44	0.8 mL Marka H ekstraktına 0.2 mL 100 mg L ⁻¹ mix standard ilave sonrası Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Thermo HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar (Mavi: Marka H, Pembe: 20.0 mg L ⁻¹ mix standart, Yeşil: 0.80 mL numune + 0.20 mL 100 mg L ⁻¹ mix standart)	55
Şekil 6. 45	Marka I' ya ait fotoğraf	56
Şekil 6. 46	Marka I'nın Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogram.....	56
Şekil 6. 47	20 mg L ⁻¹ sildenafil sitrat ve tadalafil standardı ile Marka I'nın Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar	57
Şekil 6. 48	Marka I' nın Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Thermo HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogram.....	57
Şekil 6. 49	20 mg L ⁻¹ sildenafil sitrat ve tadalafil standardı ile Marka I'nın Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Thermo HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar	58
Şekil 6. 50	Buzdolabında (-4 °C) bekletilen vialin Thermo HPLC sistemine optimum şartlar altında gönderilmesi sonucu çalışmanın başı ortası ve sonunda elde edilen kromatogramlar	59
Şekil 6. 51	Atıksu örneğinin Thermo HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogram	60
Şekil 6. 52	Atıksu matriksinde hazırlanmış 5.0 µg/mL sildenafil ve tadalafil içeren standardın optimum şartlar altında HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogram	61
Şekil 6. 53	Analit alıkonma sürelerinde bir kayma olup olmadığının tespitine yönelik elde edilen HPLC kromatogramları: Atıksu örneği (Turkuaz), atıksu matriksinde hazırlanmış 5.0 µg/mL mix standart (Pembe), tampon çözelti ile hazırlanmış 5.0 (Yeşil) ve 10.0 µg/mL (Mavi) mix standartlar .	61
Şekil 6. 54	0.50 mg L ⁻¹ sildenafil ve tadalafil standardının Shimadzu HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar	63
Şekil 6. 55	Farklı derişimlerde sildenafil sitrat ve tadalafil mix standartlarının Shimadzu HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar ..	64
Şekil 6. 56	Marka X enerji içeceğinin Thermo HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogram	64
Şekil 6. 57	Marka X enerji içeceğine 50 mg L ⁻¹ ve 100 mg L ⁻¹ derişimlerde mix standarttan eşit hacimde spike edilmesi sonrası Thermo HPLC sisteminde elde edilen kromatogramlar	65

Şekil 6. 58 Beş kat seyreltilmiş Marka Y enerji içeceğinin Thermo HPLC sisteminde elde edilen kromatogramı	66
Şekil 6. 59 Marka Y enerji içeceğinin Thermo HPLC sisteminde elde edilen standart katma kromatogramları (Pembe:+0, Mavi:+20 mg/L sildenafil sitrat, Yeşil:+40 mg/L sildenafil sitrat).....	67
Şekil 6. 60 Marka Y enerji içeceğinin standart katma deneyinde elde edilen kalibrasyon grafiği	67
Şekil 6. 61 20 kat seyreltilmiş Marka Z enerji içeceğinin Shimadzu HPLC sisteminde elde edilen kromatogram	68
Şekil 6. 62 Marka Z enerji içeceğinin Shimadzu HPLC sisteminde elde edilen standart katma kromatogramları	68



ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2. 1 Sildenafil içeren ilaçlar	6
Çizelge 2. 2 Tadalafil içeren ilaçlar.....	9
Çizelge 4. 1 HPLC sisteminin şematik gösterimi.....	16
Çizelge 6. 1 %65 ACN - %35 tampon (pH 6.60) sisteminde tadalafil ve sildenafil'in HPLC sisteminde tayinine yönelik parametreler	28
Çizelge 6. 2 Sinyal pik alanları kullanılarak bulunan analitlere ait sistem analitik performans değerleri	33

SİLDENAFİL VE TADALAFİL ETKEN MADDELERİNİN YASAL/SAHTE İLAÇLARDA, ENERJİ İÇECEKLERİNDE VE ATIKSU ÖRNEKLERİNDE YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE EŞZAMANLI TAYİNLERİ

Ali Kemal FİDAN
Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Sezgin BAKIRDERE

Bu tez kapsamında, sildenafil ve tadalafil etken maddelerinin yasal, yasadışı/sahte ilaçlarda, enerji içeceklerinde ve atıksu örneklerinde eşzamanlı tayinlerine yönelik duyarlı bir analitik yöntem geliştirilmiştir. Analitlerin kromatografik ayırımları pH 6.0'ya ayarlanmış 50 mM fosfat tamponu ve asetonyitril (35:65, v/v)' den oluşan hareketli fazın 1.0 mL/min akış hızında kullanılması ile elde edilmiştir. Optimum şartlar altında analitler 6.0 dakika içerisinde yüksek çözünürlükte birbirlerinden ayrılmışlardır. Kantitatif tayinde üç farklı HPLC sistemi kullanılmıştır. Tüm sistemlerde iki analit için de kalibrasyon grafiği geniş bir aralıkta doğrusal olarak tespit edilmiştir ($R^2=0.999$).

Valide edilmiş metot başarılı bir şekilde yasal, yasadışı/sahte ilaçlara, İstanbul'da tüketilen enerji içeceklerine ve atıksu örneklerine uygulanmıştır. Dokuz farklı yasal ve yasadışı erektil disfonksiyon ilacı içeriğinde bulunan analitlerin kalitatif ve kantitatif tayini amacı ile analiz edilmiş ve bulunan değerler ilaç etiketlerinde yazan değerler ile karşılaştırılmıştır. Üç farklı enerji içeceği de içeriklerinde bulunan sildenafil ve tadalafil analitlerinin tespiti amacı ile analiz edilmiştir. Sonuçlar üzerine matriks etkisinin belirlenmesine yönelik standart katma deneyleri yapılmıştır.

Benzer şekilde atıksu örnekleri de optimum şartlar altında analiz edilmiştir. Geri kazanım verimlerinin tespiti amacı ile spike deneyleri yapılmış, sildenafil ve tadalafil için geri kazanım değerleri sırası ile $\%101.30 \pm 3.43$ and $\%102.68 \pm 1.59$ olarak hesaplanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Sildenafil, tadalafil, HPLC, enerji ieeği, atık su, ila



ABSTRACT

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF SILDENAFIL AND TADALAFIL IN LEGAL, ILLICIT/COUNTERFEIT DRUGS, ENERGY DRINKS AND WASTE WATER SAMPLES BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Ali Kemal FİDAN

Department of Chemistry

MSc. Thesis

Adviser: Assoc. Prof. Dr. Sezgin BAKIRDERE

In this tehsis, a sensitive analytical method was developed for the simultaneous determination of sildenafil and tadalafil in legal, illicit/counterfeit drugs, energy drinks and waste water samples. Chromatographic separation of two analytes was achieved on a C18 column with a mobile phase including 50 mM phosphate buffer at pH 6.0 and acetonitrile (35:65, v/v) at the flow rate of 1.0 mL/min. Analytes were separated from each other in 6.0 minutes with high resolution under the optimum conditions.

Three different HPLC systems were used in quantification. Calibration plots for both analytes were linear in wide range with correlation coefficients over 0.999 for all HPLC system. Validated method was successfully applied to legal and illicit erectile dysfunction drugs, energy drinks consumed in İstanbul/Turkey and waste water samples. Nine different legal and illicit erectile dysfunction drug samples were analyzed for qualitative and quantitative measurement of their ingredients, and results found were compared with the values written on the labels of drugs.

Three energy drinks were also analyzed for their sildenafil and tadalafil content. Standart addition method was applied to figure out the matrix effect on the results. Similarly, waste water sample was analyzed under the optimum conditions. In order

to calculate the recoveries, spiking experiment was performed and recovery rates for sildenafil and tadalafil were calculated as $101.30 \pm 3.43\%$ and $102.68 \pm 1.59\%$, respectively.

Keywords: Sildenafil, tadalafil, HPLC, energy drink, waste water, drug



GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Bir cinsel durum rahatsızlığı olarak bilinen erektil disfonksiyon günümüzde yaygın bir rahatsızlık olarak ortaya çıkmaktadır. 40-70 yaş aralığındaki erkeklerin %52-67 arasında bu rahatsızlıktan etkilediği bilinmektedir. Eretil disfonksiyonun meydana gelmesindeki en büyük sebep ilerlemiş yaştır ve 40 yaşından sonraki erkeklerde bu hastalığa rastlanma oranı oldukça yüksektir [1], [2], [3]. Epidemiyolojik araştırmalara göre, her beş erkekten biri ereksiyonda bozukluk yaşamaktadır. Bu bozukluklarının psikolojik sebeplere bağlı olduğu bilinmesine rağmen, 50 yaş üstü erkeklerde organik temelli olarak da meydana gelmektedir [3]. Cinsel işlev bozuklukları, birçok toplumda hala bir tabu konusu olarak görülmekle birlikte, eskiden bu konu hakkındaki bilimsel çalışmalar diğer tıbbi koşullara göre aktif bir şekilde takip edilememiş, ancak daha sonraki dönemlerde bu hastalıklara yönelik farklı tedavi yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır [4]. Selektif fosfodiesteraz tip 5 inhibitörleri (FDE-5) erektil disfonksiyon tedavisinin temelini oluşturur [5], [6]. Sildenafil ve daha sonra geliştirilen tadalafil ve vardenafil kimyasalları FDE-5 inhibitörleri olarak bilinmektedir. Bu ilaçlar, iyi tolere edilir, son derece etkilidir ve çok olumlu güvenlik profillerine sahiptirler. Amerika Birleşik Devletleri'nde üç tane (sildenafil, tadalafil ve vardenafil) FDE-5 inhibitörü kullanılmaktadır [5], [7]. Her bir ilaç, farklı farmakokinetik özellik ve yan etkilere sahip olmasına rağmen erektil disfonksiyon tedavisinde yüksek etkiye sahiptirler. Sildenafil ve vardenafil, yapılarından dolayı minimal düzeyde bir farklılık göstermektedir. Tadalafil ise sildenafil ve vardenafilden yapısal olarak çok farklı olmakla beraber, bu durum farmakokinetik farklılıklara da neden olmaktadır [4], [5], [7], [8].

Literatürde, bu kimyasalların çeşitli matrisler içerisindeki tayinine yönelik farklı analitik yöntemler bulunmaktadır. Farklı detektörlerle birleştirilmiş yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) [9], [10], [11], [12], ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UHPLC) [13], sıvı kromatografi-kütle spektroskopisi (LC-MS) [14], [15], [16] ve gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi (GC-MS) [17] yöntemleri, bu analitlerin farklı matrislerde tayinleri için çoğunlukla kullanılmaktadır. Her yöntemin birbirlerine göre üstün özellikleri mevcuttur.

1.2 Tezin Amacı

Bu tez kapsamında, insan sağlığı açısından son derece önemli etkileri olan sildenafil ve tadalafil analitlerinin farklı matrislerde düşük seviyelerde tayinlerine yönelik analitik yöntem geliştirilmesi ana hedef olarak belirlenmiştir. HPLC sisteminin tüm parametreleri optimize edilerek doğruluk ve duyarlılığı yüksek, ucuz, hızlı ve çevre dostu bir tayin yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen analitik yöntemin ilaç örneklerinde, enerji içeceklerinde ve atıksu örneklerinde kullanılabilirliğinin tespitine yönelik sistemli deneyler yapılmış ve geri kazanım deneyleri ile yöntemin etkinliği tespit edilmiştir.

1.3 Hipotez

Gün geçtikçe kullanım oranı gittikçe artan erektil disfonksiyon ilaç etken maddeleri arasında yer alan sildenafil ve tadalafil kimyasallarının farklı matrislerde ucuz, hızlı ve duyarlı bir analitik yöntem ile eşzamanlı tayinleri hem bilim camiası hem de rutin analiz laboratuvarları açısından son derece önem taşımaktadır. Belirtilen etken maddeleri içeren birçok kaçak ve sahte ilaç ülkemizde tüketilmekte ve sertifikasız olan bu tabletlerin içerikleri bilinmemektedir. Yüksek dozda alımında sonu ölümle sonuçlanabilecek birçok ciddi sağlık problemlerine neden olabilecek bu bileşenlerin kaçak ilaçlarda tayinleri toplum sağlığı açısından son derece önemlidir. Ayrıca ülkemizde tüketimi oldukça yaygınlaşan enerji içeceklerinin içeriğinde belirtilen kimyasalların varlığı alkolle kullanımı durumunda kaçınılmaz sonlara neden olabilmektedir. Bu nedenle enerji içeceklerinde belirtilen analitlerin doğruluğu ve duyarlılığı yüksek bir analitik yöntem ile tayinleri büyük önem taşımaktadır.

Erektil disfonksiyon ilaçlarının tüketilmesi sonucu sildenafil ve tadalafil kimyasallarının bir kısmı vücutta bozunmaya uğramadan atılmakta ve atıksu sistemine dâhil olmaktadır. Atıksu arıtma sistemlerinde etkin arıtım yapılamadığı durumlarda ise belirtilen

kimyasallar içme suları ile evlerimize taşınmaktadır. Atıksu örneklerinde belirtilen kimyasalların doğruluğu yüksek bir şekilde tayinleri arıtma stratejilerinin geliştirilmesi bakımından son derece önemlidir. Bu amaçla tez kapsamında atıksu örneklerinde bulunan analitlerinin eşzamanlı tayinlerine yönelik bir analitik yöntem geliştirilmeye çalışılmıştır.



FOSFODİESTERAZ-5

2.1 Fosfodiesteraz -5 ile İlgili Genel Bilgiler

1998 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde erektil disfonksiyon tedavisinde sildenafil kullanımının tedaviye olumlu bir cevap vermesinden sonra, fosfodiesteraz-5 (FDE-5) inhibitörleri ilk başlangıç aşamasında kullanılmaya başlanmıştır. 1998 yılı öncesi alfa adrenerjik ve serotonin antagonistleri bu amaçla kullanılmış, ancak yeterli etkinliği gösterememiştir [18].

Ereksiyon esnasında korpus kavernoza düz kasında gevşeme ile hücre içinde siklik adenozin monofosfat (c-AMP) ve siklik guanil monofosfat (c-GMP) oluşumları sonucu Ca konsantrasyonu düşer [19]. Canlılarda memeli hücrelerinde bulunan 11 adet FDE enziminden FDE 5,6 ve 9 c-GMP'ye bağlı olarak işlevini gerçekleştirmektedir [20]. FDE-5 enziminin kullanılmasıyla ereksiyon oluşumu başlamakta ve korpus kavernoza artış gösteren nitrik oksit (NO) ve etkinliği çoğalan c-GMP ile kolay bir ereksiyon gerçekleşmektedir. Alınan ilaçların aktivitesi nitrik oksit (NO) oluşumu ve c-GMP miktarının artışına bağlı olmakla birlikte, aynı zamanda diyabet gibi bir rahatsızlığı olan kişilerde yeterli etkiyi gösterememektedir [18].

2.2 Eretil Disfonksiyonun Tanı ve Tedavisinde FDE-5'in Yeri

Sildenafil sitratın piyasaya sürüldükten sonra ereksiyon sorunları üzerinde destek alımı hızla artış göstermiştir. Bu konudaki bilincin artması ile birlikte FDE-5 inhibitörlerinin kullanımı yaygın hale gelmiştir. Ancak bununla birlikte yan etkilerin boy göstermesi gibi bir takım sorunların ortaya çıkışı yeni araştırmaları beraberinde getirmiştir. FDE-5

inhibitör kullanımından kaynaklanan ereksiyon bozulmaları, bu konuda yeterli bilinçlenmenin olmadığını göstermektedir [21].

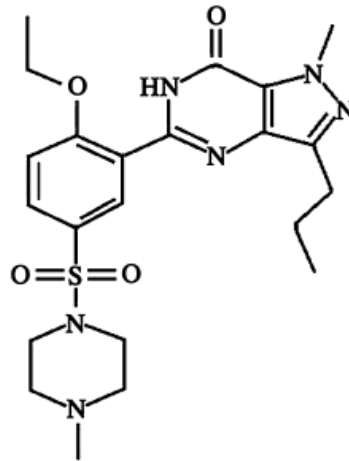
2.2 FDE-5 inhibitörü olan moleküller

Klinik uygulamalarda baş gösteren ve FDE-5 inhibitörü sınıfında yer alan etken maddeler sildenafil, vardenafil ve tadalafil olarak sıralanabilir [22], [23]. Yapısal olarak sildenafil ve vardenafil benzerlik gösterse de, tadalafilin yapısal değişikliği aktivitesi üzerinde farklılık meydana getirmektedir. Sildenafilin c-GMP' ye oranla yaklaşık 1000 kat fazla afinite ile FDE-5 enzimine bağlanmasıyla c-GMP aktivitesini yükselttiği literatürde rapor edilmiştir [24].

2.2.1 Sildenafil

2.2.1.1 Sildenafilin Kimyasal Özellikleri

Sildenafil, fosfodiesteraz Tip 5 (FDE-5) inhibitörüdür. Kimyasal ve yapısal formülü 1-[[3-(6,7-dihidro-1-metil-7-oks-3-propil)-1H-pyrazolo-[4,3-d]pyrimidin-5-yl)-4-ethoxyphenyl]-sulphonyl]-4-methylpiperazine şeklindedir (Şekil 2.1). Molekül ağırlığı 474.57 g mol⁻¹'dir [25], [26].



Şekil 2.1 Sildenafilin kimyasal yapısı [18], [19]

2.2.1.2 Sildenafilin Farmakokinetik Özellikleri

Sildenafil oral yolla alındığında %40 biyoyararlanıma sahiptir. Kullanımından 30-120 dakika sonra en yüksek kan derişimine ulaşır. Plazma proteinlerine yaklaşık olarak %96 değerinde bağlanır ve eliminasyon yarı ömrü 3 ile 5 saattir [27], [28]. Metabolitleri daha çok feçesle ve az oranda da idrar yolu ile atılır [29], [30], [31].

2.2.1.3 Sildenafilin İlaç Endüstrisindeki Yeri

Sildenafil kimyasalı erektil hastalık tedavisinde kullanımı bilinmeden önce antianjinal olarak kullanılmıştır. Daha sonra da erektil disfonksiyon tedavisinde sıkça kullanılmaya başlanmıştır [32]. Sildenafilin baş ağrısı, kızarma, dispepsi, burun tıkanıklığı, göziçi basıncında artma, baş dönmesi, renk tonlarının algılanmasında ve görüntü parlaklığında geçici bozulma, flushing gibi yan etkileri mevcuttur. Kalp hızında herhangi bir etkiye bulunmaz [29], [31], [33], [34], [35]. Trombüslerde FDE tip V içerdiğinden dolayı bu hücrelere ait fonksiyonları da etkileyebilir ve platelet agregasyonunu değiştirebilir. Fakat kanama zamanı ve mikrosirkülatuvar dağılım üzerine etkilerinin bulunmadığı gösterilmiştir [28], [36].

Çizelge 2.1’de Türkiye’de kullanımda olan sildenafil içeren ilaçların ilaç piyasasında bulunuşlarının listesi görölmektedir [37].

Çizelge 2.1 Sildenafil içeren ilaçlar

İlaç	Firma
Combo	Biofarma
Degra	Deva
Sildegra	Actavis
Sinegra	Nobel
Viagra	Pfizer
Vigaroo	Pharmactive
Vigrande	Zentiva

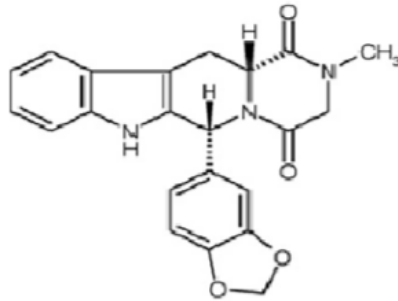
2.2.1.4 Prostat Kanseri Tedavisinde Sildenafil Kullanımı

Lokalize prostat kanseri sebebiyle uygulanan radikal prostatektomi %40-70 oranında ED komplikasyonuna sebep olmaktadır. Elde edilen çalışmalar, hastaların %43'ünün sildenafil etken maddesine olumlu yanıt verdiğini göstermiştir. Sildenafilin hastalığı tedavi edebilmesi için fonksiyonel sinir aktivitesinin olması şarttır. Sinir yapısı korunmamış hastalarda sildenafille verilen cevap oldukça düşüktür (%15). Bu oran unilateral siniri korunmuş hastalarda %50, bilateral siniri korunmuş hastalarda ise %80 olarak görülmektedir. Buna ek olarak, hastanın ameliyattan önce erektil disfonksiyonu, hastanın yaşı ve cerrahi sonrası iyileşme dönemi de etkili olmaktadır [38].

2.2.2 Tadalafil

2.2.2.1 Tadalafilin Kimyasal Özellikleri

Tadalafil, erektil disfonksiyonun tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Tadalafil, siklik guanozin monofosfatı (c-GMP) yıkan FDE-5 enziminin güçlü, seçici ve geri dönüşümlü bir inhibitörüdür. Moleküler formülü $C_{22}H_{19}N_3O_4$ olup, moleküler ağırlığı 389.41 g mol^{-1} 'dir. Şekil 2.2'de tadalafilin moleküler yapısı görülmektedir [39,40].



Şekil 2.2 Tadalafil moleküler yapısı [39, 40]

2.2.2.2 Tadalafilin FDE-5'deki Yeri

Günümüzde piyasada yer edinmiş dört FDE-5 inhibitörü bulunmaktadır. Bunlar, sildenafil, vardenafil, tadalafil ve udenafildir. Bu ilaçların yarılanma ömürleri ise sırayla 4, 4-5, 17.5 ve 12 saat kadardır [41], [42], [43]. Tadalafilin FDE-5 üzerindeki inhibitör etkisi diğer fosfodiesterazlara göre daha güçlüdür [39]. Tadalafil, yapısal olarak da diğer grup üyelerinden farklı olan yeni bir FDE-5 enzim inhibitörüdür ve kavernoz doku gevşemesi yapmaktadır [44], [45]. FDE-5 ailesinin en popüler üyesi olan sildenafil ile

ilgili flep cerrahisi yani doku eksikliğinin olduğu bir yeri vücutun başka tarafından alınan canlı bir dokuyla onarmaya çalışmak üzerine yeterli çalışma olmasına rağmen yarılanma ömrü daha uzun olan tadalafil ile ilgili yeterli çalışma yapılmamıştır [41].

2.2.2.3 Tadalafilin Farmokokinetik Özellikleri

Tadalafilin kana karışım süresi, sildenafil ve vardenafilden daha uzundur. Kandaki maksimum düzeyine 2 saatte ulaşmaktadır. Klinik veriler, tadalafilin yarılanma ömrünün benzer diğer etken maddelerden daha uzun olduğunu göstermektedir ve bu süre yaklaşık 17.5 saattir. Tadalafil etkinliği ise 36 saat boyunca devam etmektedir [44]. Tadalafil inaktif metabolitler halinde, büyük ölçüde dışkıyla ve daha az oranda idrarla atılır. Tadalafil esasen sitokrom P450 (CYP) 3A4 izotipi tarafından metabolize edilir ve bu kimyasalın dolaşıma giren ana metaboliti metilkatekol glukuronidtir. [39], [46].

2.2.2.4 Tadalafilin İlaç Endüstrisindeki Yeri

Başlangıçta anjina pectoris yani türkçede göğüste sıkışma ya da göğüste boğumlanma olarak anılan hastalığın tedavisi için araştırılan ilk oral FDE-5 inhibitörü sildenafilin, çalışmada ereksiyona yol açtığı rastlantı eseri bulunmuştur. Sonrasında sildenafil 1998 yılında erektil disfonksiyonun ilk oral tedavisi için piyasaya sürülmüş ve sonrasında 2003 yılında sildenafili yine FDE-5 inhibitörü olan vardenafil ve tadalafil ilaçları takip etmiştir [47], [48]. Ayrıca, tadalafilin erektil disfonksiyon tedavisinde kullanımı 2003 yılında ‘Food and Drug Administration’ (FDA) tarafından onay almıştır [41], [49]. Yapılan çalışmalarda FDE-5’in kendine özgü inhibitörü olan tadalafilin antianjinal etkisi (kalbi besleyen koroner damarları genişleten ve kalbin oksijenlenmiş kan gereksinimini sağlamaya yarayan etki) olduğu görülse de yaygın kullanım alanı erektil disfonksiyon ve pulmoner hipertansiyondur [41], [50], [51]. Tadalafil içeren farklı ilaç markaları bulunmaktadır. Çizelge 2.2’de Türkiye’de kullanımda olan ve tadalafil içeren ilaçların ilaç piyasasında bulunuşlarının listesi görölmektedir [37].

Çizelge 2.2 Tadalafil içeren ilaçlar [37]

İlaç	Firma
Afilta	Zentiva
Cialis	Lilly
Departon	Abdi İbrahim
Hardcis	Deva
Lex	Nobel
Lifta	Abdi İbrahim
Longis	Berksam
Longivo	Sandoz
Myesed	Pharmactive
Orcafil	World Medicine
Tadlis	Nuvomed
Tork	Bilim

2.3 Akılcı İlaç Kullanımı

Hastanın klinik ihtiyaçlarını karşılayan doğru tedaviyi, kişisel ihtiyaçlarına göre belirlenen uygun dozajda, yeterli süre içerisinde, en düşük maliyetle alması akılcı ilaç kullanımı olarak tanımlanabilir. Hastaya uygulanacak tedavinin başarılı bir şekilde uygulanabilmesi bazı ilkelere bağlıdır. Bu ilkeler, hastalığın doğru teşhisi, teşhis edilen hastalığa uygun doğru tedavi ve uyundur. Uyunc, reçetede yazılan ilaçlar hakkında hekim tarafından kendisine yapılan tavsiyelere hastanın uyma istek ve derecesidir. Ayrıca, doğru ilacın, yeterli olabilecek dozda ve sürede hastaya verilmesi ve kullanılan ilaçların kullanım talimatlarına ve saklama koşullarına uyulması da doğru tedavi için gerekli basamaklardır. Bu basamaklardan herhangi biri düzgün yürütülemez ise bu

durum, ilacın hastaya sağlayacağı yararı değiştirir hatta hastaya zarar bile verebilir [52], [53].

Akılcı ilaç kullanımının tam olarak benimsenmemesi, gelişmiş ya da gelişmekte olan ülkelerde ciddi tıbbi ve ekonomik sorunlara yol açmaktadır [54], [55], [56]. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre tüm ilaçların yüzde elliden fazlası uygunsuz şekilde reçete edilmekte, dağıtılmakta ya da satılmaktadır [61]. Bu durumun engellenmesi için Dünya Sağlık Örgütü liderliğinde çalışmalar başlatılmış ve yürütülmektedir [52], [53], [57]. Akılcı ilaç kullanımı ilkelerine uyumun sağlanması aşamasında hekimlere olduğu kadar, hastalara, eczacılara, sağlık personellerine, ilaç endüstrisine, resmi makamlara ve bireylere de önemli roller düşmektedir [58], [59], [60].



İLAÇ ETKEN MADDE MİKTAR TAYİN YÖNTEMLERİ

İlaçlar içerisinde bulundurdıkları etken maddelere göre kendilerine özgü etki mekanizmalarına sahip olurlar. Ayrıca, gereğinden fazla etken madde alımı çeşitli yan etkilere sebebiyet verebilmekte, gereğinden az etken madde alımı ise hastalıkların tedavisinde herhangi bir etki gösterememektedir. Bu nedenle de bu maddelerin ilaç içerisindeki miktarlarının belirlenmesi dünyada farklı amaçlar için ilaç kullanımının da günden güne artış göstermesiyle birlikte son derece önemli hale gelmiştir. Bu durum aynı zamanda farklı tayin yöntemlerinin geliştirilmesine de olanak sağlamıştır. Bu tayin yöntemleri, spektrofotometrik yöntemler, spektrofotometrik yöntemler, elektrokimyasal yöntemler ve kromatografik yöntemler olarak özetlenebilir [62], [63], [64], [65].

3.1 Spektrofluorimetrik Yöntemler

Spektrofluorimetri yöntemi, ilaç etken madde miktar tayinlerinde tercih edilebilir özelliklere sahip bir yöntemdir. Yüksek duyarlılıkta analizlere imkan vermesi, kolay uygulanabilir olması ve spesifik bir yöntem olması tercih edilebilir olmasını sağlayan özelliklerindendir [62], [64]. $0.001-1.0 \text{ mg L}^{-1}$ konsantrasyona sahip analitlerin analizinde bu yöntem kullanılabilmektedir. Spektrofluorimetrik yöntemler, molekül yapılarından dolayı floresans özellik gösteren ilaç etken maddelerinin tayinlerinde uygulanabilen bir yöntemdir. Doğrudan uygulanabilen bir yöntem olmaması nedeniyle analiz öncesinde analitin türevlendirilmesini gerektirmektedir [63], [66], [67], [68]. Literatürde spektrofluorimetrik tayinlerin ilaç etken maddelerinin tayinlerinde kullanıldığı birçok çalışma rapor edilmiştir.

Wang ve ark. sildenafilin spektrofluorimetrik tayinine yönelik alternatif olabilecek yeni bir analitik yöntem üzerine çalışmışlardır [69]. Sulu çözeltilerde, sildenafil sınırlı bir

doğrusal aralık ve çok düşük floresan emisyonu göstermektedir. Katyonik bir yüzey aktif madde olan hexadecyltrim etilamonyum bromür (Yöntem A) ve anyonik bir yüzey aktif madde olan sodyum dodesil sülfat (Yöntem B) varlığında, büyük bir floresan artışı gözlemlenmiş ve doğrusal aralığı genişletilmiştir. Bu yüzey aktif maddeler ile ilaç etkileşimleri sildenafilin spektrofotometrik tayini için iki hassas yöntemin geliştirilmesini sağlamıştır. Sildenafil ile yüzey aktif maddeler arasındaki etkileşimin doğası üzerine çalışılmış ve bu birlikteliği etkileyen farklı parametreler üzerine tartışılmıştır. Sildenafilin tayininde yöntem A ve yöntem B kullanılarak sırasıyla 435 nm ve 415 nm’de kantitatif olarak çalışılmış ve tayin limitleri $0.0012 \mu\text{g mL}^{-1}$ ile $0.0016 \mu\text{g mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntem, yığın ilaçlar, tabletler ve bitkisel ilaçlara başarıyla uygulanmıştır.

El-Enin ve ark. [70] çalışmalarında, tadalafil (TAD) ve vardenafil için saf formları, tablet formları ve insan plazmasına standart eklenmiş formlarında tayinine yönelik, geçerli, hassas ve hızlı bir spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Geliştirilen bu yöntem, her iki ilaç etken maddesinin asetonitril içerisinde tadalafil ve vardenafil için sırasıyla 330 nm ve 470 nm dalga boyundaki ve uyarıldıktan sonra 280 nm ve 275 nm dalga boyundaki temel floresan ölçümüne dayanmaktadır. Tayin limitleri tadalafil ve vardenafil için sırasıyla 1 ve 3 ng mL⁻¹ olarak elde edilmiştir. Doğrusal aralıklar ise sırası ile 4.0-40 ng mL⁻¹ ve 10-250 ng mL⁻¹ olarak bulunmuş. Floresan hassaslığını etkileyen çeşitli deneysel parametreler üzerine çalışılmış ve değişken tüm parametreler optimize edilmiştir. Geliştirilen yöntem, her iki ilaç etken maddesi içeren ilaçlara başarıyla uygulanmıştır. Ayrıca, önerilen yöntemin yüksek hassaslığı, bu iki ilaç etken maddesinin insan plazmasındaki tayinlerine de izin vermiştir.

3.2 Spektroskopik Yöntemler

Spektroskopik yöntemler atomik ve moleküler spektroskopi olmak üzere iki alt gruba ayrılır ve etken madde tayinlerinde sıklıkla tercih edilen bir analitik yöntemler grubudur. Maddenin uyarılması sonucu elektromanyetik ışık şiddetinde meydana gelen değişimin ölçülmesi esasına dayanır [71], [72], [73], [74].

En çok tercih edilen spektroskopik yöntemler, UV-VIS (Ultraviyole-Görünür Bölge), IR (Kızılötesi), NMR (Nükleer Manyetik Rezonans), kütle spektroskopisi, raman ve elektron spin rezonansıdır [63], [65], [75].

Spektroskopik yöntemlerin sildenafil ve tadalafil kimyasallarının tayininde kullanımına yönelik birçok çalışma literatürde yer almaktadır.

Trefi ve ark. [76] ilaçların kalite kontrolü için gerekli olan yeni ve kolay bir analitik yöntem geliştirilmesine yönelik çalışmışlardır. Çalışmalarında Raman Spektroskopisi, ^1H Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) ve 2D Difüzyon Temelli Spektroskopi (DOSY) NMR yöntemlerinin hakiki Cialis® ve internet yoluyla satışı yapılan, illegal şekilde üretilen yedi formülasyonun analizlerinde kullanımını açıklamışlardır. Aktif içerik olarak tadalafil içeren, sekiz ticari formülasyonun dışındaki yedisinin aktif içerikleri HPLC yöntemiyle ölçülmüş ve kutu içeriğinde belirtilen konsantrasyona yakın sonuçlar elde edilmiştir ($100 \pm 5\%$). Çin imitasyonlarında, tadalafil yerine vardenafil ve homosildenafil bulunmuştur. NMR spektroskopisi ile yapılan çalışmalar tadalafilin ilaç formülasyonlarının bileşimindeki benzerlikleri ve farklılıkları açıkça göstermiştir. Elde edilen data'lara göre, Hindistan ve Suriye'de üretilen Cialis imitasyonlarının kalitesi düzgünken, Çin formülasyonları aktif farmasötik bileşenler bakımından karışıktır.

Wawer ve ark. [77] çalışmalarında, sildenafil sitrat ve saf sildenafilin karakterizasyonunu multinükleer NMR spektroskopisi ile gerçekleştirmişlerdir. Kimyasal kayma analizleri göstermiştir ki: (i) N6-H moleküliçi hidrojen bağlarını oluşturur, (ii) N25, tuzda protonlanmıştır ve (iii) moleküllerarası OH-N hidrojen bağları, katı sildenafil içerisinde bulunan N2 ve N4 içermektedir. ^{13}C CPMAS NMR yöntemi farmasötik formülasyonlar içerisindeki Viagra'nın tanımlanma ve miktar tayini için önerilmiştir.

3.3 Elektroanalitik Yöntemler

Elektroanalitik yöntemler, elektriksel etki yapılan sistemin cevabını ölçmeye dayanan ve alınan cevap sayesinde sistem hakkında bilgi sahibi olunmasını sağlayan yöntemler bütünüdür. Kolay uygulanabilir olması ve düşük maliyetlerle çalışılabilmesi elektrokimyasal yöntemlerin avantajları arasındadır [62], [78], [79].

Elektroanalitik yöntemlerle sildenafil ve tadalafil analitlerinin de aralarında olduğu birçok ilaç aktif bileşeninin kantitatif tayinleri yapılmaktadır.

Demir ve ark. [80] çalışmalarında, tadalafilin çok duvarlı karbon nanotüp macun elektrot (MWCNTPE) ve modifiye TiO_2 -çok duvarlı karbon nanotüp macun elektrot (TiO_2 -MWCNTPE) adsorptif sıyırma kare dalga voltametrisi kullanılarak tayinine

yönelik, hassas ve seçici elektroanalitik bir yöntem sunmuşlardır. Kalibrasyon eğrisi, MWCNTPE için 3.6-8.1 ve 12.7-61.1 μM aralığında; TiO_2 -MWCNTPE için 0.27-15.2 μM aralığında lineer olarak elde edilmiştir. Tavsiye edilen yöntem, ilaç tabletlerinde ve insan serum örneklerinde başarıyla uygulanmıştır ve yüksek geri kazanım yüzdelere ulaşılmıştır. Önerilen yöntemin seçiciliği, Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , 2-merkaptobenzimidazol, tioüre ve dopamin varlığında geri kazanım testleri ile değerlendirilmiştir. Tablet yardımcı maddeleri ve biyolojik malzemeden endojen maddelerin analitik tayin üzerine hiçbir etkisi tespit edilmemiştir.

Batista ve ark. [81] çalışmalarında, diferansiyel puls voltametri ve katodik ön muamele bor katkılı elmas elektrot kullanarak sildenafil sitrat tayinini açıklamışlardır. Elde edilen analitik eğri, 7.30×10^{-7} - 7.30×10^{-6} mol L^{-1} konsantrasyon aralığında, $0.10 \text{ mol L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$ içindeki sildenafil için doğrusaldır. Tayin edilebilme limiti 6.40×10^{-7} mol L^{-1} 'dir. Önerilen yöntem, hızlı ve basit gerçekleştirilebilir olmakla birlikte, viagra farmasötik formülasyonları içindeki sildenafil sitrat tayini için %95'lik güven oranı ile başarıyla uygulanmıştır.

3.4 Kromatografik Yöntemler

Fiziksel ve kimyasal özellikleri bakımından benzerlik gösteren maddeleri birbirinden ayırmak amacıyla kullanılan yöntemler kromatografik yöntemler olarak adlandırılır. Bu yöntemde, sabit faz ve hareketli faz olmak üzere birbirine karışmayan iki faz mevcuttur. Karışımı oluşturan maddeler, sabit faz üzerinden hareketli faz yardımıyla geçerler ve geçişleri sırasındaki hız farklarına göre birbirinden ayrılırlar [71], [82].

Kromatografik yöntemler, ayrılma mekanizmalarına, uygulama şekillerine ve faz çeşitlerine göre kendi aralarında üç alt gruba ayrılmaktadırlar [62]. Bunlar;

1) Ayrılma Mekanizmalarına Göre Kromatografik Yöntemler

- Adsorbsiyon Kromatografisi
- Partisyon Kromatografisi
- İyon Değiştirme Kromatografisi
- Jel Filtrasyon Kromatografisi
- İyon Çifti Kromatografisi
- Afinite Kromatografisi

2) Uygulama Şekillerine Göre Kromatografik Yöntemler

•Düzlemsel Kromatografi

- o Kâğıt Kromatografisi
- o İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

•Kolon Kromatografisi

- o Gaz Kromatografisi (GC)
- o Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

3) Faz Çeşitlerine Göre Kromatografik Yöntemler

•Sıvı Kromatografisi

- o Sıvı-Katı Kromatografisi
- o Sıvı-Sıvı Kromatografisi

•Gaz Kromatografisi

- o Gaz-Katı Kromatografisi
- o Gaz-Sıvı Kromatografisi

Farklı kromatografik ayırma sistemleri ile sildenafil ve tadalafil tayinine yönelik çalışmalar literatürde yer almaktadır.

Zhu ve ark. [83] çalışmalarında, ultraviyole algılama ve elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometresi ile birleştirilmiş yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemini kullanarak diyet takviyelerinde yasaklanmış olan sildenafil, vardenafil ve tadalafilin eş zamanlı tayinlerine yönelik yöntem geliştirmişlerdir. Ayırma C_{18} kolonda asetonitril ve sulu solüsyonun (20 mmol amonyum asetat, %0.2 formik asit) 1 mL min⁻¹ akış hızında mobil faz olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. UV tayini için dalga boyu 292 nm olarak seçilmiştir. İlaçları tanımlanması ESI-MS kullanılarak başarıyla gerçekleştirilmiştir. Pik alanı ile konsantrasyon arasındaki lineerlik, sildenafil için 0.8-80 µg mL⁻¹, vardenafil için 2.25-225 µg mL⁻¹, tadalafil için 1.1-110 µg mL⁻¹ aralıklarında ve korelasyon katsayısı da 0.999 olarak tespit edilmiştir. Yöntemin geri kazanım verimleri %93.3-%106.1 aralığında bulunmuştur. Yöntem, doğal ek diyet ürünlerinin analizi için başarıyla uygulanmıştır.

Rossi ve ark. [84] çalışmalarında, üredaki FDE-5 tipi enzim ve onun metabolitlerinin, sıvı-sıvı ekstraksiyon sonrası gaz kromatografi-kütle spektrometresi sisteminde tayinine yönelik bir yöntem geliştirmişlerdir. FDE-5 enzimi alan kişilerden toplanan gerçek

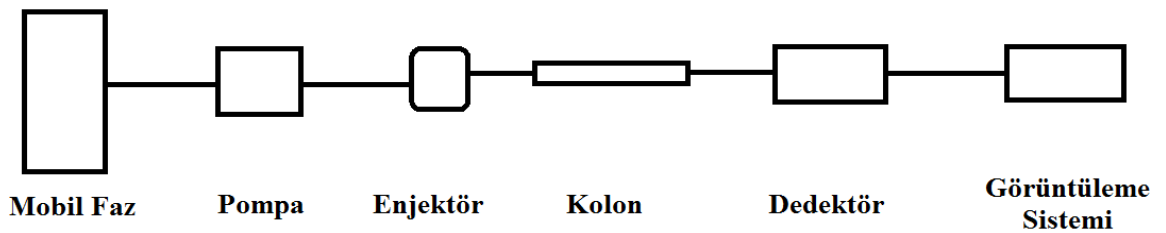
örnekler üzerinde çalışılmıştır. GC-MS sisteminin tüm parametreleri optimize edilmiş geliştirilen yöntem 5000 üre örneğindeki FDE-5 inhibitörlerinin belirlenmesi amacıyla uygulanmıştır. Elde edilen verilere göre, geliştirilen yöntemin doping analizleri de dahil olmak üzere, analitik ve adli toksikoloji alanında pratik kullanımının mümkün olduğu görülmüştür.



YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC)

Çözelti içerisinde bulunan bir analitin kalitatif ve kantitatif olarak tayin edilmesinde yaygın olarak kullanılmakta olan analitik yöntemlerden birisi de yüksek basınçlı sıvı kromatografisidir [63], [85], [86]. Ayırma gücünün iyi olması, kullanılan paslanmaz çelik kolonların yüksek basınçlara karşı dayanıklı olması, uçucu olan ve uçucu olmayan bileşikleri tayin edebilmesi, bunun yanında hızlı, yüksek hassasiyet ve doğrulukta analizin gerçekleştirilmesi gibi özellikler bu yöntemi tercih sebebi yapmaktadır [86], [87].

Analizi yapılacak numune HPLC sistemi içerisinde hareketli fazda çözünerek yüksek basınç altında sabit fazdan geçirilir. Söz konusu sabit faz dolgulu paslanmaz çelik kolonlardır. Hareketli faz piston pompası vasıtası ile sisteme pompalanır, numune de enjektör sistemi ile hareketli faz içerisine enjekte edilerek sabit faz olarak kullanılan dolgulu kolona giriş yapar. Burada karışım içerisindeki her bir analitin polaritesi farklı olduğundan kolonu farklı sürelerde ve hızlarda terk eder. Hareketli fazın dedektöre gelmesiyle her bir analite ait elde edilen sinyaller yazıcı sistemi ile görüntülenir [63], [88]. Şekil 4.1’de HPLC sistemi ile ilgili bir şematik gösterim mevcuttur.



Şekil 4.1 HPLC sisteminin şematik gösterimi [71]

4.1 HPLC Cihazının Donanımları

4.1.1 Mobil Faz

Cam veya paslanmaz çelikten yapılmış haznelere konulan mobil faz analitlerin ayrılmasında önem taşımaktadır. Hazırlanmasında kullanılan çözücünün polaritesine göre farklı HPLC türleri söz konusu olmaktadır. Genellikle apolar çözücünün kullanıldığı sistem normal fazlı HPLC, suyun karışımı olan polar bir organik çözücünün kullanıldığı sistem ise ters fazlı HPLC olarak açıklanmaktadır. Kullanılan çözücülerin ve inorganik tuzların yüksek saflıkta olması analitlerin kromatografik ayrımında büyük önem arz eder. Hazırlanan hareketli fazın süzme, ultrasonik banyoda bekletme gibi ön hazırlık işlemlerinden sonra sisteme verilmesi sistem performansının düşmesini önlemektedir [71], [89], [90].

4.1.2 Pompa

Hareketli fazın sabit faza girişinden dedektöre ulaşmasına kadar olan süreçte aktif bir rol oynayan pompalar yüksek basınca çıkabilmekte ve hareketli fazın akış hızında değişkenlik sağlayabilmektedir. Tekrarlanabilirlik özelliğinin olması, akış kontrol sağlanabilmesi gibi teknik özellikler ideal bir pompada olması gerekmektedir. Pompaların korozif etkilere karşı dayanıklı olması ancak bu özelliğin sürekliliği için düzenli bakımının yapılması gerekmektedir [91], [92].

Pompalar türlerine göre şırınga pompalar, pistonlu pompalar ve pnömatik pompalar olarak ayrılırlar [63].

4.1.3 Enjektör

Manuel ve otomatik olarak iki gruba ayrılan enjektörler numunenin hareketli faz içerisine enjekte edilmesi amacıyla kullanılırlar. Daha sonra oluşan karışım sabit faza iletilir [63], [71].

4.1.4 Kolon

Sabit faz olarak da bilinen ve çoğunlukla paslanmaz çelikten üretilen kolonlar kromatografik ayrımlarda büyük önem arz eder. Farklı çap, uzunluk ve dolgu maddesi

gibi parametrelerle değişiklik gösteren kolonlarda etkili bir ayırma sağlanması kolonun özelliklerine göre uygun bir mobil faz seçimi gerekmektedir [71], [85].

Dolgu maddeleri başta yaygın olarak kullanılan silisyum dioksit, yani silika olmak üzere, alüminyum oksit ve iyon değiştirici reçinelerdir [92], [93].

4.1.5 Dedektör

Değişik türleri bulunan dedektörler sisteme gönderilen numunenin kalitatif ve kantitatif olarak tayin edilmesi için elektrik sinyali üretirler. Her bir analit için etkili bir dedektör çeşidi olmakla birlikte, ultraviyole-görünür bölge (UV-VIS), refraktif indeks (RI), sıralı foto diyot, floresans, elektrokimyasal, kütle, evaporatif ışık dağıtıcı ve iletkenlik dedektörleri sıklıkla kullanılmaktadır [63], [93].

4.1.6 Görüntüleme Sistemi

Dedektörden çıkan sinyaller, veri toplama sistemi olarak kullanılan bilgisayarlarda kaydedilir. Her bir sinyalin değerlendirilmesi, tekrarlanabilirlik özelliği ve verilerin uzun süreli saklanması yazıcı sistemi için önem taşır [63], [71].

4.2 Kromatografik Ayrımı Etkileyen Parametreler

Kalitatif ve kantitatif yöntemlerle tayin yapılırken kromatografik sistemde değişken parametrelerin optimize edilmesi gerekmektedir. Optimizasyonda etkisi gözlemlenecek parametre haricindeki tüm parametreler sabit tutulur.

4.2.1 Sıcaklık

Analitlerin ayrılmasında önemli parametrelerden biri olan sıcaklık çözünürlüğe etki etmektedir. Polaritesi yüksek bir hareketli fazın kullanılmasıyla sıcaklıktaki değişime bağlı olarak seçicilikte farklılıklar gözlenebilir. pH sıcaklığa bağlı bir parametre olduğundan iyi optimize edilmelidir. Aksi bir durumda elde edilen kromatogramlarda pik şekli, alıkonma süresi ve pik alanının etkilenmesi söz konusudur [94], [95].

4.2.2 pH

Hareketli fazın pH değeri karışım içerisindeki analitlerin ayrılmasında önem arz etmektedir. Sabit faz yüzeyinde yer alan silanol gruplarının ve asidik-bazik bileşiklerin

ayırışma derecesini pH etkilemektedir. Bu nedenle, yüksek çözünürlükte ayırmanın gerçekleştirilebilmesinde pH önemli rol oynamaktadır. Buna bağlı olarak, pH değerinin alıkonma süresi ve pik şeklindeki değişimlerde etkisi büyüktür [96].

4.2.3 Mobil Fazdaki Tampon Çözelti Konsantrasyonu

Hareketli fazın hazırlanmasında kullanılan tampon çözeltinin yeterli tampon kapasitesine sahip olması tekrarlanabilirlik sağlanabilmesi için önemlidir. Aksi durumda, çözünen pKa değeri ile tampon pKa değeri ve hareketli faz pH değeri arasındaki dengelerde değişim gözlenebilir. Bu durum elde edilen kromatogramda pik şeklinin bozulmasıyla açıklanabilir [94].

4.3 Literatürde HPLC ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Sildenafil ve tadalafil analitlerinin farklı matrislerde tayinlerine yönelik literatürde HPLC sisteminin kullanıldığı çalışmalar rapor edilmiştir. Bojanapu ve arkadaşları, tadalafilin bulk ve tablet formlarının validasyon değerlendirmesini yapmak amacıyla hassas, hızlı ve duyarlı bir ters fazlı sıvı kromatografik yöntem geliştirmişlerdir. Ayırma işlemi Agilent Eclipse XDB C₁₈ kolonunda, hacimce 50:50 oranında tampon ve asetonitril içeren mobil faz ile yapılmıştır. pH, ortofosforik asit ile 6'ya ayarlanmıştır. Akış hızı 1.2 mL min⁻¹, dalga boyu ise 285 nm olarak belirlenmiştir. Tadalafilin alıkonma süresi 3.181 olarak bulunmuştur. Kalibrasyon eğrisinin doğrusal aralığı 10-150 ng mL⁻¹ dir. %RSD değeri metodun güvenilirliği açısından tatmin edici değerde bulunmuştur. Tadalafilin farmakolojik dozaj formunda yüksek oranda geri kazanımı için geliştirilen yöntemin uygun olduğu tespit edilmiştir [97].

Al-Hroub ve arkadaşları, sildenafilin insan plazmasında tayini için hassas, seçici ve hızlı bir HPLC-UV yöntemi geliştirmişlerdir. %5 perklorik asit çözeltisinde geri ekstraksiyonu takiben sıvı-sıvı ekstraksiyonu seçilmiştir. Kromatografik ayırma BDS C₁₈ kolonunda, % 63 su, % 37 asetonitril ve % 0.10 trietilamin içerikli mobil faz (pH 7.7) kullanılarak, 230 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon doğrusal aralığı 2.00-200 ng mL⁻¹ olarak belirlenmiştir. Sildenafilin geri kazanımı % 78.4'ten büyük bulunmuştur. Düşük tayin limitlerinde, ucuz ve basit ekstraksiyon yöntemi kullanıldığında tanımlanan UV yönteminin başarılı sonuçlar verdiği görülmüştür [98].

Mehanna ve arkadaşları, insan cildi yoluyla transdermal geçirgenlikte tadalafil kantitatif tayini için güvenilir ve hassas bir yöntem geliştirmek istemişlerdir. Ayırma işlemi oda sıcaklığında, 230 nm dalga boyunda ters fazlı kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Mobil faz 20 mM pH 7.0 fosfat tamponu ve hacimsel olarak 35/65 oranında asetonitril ve su içermektedir. Akış hızı 1.0 mL min⁻¹ olarak belirlenmiştir. Tadalafil için LOQ değeri 1 ng mL⁻¹, kalibrasyon eğrisi için doğrusal aralığı 5-2000 ng mL⁻¹ ve R² değeri 0.998 olarak bulunmuştur. Validasyon parametreleri, yöntemin hassaslığını doğrulamıştır. Bu yöntem, insan derisi çalışmalarında ilaç birikimi ve transdermal geçirgenlik içinde tadalafil belirlenmesi için kullanılmıştır [99].

Strach ve arkadaşları, sildenafil konsantrasyonlarının sıvı-sıvı ekstraksiyon ve paroksetin iç standardı kullanarak fare plazmasında (200 L) tayini için hassas bir HPLC yöntemi geliştirip validasyonunu sağlamışlardır. İstenmeyen kirlilikleri uzaklaştırmak ve pik şeklini geliştirmek amacıyla asidik bir çözelti içine geri ekstraksiyon kullanılmıştır. Kromatografik ayırma aminopropil bağlanmış fazlı kolonda, 50 mM potasyum dihidrojen fosfat tamponu (pH 4.5) asetonitril 75:25 (v:v) içeren mobil faz ile 1 mL min⁻¹ akış hızı ve 230 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrisini oluşturmak için konsantrasyon aralığı 10-1500 ng mL⁻¹ olarak belirlenmiştir. Optimum şartlar altında LOD değeri 5 ng mL⁻¹, sildenafilin geri kazanımı % 85.22 ± 4.54 olarak bulunmuştur. Oluşturulan yöntem, farelerde yapılan kinetik çalışmada başarıyla uygulanmıştır [100].

Zailina ve arkadaşları, en yaygın üç Fosfodiesteraz-5 inhibitörleri için (vardenafil, sildenafil ve tadalafil) premiks kahve içinde eşzamanlı tayin yeteneğine sahip bir analitik yöntem geliştirmişlerdir. İki farklı ekstraksiyon tekniğiyle (buharlaştırma adımıyla ve bu adım olmadan) asetonitril ya da metanol kullanarak örnek ekstraksiyon değerlendirilmiştir. Miktar tayini 230 nm, 245 nm ve 290 nm gibi farklı dalga boylarında yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile (HPLC-DAD) ve uçuşma zamanına göre kütle spektrometresi (LC-MS-TOF) ile yapılmıştır. Asetonitril ile ekstraksiyon (azotla buharlaştırma olmadan) için 245 nm'de HPLC-DAD için % 105 ile % 113 (± < % 10), LC-MS-TOF için % 93 ile % 102 (± < 2.5%) arasında geri kazanım gözlenmiştir. Kromatografik ayırma, 20 dakika sürede gradyan elüsyon ile su (%0.1 formik asit) ve asetonitril (%0.1 formik asit) içerikli mobil faz kullanılarak en iyi sonucu vermiştir [101].

Fejos ve arkadaşları, sildenafil, vardenafil, tadalafil ve bunların 11 farklı yasal olmayan ereksiyon bozukluğu ürünlerinde bulunan analoglarının UV dedektörü ile yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC-UV) ile kalitatif ve kantitatif tayinini yapmak üzere analitik bir metod geliştirmişlerdir. Ayırma işlemi 25°C’ de gradyan elüsyon ile ters fazlı Kinetex C₁₈ kolonunda gerçekleştirilmiştir. A mobil fazı 200 mM asetat çözeltisi, B mobil fazı 1:1 (v/v) oranında asetonitril ve metanol karışımı içermektedir. Akış hızı 0.50 mL min⁻¹ ve dalga boyu 290 nm’dir. Metod özgüllük, seçicilik, hassasiyet, doğrusallık, LOD, LOQ, doğruluk, sağlamlık ve stabilite gibi terimler ele alınarak valide edilmiştir ve başarıyla uygulanmıştır [102].



BÖLÜM 5

EKSTRAKSİYON

Ön hazırlık işlemlerinden biri olan ekstraksiyon farklı matrikslerdeki analit(ler)in yüksek doğrulukta ve hassasiyetle tayin edilebilmesi için kullanılan bir yöntemdir. Kalitatif ve kantitatif tüm tayinler için öncelikle analitin ekstraksiyon ile çözelti içerisine alınması söz konusudur. Kullanılan çözücüde suda çözünmeme, düşük kaynama noktasına sahip olma, ucuz ve kolay bulunma özellikleri aranmaktadır. Bu yöntem ile birlikte yüksek geri kazanım sağlanması hedeflenmektedir [103].

Ekstraksiyon yöntemlerinde sıvı-sıvı ekstraksiyonu, iyon değiştirme, katı faz ekstraksiyonu ve bulutlanma noktası ekstraksiyonu çoğunlukla kullanılan yöntemlerdir [104].

5.1 Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu

Farklı matriks içeren çözeltinin organik madde ile muamele edilmesiyle analitin çözücü bünyesine geçmesi sıvı-sıvı ekstraksiyonunu ile gerçekleştirilebilmektedir [105]. Hacmi numune hacminden düşük olan çözücü, ekstraksiyon haznesine konulur ve sonrasında numune de aynı hazneye konularak analitin organik çözücüye geçişi sağlanır [62], [104].

Literatürde sıvı-sıvı ekstraksiyon ile ilgili çalışmalar yer almaktadır. Krishnamurthy ve arkadaşları insan plazmasında sildenafil miktar tayini yapmak için diezepam internal standartı kullanarak hızlı, duyarlı ve spesifik bir yöntem geliştirmişlerdir. İlaç sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi kullanılarak matriksten uzaklaştırılmıştır. Analit ve iç standart ters faz C₁₈ analitik kolon ile izokratik ayırma modunda ayrılmış ve HPLC sisteminde koruma kolonu olarak kullanılan C₁₈ kolonunda tayin edilmiştir. 20 dakikalık analiz

süresinde doğrusallık 10-500 mg L⁻¹ olarak gözlemlenmiştir. Gün içindeki doğruluk %92.3 - %98.83, kesinlik %6.38 - %14.22 ve günler arası doğruluk %94.13-%98.43 ve kesinlik %5.68 - %11.74 olarak tespit edilmiştir [106].

Tripathi ve arkadaşları sildenafilin farmakokinetik incelemesi için sıçan plazmasında sildenafili tayini için RP-HPLC kullanarak basit ve duyarlı bir yöntem geliştirmişlerdir. İlaç numuneleri sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi ile 0.3 mL asetonitril ve 5.0 mL dietil eter kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Kromatografik ayırım C₁₈ kolonunda hacimce 85:15 oranında metanol:su mobil fazı kullanılarak 1 mL min⁻¹ akış hızında 230 nm dalga boyunda UV dedektöründe gerçekleştirilmiştir. Sildenafilin alıkonma zamanı 4.0 dakika olarak belirlenmiştir. Doğrusallık 0.1-6.0 mg L⁻¹ aralığında gözlenmiştir [107].

5.2 Katı Faz Ekstraksiyonu

Sıklıkla başvurulmuş numune hazırlama yöntemlerinden biri olan katı faz ekstraksiyonunda katı faz üzerinde başka bir forma dönüştürülen analitin adsorpsiyon işlemini takiben, öngörülen bir çözücü yardımı ile katı fazdan desorpsiyon işleminin gerçekleştirilmesi sürecini içermektedir. Geniş bir kullanım alanına sahip olan sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile kıyaslandığında katı faz ekstraksiyonunun kullanılan çözücü miktarı, işlem süresi ve maliyet bakımından uygun olması bu yöntemin tercih edilme sebepleri arasında gösterilmektedir [108].

Guermouche ve Bensalah sıçan serumundaki sildenafil ve onun metaboliti olan N-dimetilsildenafili tayini için HPLC metodu geliştirmişlerdir. Teknik, serum numunelerinin katı faz ekstraksiyon sorbenti üzerinde ekstraksiyonu işlemini içermektedir. Sisteme 0.50 mL iç satandart ihtiva eden tamponlu serum gönderilmiştir. Ayırıştırma 1.0 mL asetonitril ile yapılmıştır. Numuneler Kromasil C₁₈ kolonunda, 54:46 oranında 0.05 M fosfat tamponu: asetonitril ihtiva eden, pH 8.0' e ayarlanmış hareketli faz kullanılarak, fotodiyot dedektöründe analiz edilmiştir [109].

5.3 İyon Değişirme

Endüstriyel uygulamalarda kullanımı olan bu yöntemde çözeltide bulunan iyonlar ile çözünmemiş haldeki katı fazdaki iyonlar arasında kimyasal bir reaksiyonun gerçekleşmesi esasına dayanır. İyon değişimi için kullanılan katılar genellikle sentetik reçineler veya polimerlerdir [110].

İletken çözelti, iyon değiştirme katısı olan reğineyle temas ettirildiğinde verilen yüklerdeki iyonlar reğine tarafından tutularak, reğine bünyesinden eş miktarda iyon çözeltiye geçmektedir [104].

5.4 Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu

Artan sıcaklıkla birlikte yüzey aktif maddenin analit ile misel oluşturarak, bulutlanma noktasında faz ayrımının meydana gelmesi esasına dayanmaktadır. Ayrımı gerçekleşen fazlar yüzey aktif madde konsantrasyonunun yüksek miktarda gözlenen faz ve az miktarda gözlenen sulu fazdır. Sıcaklığın faz ayrım noktasından aşağı seviyelere düşürölmesiyle faz sayısı bir olarak gözlenmektedir [105].



DENEYSEL ÇALIŞMALAR

6.1 Kullanılan Cihazlar

6.1.1 HPLC Donanımı

Çalışmalarda kullanılan cihazlardan biri Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü araştırma laboratuvarında bulunan HPLC donanımı, Spectra System SCM1000 vakum, Spectra System P1500 pompa, Spectra System SN4000 kontrol elemanı, Spectra System AS3000 otomatik önleyici ve Spectra System UV2000 dedektörden oluşmaktadır. İkinci HPLC cihazı ise Abdi İbrahim firma bünyesinde bulunan Agilent HP-1100 marka cihazdır. Her iki cihazda da UV dedektör bulunmaktadır. Son HPLC cihazı ise SPD M20A Diode Array Dedektör, DGU 20A Degazer, SIL 20 A Oto Örnekleyici ve CTO 10 AS Kolon Fırınından müteşekkil Shimadzu HPLC sistemidir. Tüm HPLC cihazlarında Inertsil ODS 3V (4.6 x250mm,5µ) kolonu ile çalışılmıştır.

6.1.2 Diğer Ekipmanlar

- Mikro pipet: PhysioCare Concept - Eppendorf Research Plus (100-1000 µl; 0.5-5 ml)
- Hassas terazi: Sartorius Analytic A 120 S
- pH metre: Hanna HI 2211
- Manyetik karıştırıcı: IKA (RTC basic) manyetik karıştırıcı + ETS-D5 Elektronik Kontakt Termometre

- Derin dondurucu: Uğur Derin Dondurucu UCF 1600 L
- Mikrovialler: Agilent
- Cam malzemeler: Balon joje, beher, erlen, mezür

6.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmalardaki tüm kimyasallar yüksek saflıkta kullanılmıştır. Saf su Yıldız Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarlarından A Milli-Q® Reference System cihazı ile elde edilmiştir. Sildenafil sitrat ve tadalafil çözeltileri, 1000 mg L⁻¹'lik stok çözeltisinden seyreltilerek hazırlanmıştır. Mobil faz hazırlamak için asetonitril (Merck), Na₂HPO₄ (Baker) ve H₃PO₄ (Riedel) kimyasalları kullanılmıştır.

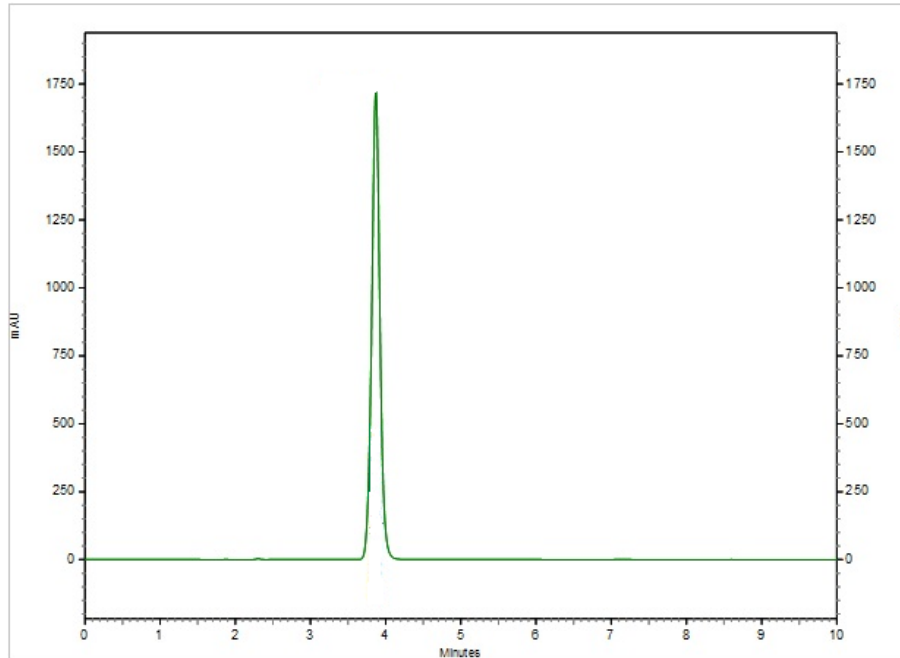
6.3 Optimizasyon

Tadalafil ve Sildenafil Sitrat'ın HPLC-UV sisteminde eser seviyelerde tayini amacı ile farklı HPLC sisteminde çalışmalar yapılmıştır. HPLC sisteminde türlerin alıkonmalarına yönelik birçok hareketli faz denenmiş ve çalışmalarda pH 6.60 ya ayarlanmış fosfat tamponu ile farklı solventler değişik oranlarda kullanılmıştır. Optimizasyon çalışmalarına Thermo cihazı ile başlanmıştır. Sildenafil ve tadalafil analitlerinin eşzamanlı kantitatif tayinlerine yönelik yapılan optimizasyon çalışmaları sonunda Çizelge 6.1'de yer alan parametreler optimum değer olarak tespit edilmiş ve çalışmalara bu değerler kullanılarak devam edilmiştir.

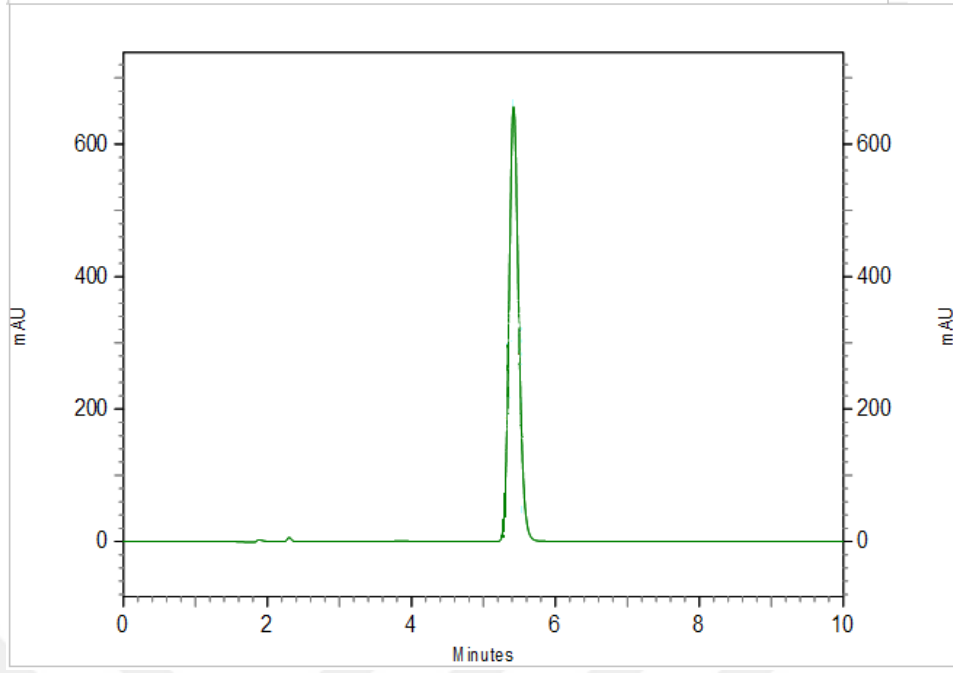
Çizelge 6.1. %65 ACN - %35 tampon (pH 6.60) sisteminde tadalafil ve sildanafil'in HPLC sisteminde tayinine yönelik parametreler

Mobil faz	%65 ACN - %35 Tampon
Tampon	14.2 g Na_2HPO_4 , 2000 ml suda çözünür, pH'sı konsantre fosforik asit ile 6.6'ya ayarlanır.
pH	6.6
Akış hızı, mL.min⁻¹	1.0
Dalgaboyu, nm	225
Enjeksiyon Hacmi	20 μl
Kolon	Inertsil ODS 3V 4.6 x250mm,5 μ

Çizelge 6.1'de belirtilmiş olan sistem şartlarında 100 mg L⁻¹ tadalafil standardının Thermo HPLC sistemine enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram Şekil 6.1'de görülmektedir.

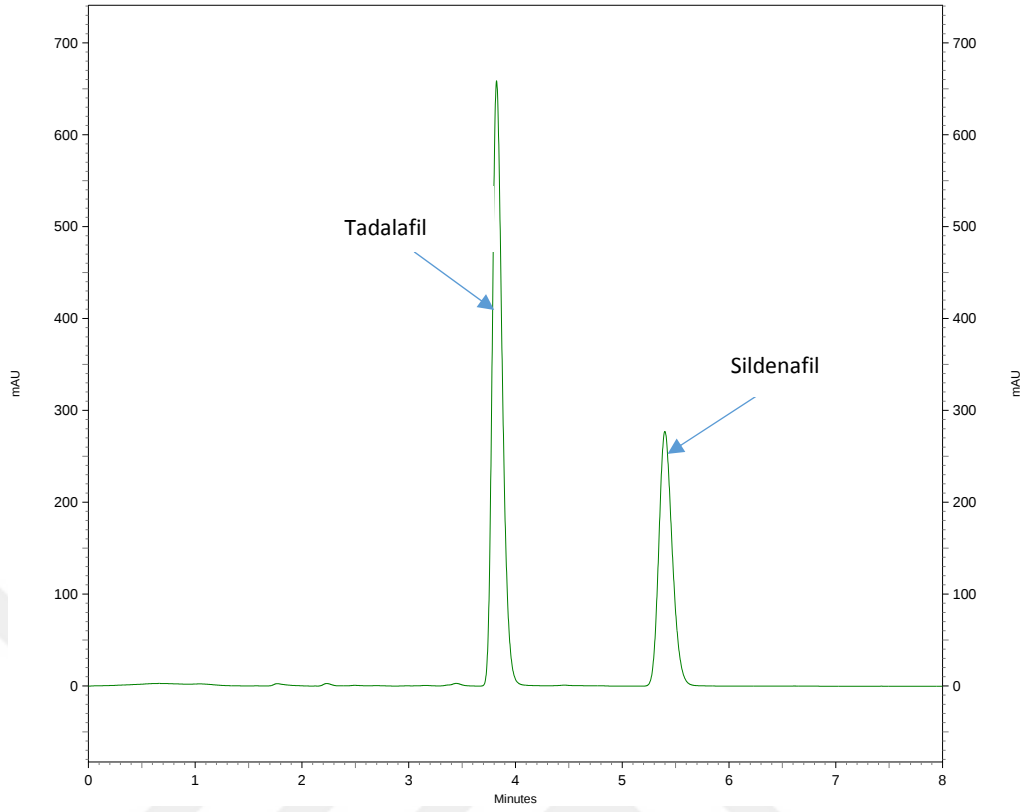


Şekil 6.1 100 mg L⁻¹ tadalafil standardının Thermo HPLC-UV sistemi ile elde edilen kromatogram



Şekil 6.2 100 mg L^{-1} sildenafil sitrat standardının Thermo HPLC-UV ile elde edilen kromatogram.

Aynı şartlar altında 100 mg L^{-1} sildenafil sitrat standardının HPLC sistemine enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram Şekil 6.2’de görülmektedir. Çizelge 6.1’de görülen parametreler kullanılarak 50.0 mg L^{-1} Tadalafıl ve Sildanafıl Sitrat’ın HPLC-UV sistemine enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram Şekil 6.3’te görülmektedir.

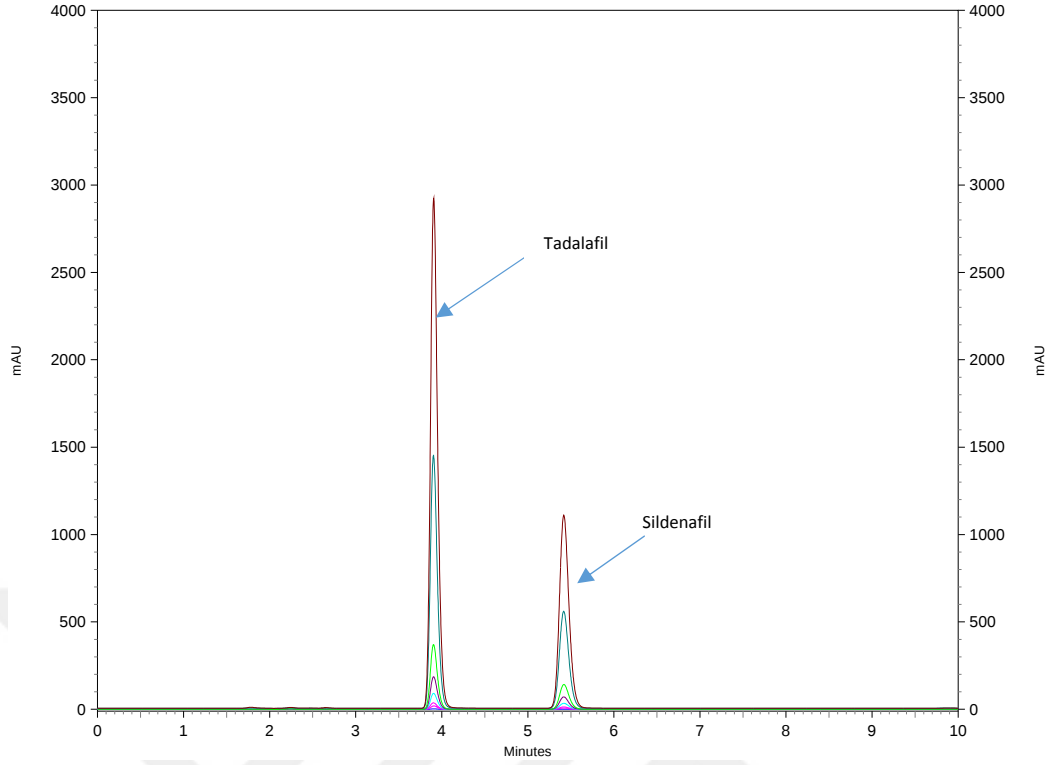


Şekil 6.3 50 mg L⁻¹ tadalafil ve sildenafil sitrat standart karışımlarının Thermo HPLC sisteminde elde edilen kromatogram

Şekil 6.3'te görüldüğü üzere analitlere ait sinyaller birbirlerinden ayrılmış, simetrik sinyaller elde edilmiştir. Sinyallerin üzerinde herhangi bir omuz görülmemiştir. Bu şartlar altında her iki tür için de kalitatif ve kantitatif tayin yapılabileceğine karar verilmiş ve sistem analitik performansının tespitine yönelik çalışmalara geçilmiştir.

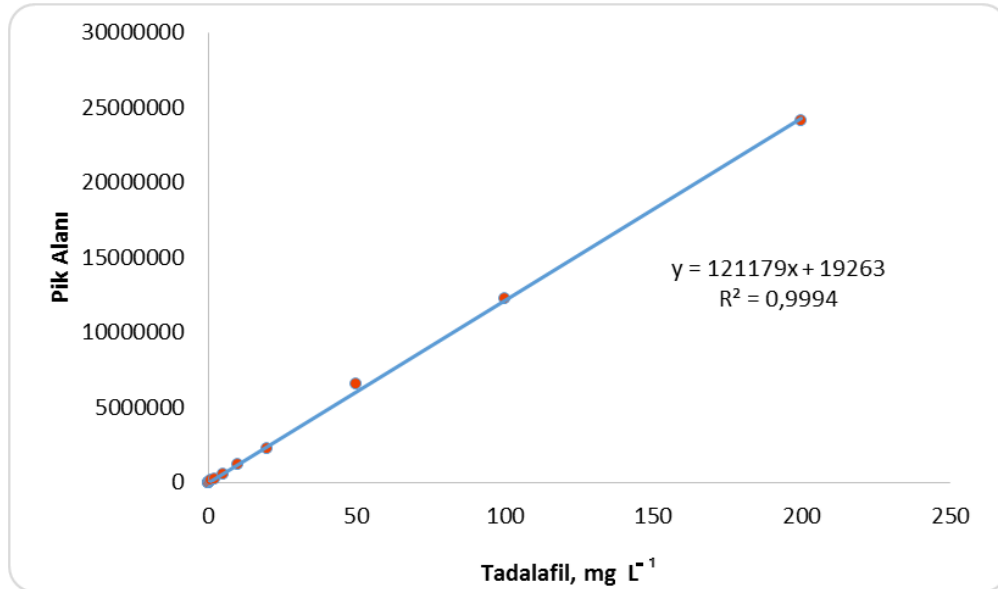
6.4 Sistem Analitik Performansının Tespiti

Sistem performans değerlerinin tespiti amacı ile Çizelge 6.1'de belirtilen şartlar altında 0.05-500 mg L⁻¹ aralığında mix standartlar HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Elde edilen sinyallerden bazıları Şekil 6.4'te görülmektedir.

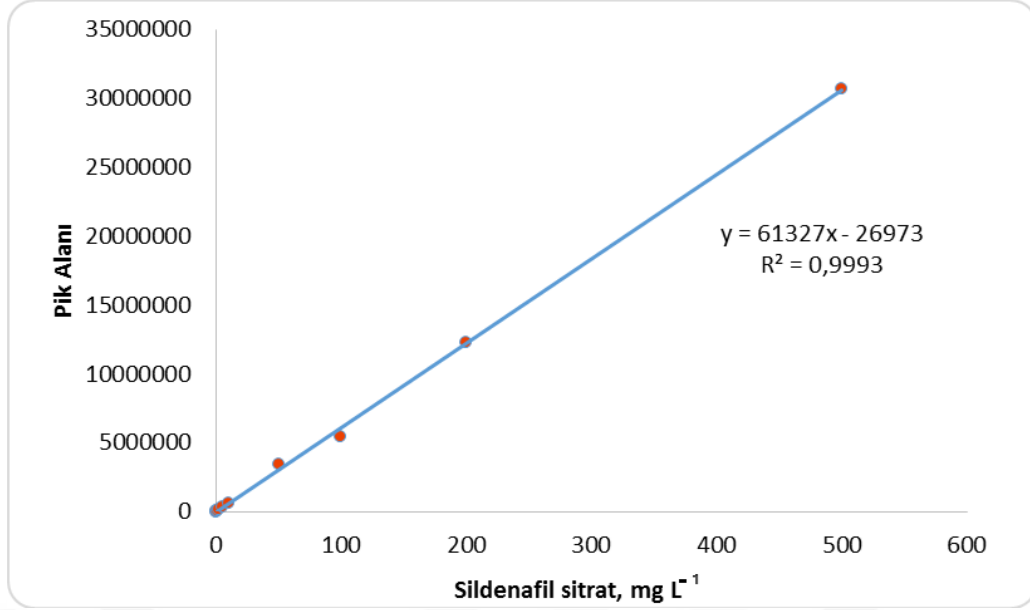


Şekil 6.4 0.10-100 mg L⁻¹ aralığında tadalafil ve sildenafil sitrat standartlarının Thermo HPLC sistemine enjeksiyonu ile elde edilen kromatogramlar.

Şekil 6.4’te görülen kromatogramlarda Tadalafil ve Sildenafil Sitrat’ın pik alanı kullanılarak elde edilen kalibrasyon doğruları Şekil 6.5 ve Şekil 6.6’da görülmektedir.

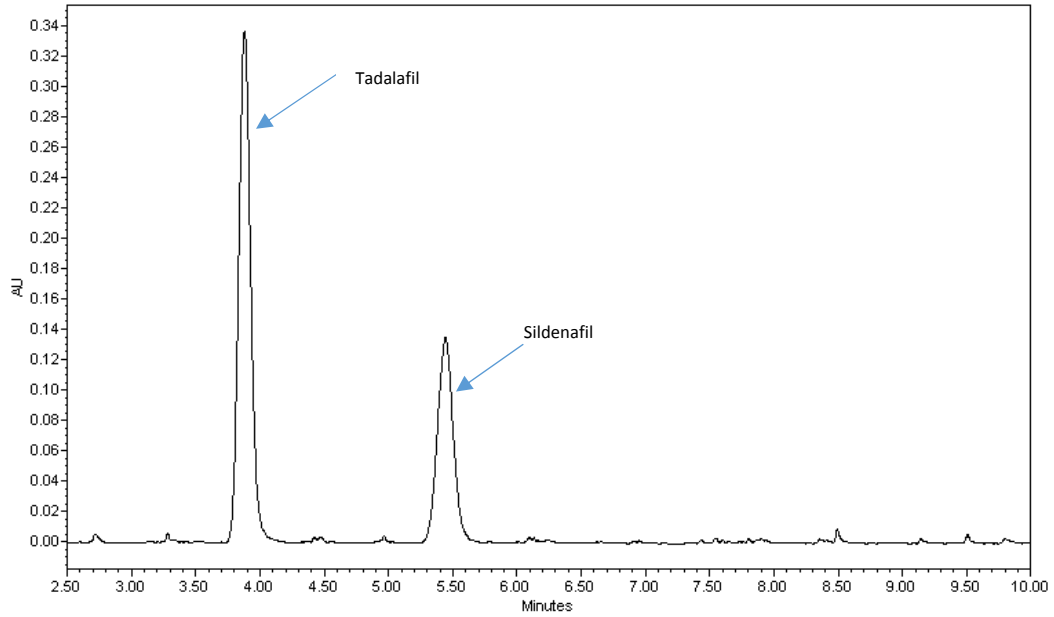


Şekil 6.5 HPLC sisteminde optimum şartlar altında elde edilen tadalafil etken maddesine ait kalibrasyon doğrusu



Şekil 6.6 HPLC sisteminde optimum şartlar altında elde edilen sildenafil sitrat etken maddesine ait kalibrasyon doğrusu

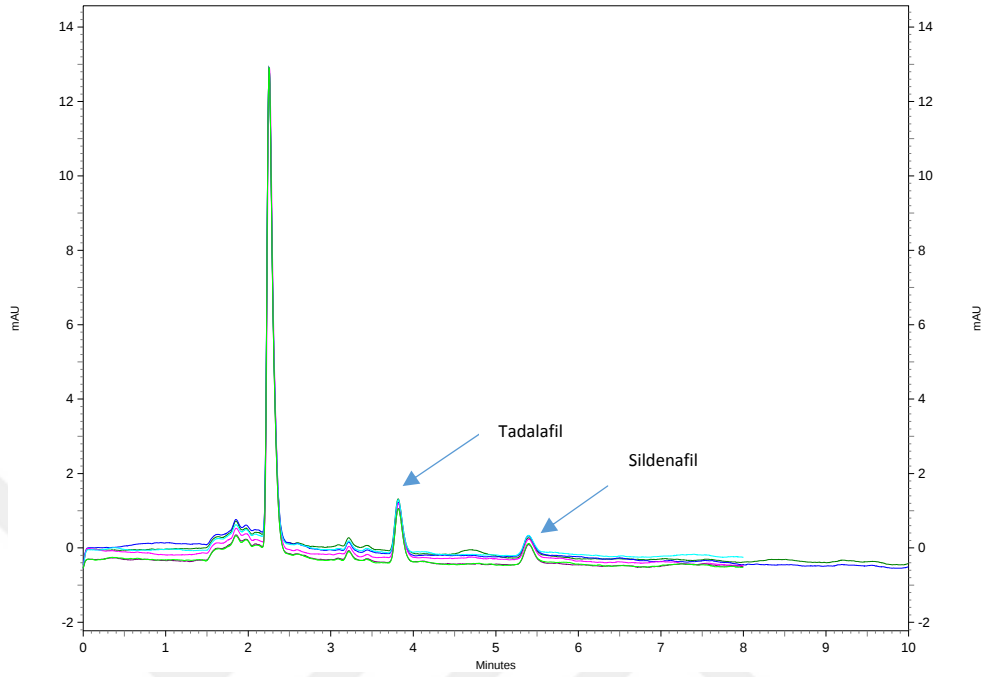
Çizelge 6.1'de belirtilen metot şartlarının Agilent HP-1100 model HPLC sisteminde uygulanması sonucunda Tadalafil ve Sildanafil Sitrat etkenlerinin birbirinden ayrılması ve simetri faktörü Şekil 6.7'de gösterilmiştir.



Şekil 6.7 20 mg L⁻¹ tadalafil ve sildanafil sitrat analitlerinin Agilent HP-1100 sistemine enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram (Resolüsyonu: 8.4, simetri faktörü 1.2 'dir)

Thermo HPLC-UV sisteminin LOD (Limit of Detection) ve LOQ (Limit of quantitation) değerlerinin tespiti amacı ile kalibrasyon grafiğinde kullanılan en düşük

derişim 0.10 mg L^{-1} , sisteme 6 defa gönderilmiş ve aşğıdaki kromatogramlar elde edilmiştir.



Şekil 6.8 LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanması için en düşük derişim 0.10 mg L^{-1} standartların Thermo HPLC-UV sistemine 6 kez gönderilmesiyle elde edilen kromatogramlar

LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanmasında aşğıdaki formüller kullanılmıştır;

$$\text{LOD} = 3 \times \text{Standart sapma} / \text{Eğim}$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \text{Standart sapma} / \text{Eğim}$$

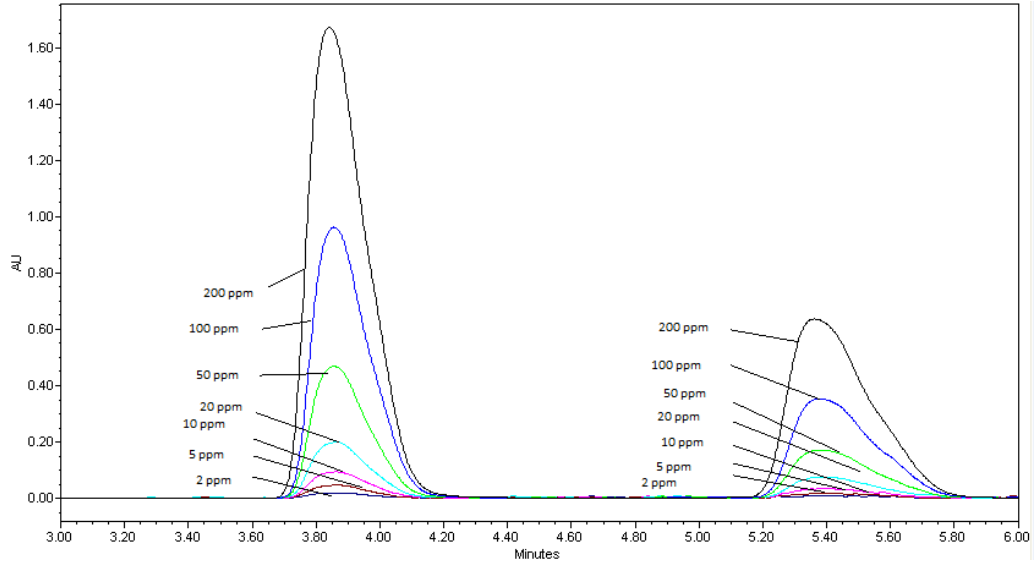
Elde edilen LOD ve LOQ değerlerinin de aralarında olduğu analitler için tespit edilen sistem analitik performans değerler aşğıdaki tabloda görölmektedir.

Çizelge 6.2 Sinyal pik alanları kullanılarak bulunan analitlere ait sistem analitik performans değerleri

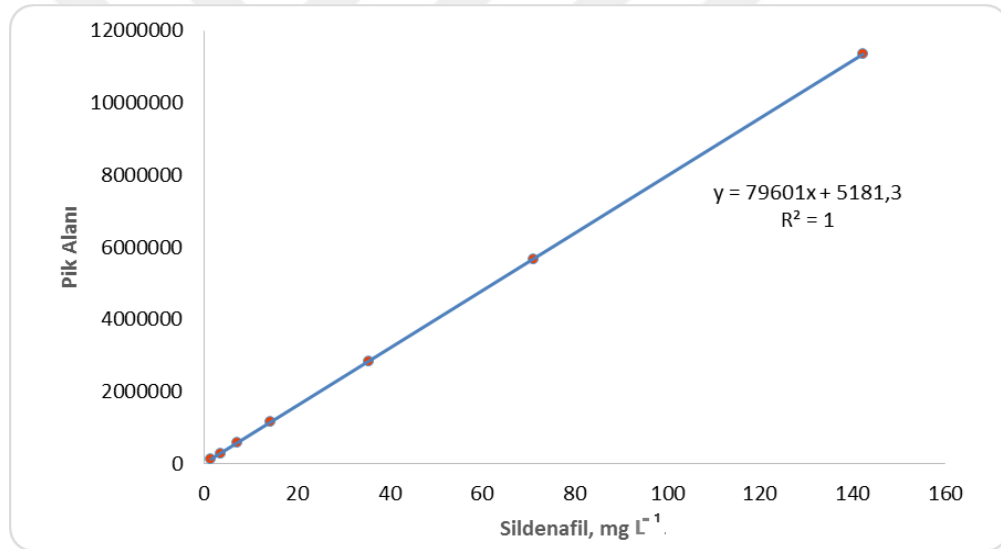
	Tadalafil	Sildenafil Sitrat
LOD, mg/L	0.039	0.028
LOQ, mg/L	0.129	0.092
R²	0.9995	0.9993
y=mx+n	y=121179x+ 19263	y = 61327x -26973

6.5 Farklı Marka Tabletlerde Tadalafil ve Sildenafil Etken Maddelerinin Kantitatif Tayinleri

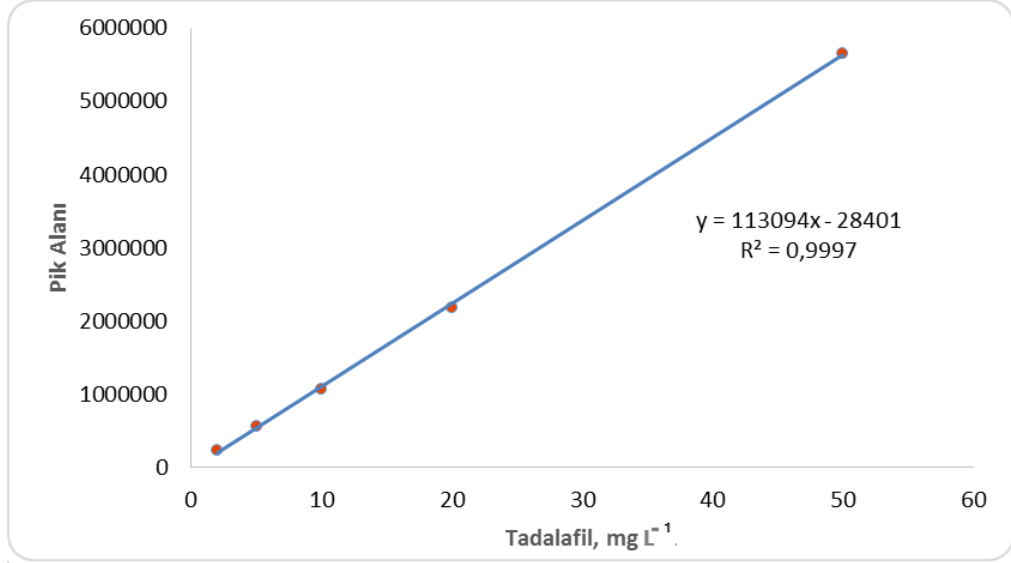
Piyasada bulunan farklı marka ve içerikteki tabletlerde bulunan sildenafil ve tadalafil etken maddelerinin optimizasyonu yapılan Agilent 1100 HPLC sisteminde kantitatif tayinleri tezin bu aşamasında yapılmıştır. Bu amaçla ülkemiz ilaç firmaları tarafından üretilen iki farklı marka tablet ve yurtdışından ülkemize kaçak yollarla sokulan ve İstanbul'da satışa sunulan yedi farklı marka tablet aktif bileşenlerin kalitatif ve kantitatif tayinlerinin yapılması amacı ile analiz edilmiştir. Çalışmanın ilk aşamasında örneklerin çözünürleştirilerek yapıda bulunan aktif bileşenin çözelti ortamına alınması sağlanmıştır. Bu amaçla her markadan rastgele alınan üç tablet ayrı ayrı ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Ekstraksiyon işleminde bir tablet alınıp üzerine 50 mL %65 Asetonitril/%35 pH 6.60 fosfat tamponu ilave edilmiştir. Karışım 10 dakika ultrasonik banyoda oda sıcaklığında tutulduktan sonra 20 dakika mekanik karıştırıcıda çalkalanmıştır. Ekstraksiyon işlemi sonrasında çözelti hacmi ekstraksiyon çözücü karışımı kullanılarak 100 mL'ye tamamlanarak 0.45 mikron teflon filtrede süzülerek berrak çözelti elde edilmiştir. Her marka için farklı seyreltme miktarları çözücü karışımı ile yapılarak numuneler analiz edilmiştir. Numuneler Abdi İbrahim ve YTÜ laboratuvarında bulunan 2 cihazla da analiz edilmiştir. Numunelerin Agilent HPLC analizinde kullanılan sildenafil ve tadalafille ait doğrusal kalibrasyon grafikleri ve kromatogramları Şekil 6.9, Şekil 6.10 ve Şekil 6.11'de görülmektedir.



Şekil 6.9 Çizelge 6.1'de belirtilen şartlar altında HPLC cihazına hazırlanmış olan Sildenafil sitrat ($1.5-140 \text{ mg L}^{-1}$ sildenafil) ve Tadalafil ($2.0-200 \text{ mg L}^{-1}$) standartlarının kromatogramları



Şekil 6.10 $1.5-140 \text{ mg L}^{-1}$ sildenafil standardının Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen doğrusal kalibrasyon grafiği



Şekil 6.11 2.0-50 mg L⁻¹ tadalafil standardının Çizelge 6.1’de görülen şartlar altında HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen doğrusal kalibrasyon grafiği

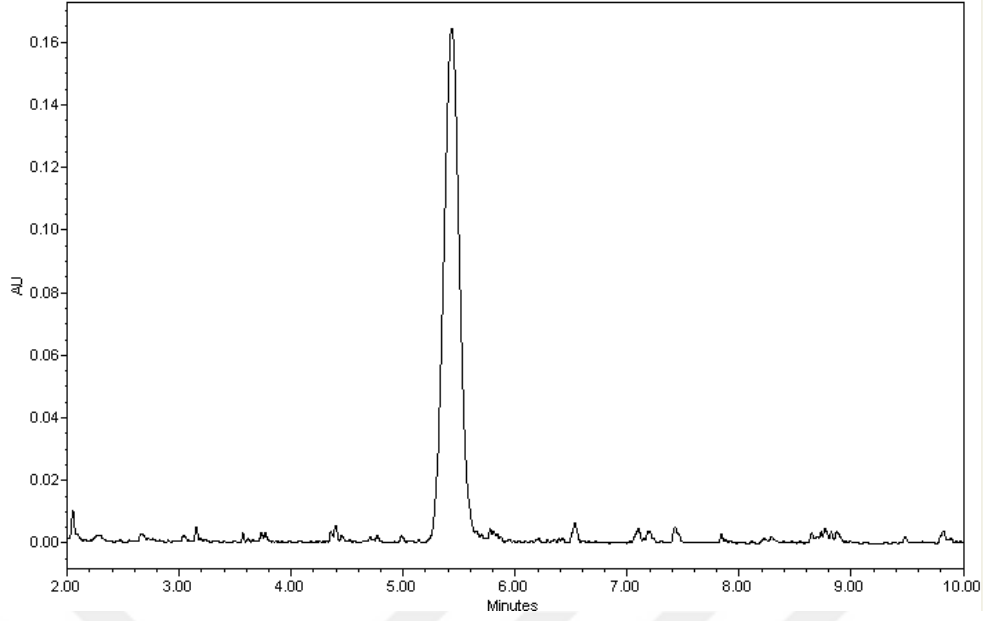
6.5.1 Marka A

Yasal olmayan yollar ile ülkemize sokulan ve farklı isimler altında ülkemizin farklı bölgelerinde piyasaya sürülen markalardan biri olan “Marka A” Tahtakale/İstanbul’ da bulunan seyyar tezgâhlarda satın alınmıştır. Bu ürün, optimum şartlar altında yapısında bulunan etken maddenin tespit edilmesine yönelik analiz edilmiştir. Ürün mavi renkte olup tabletler 0.8523 g ağırlığındadır. Tabletler yapısında 130 mg sildenafil bulunduğ u markanın kutusunda iddia edilmektedir. Ürüne ait fotoğraf Şekil 6.12’de görülmektedir.



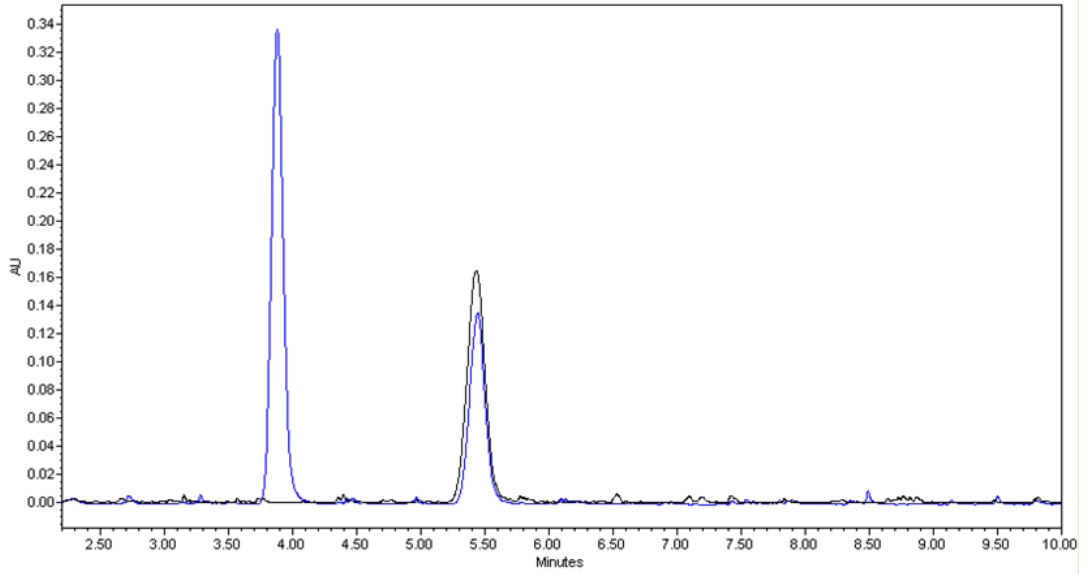
Şekil 6.12 Marka A'ya ait fotoğraf

Marka A’nın Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogram Şekil 6.13’te görülmektedir.



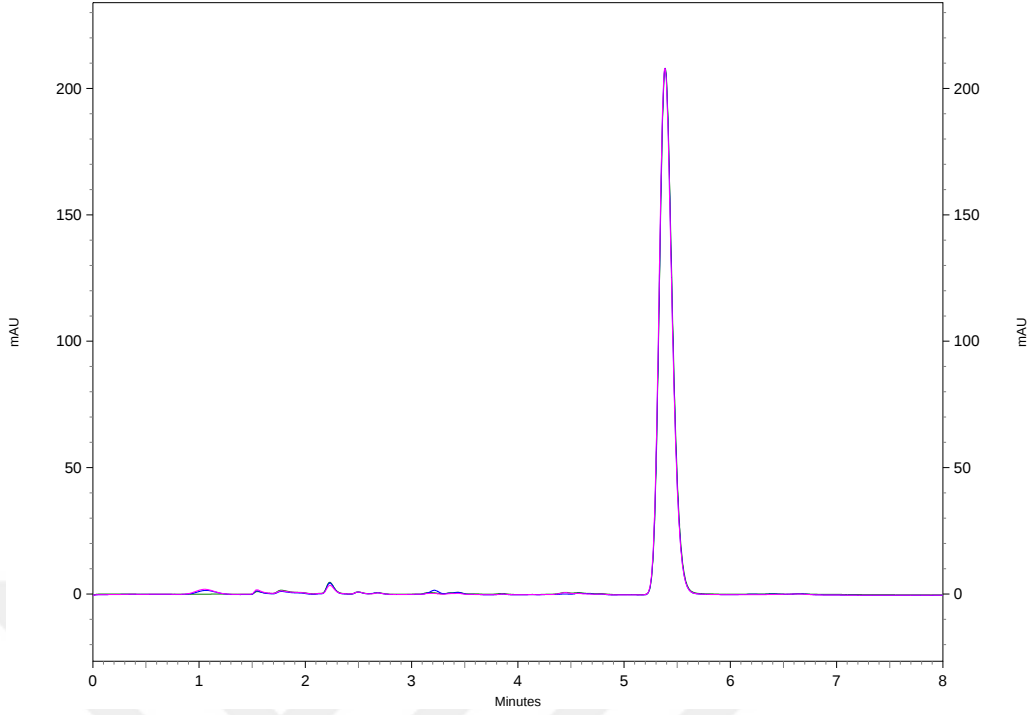
Şekil 6.13 Marka A'nın Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogram.

Marka A ve 20 mg L^{-1} sildenafil sitrat ve tadalafil mix standardına ait kromatogramlar Şekil 6.14'te görülmektedir.



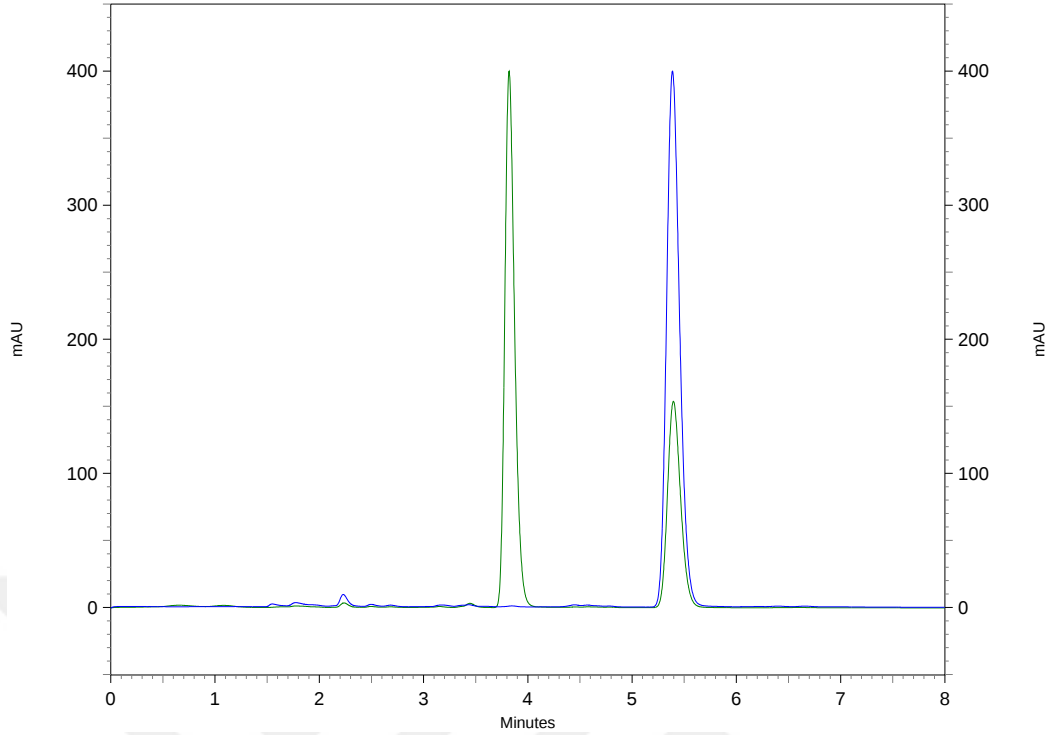
Şekil 6.14 20 mg L^{-1} sildenafil sitrat ve tadalafil standardı ile Marka A'nın Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar

Benzer şekilde Marka A'nın ekstraksiyonu ile elde edilen çözelti Thermo HPLC sistemine gönderilmiş ve Şekil 6.15'teki sinyaller elde edilmiştir.



Şekil 6.15 Marka A'nin Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Thermo HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar (3 paralel)

Şekil 6.15'de görüldüğü üzere üç paralel olarak çalışılan örnekte tüm sinyaller aynı büyüklük ve simetridedir. Ekstraksiyon ve kromatografik tayin sisteminin tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğu görülmektedir. Tablet etken maddesi olan sildenafilin alıkonma süresinde standart çözeltiye göre kayma olup olmadığını göstermek amacı ile standart ile aynı kromatogramda gösterilen Marka A'ya ait sinyal Şekil 6.16'da görülmektedir.



Şekil 6.16 20 mg L⁻¹ sildenafil sitrat ve tadalafil standardı ile Marka A'nın Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Thermo HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar

Marka A da tespit edilen sildenafil sinyalinin alıkonma süresi standart ile aynı olmasına rağmen tam emin olmak için “spiking” deneyi yapılmıştır. Bu amaçla seyreltme yapılmış 0.80 mL Marka A ekstraktine 0.20 mL 100 mg L⁻¹ mix standard ilave edilmiş ve HPLC kromatogramları elde edilmiştir. Marka A'dan elde edilen sinyal sildenafil etken maddesine aittir, analit alıkonma süresinde herhangi bir kayma tespit edilmemiştir. Kromatogramlarda görülen sinyalin pik alanları kullanılarak tabletlerin yapısında bulunan sildenafil miktarı tespit edilmiştir. Kromatogramda sadece standart ile aynı alıkonma süresine sahip sildenafil ile ait sinyal bulunmuştur. Bu markanın optimum şartlarda analizi sonrası Agilent HPLC sisteminde 131.7 ± 4.5 mg (N=3), Thermo HPLC sisteminde 132.9 ± 4.5 mg (N=3) sildenafil bulunmuştur. Ürün kutusunda belirtilen markaya ait tabletlerde 130 mg sildenafil bulunduğu iddia edilmiştir. Görüldüğü üzere her iki analiz sisteminde de tespit edilen miktar ürün kutusunda yazılan değeri doğrular niteliktedir.

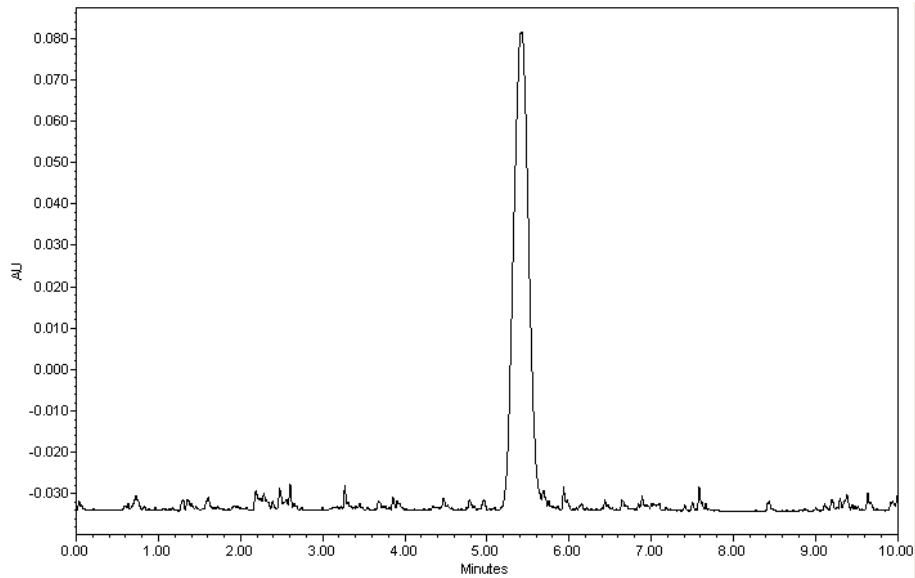
6.5.2 Marka B

Marka A da olduğu gibi bu marka da ülkemize kaçak yollarla sokulmuş ürünlerden olup Tahtakale/İstanbul'dan satın alınmıştır. rn kırmızı renkte olup tabletler 0.6603 g ağırlığındadır. Bu tabletlerin 130 mg sildenafilil içerdiği iddia edilmektedir. rne ait fotoğraf şekil 6.17'de grlmektedir.



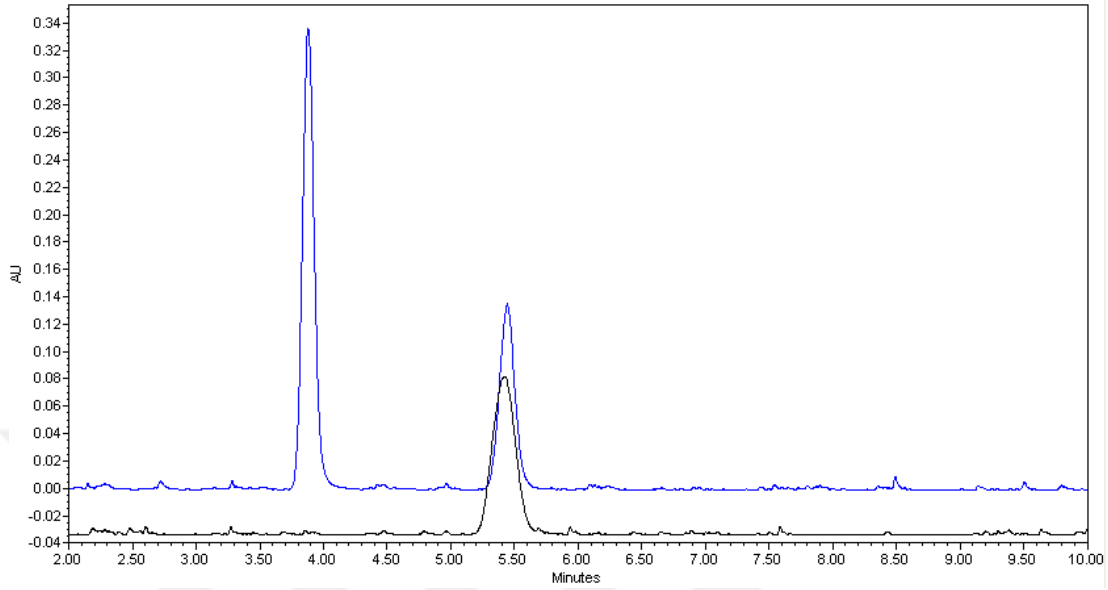
şekil 6.17 Marka B ya ait fotoğraf

Ürünün rnek hazırlama bölümünde belirtilen şartlarda ekstraksiyonu sonrası optimum şartlar altında Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogram şekil 6.18'de grlmektedir.



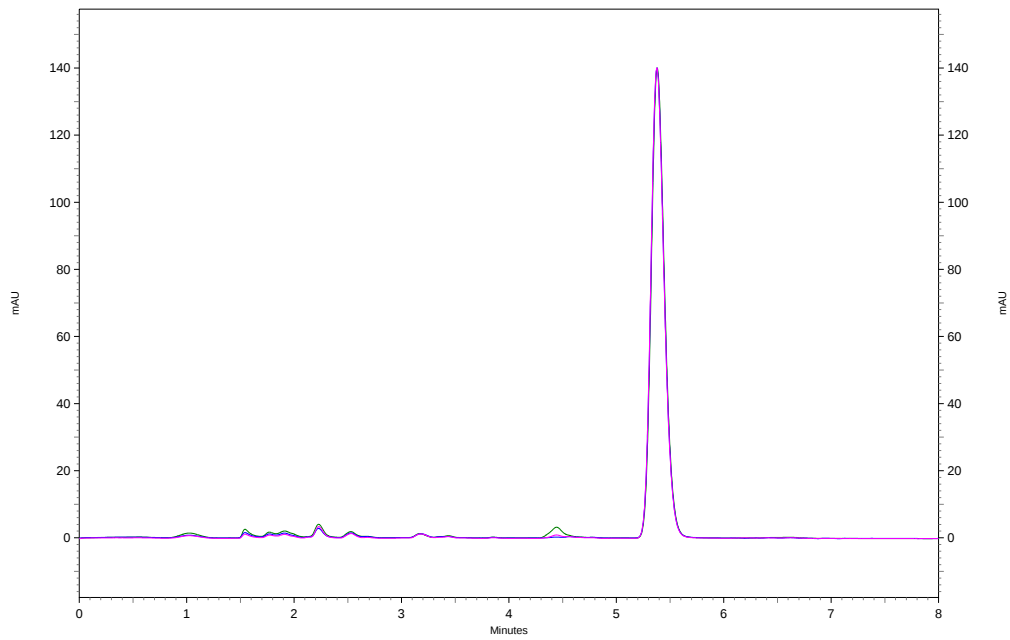
şekil 6.18 Marka B'nin izelge 6.1'de görülen şartlar altında Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogram

20 mg L⁻¹ sildenafil sitrat ve tadalafil içeren standarda ve Marka B'ye ait kromatogramların üst üste konulması ile elde edilen kromatogramlar Şekil 6.19'da görülmektedir.



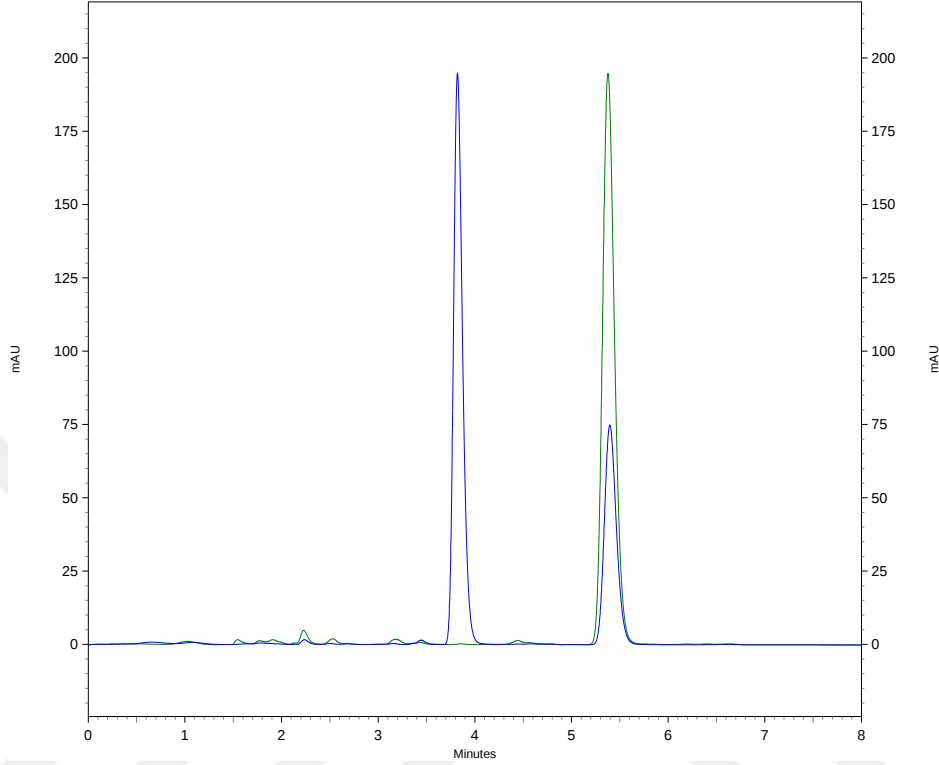
Şekil 6.19 20 mg L⁻¹ sildenafil ve tadalafil standardı ile Marka B'nin Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar

Bu tabletten elde edilen ekstraktın Thermo HPLC sisteminde analiz edilmesi ile elde edilen kromatogram Şekil 6.20'de görülmektedir.



Şekil 6.20 Marka B'nin Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Thermo HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar (3 paralel)

Sildenafil alıkonma süresinde bir kayma olup olmadığını görmek amacı ile örneklerden birinden elde edilen kromatogram ile mix standardın birlikte gösterildiği kromatogramlar Şekil 6.21’de görülmektedir.



Şekil 6.21 20 mg L⁻¹ sildenafil ve tadalafil standardı ile Marka B’nin Çizelge 6.1’de görülen şartlar altında Thermo HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar

Şekil 6.18-21’de görüldüğü gibi ürün kutusunda yazıldığını doğrular şekilde sildenafil ile ait sinyal tespit edilmiştir. Sinyal alıkonma süresinde matrikse bağlı bir kayma gözlenmemiştir. Kromatogramlarda görüldüğü üzere tablette tadalafil etken maddesi bulunmamaktadır. Tadalafille ait alıkonma süresinde analitik bir sinyal görülmemiştir. Pik simetriktir. Sinyallerde açıkça görüldüğü gibi Marka B’den elde edilen sinyal sildenafil etken maddesine aittir. Marka B’de bulunan sildenafil etken madde miktarı doğrusal kalibrasyon yöntemi ile tespit edilmiş olup tablette Agilent HPLC sisteminde 122.4 ± 0.8 mg (N=3), Thermo HPLC sisteminde 111.2 ± 11.6 mg (N=3) sildenafil bulunmuştur. Görüldüğü üzere Agilent sisteminde elde edilen standart sapma değeri Thermo HPLC sistemine göre daha küçüktür. Bu değerlerden hareketle bu markaya ait tabletlerde iddia edilen 130 mg’dan daha düşük sildenafil olduğuna karar verilmiştir.

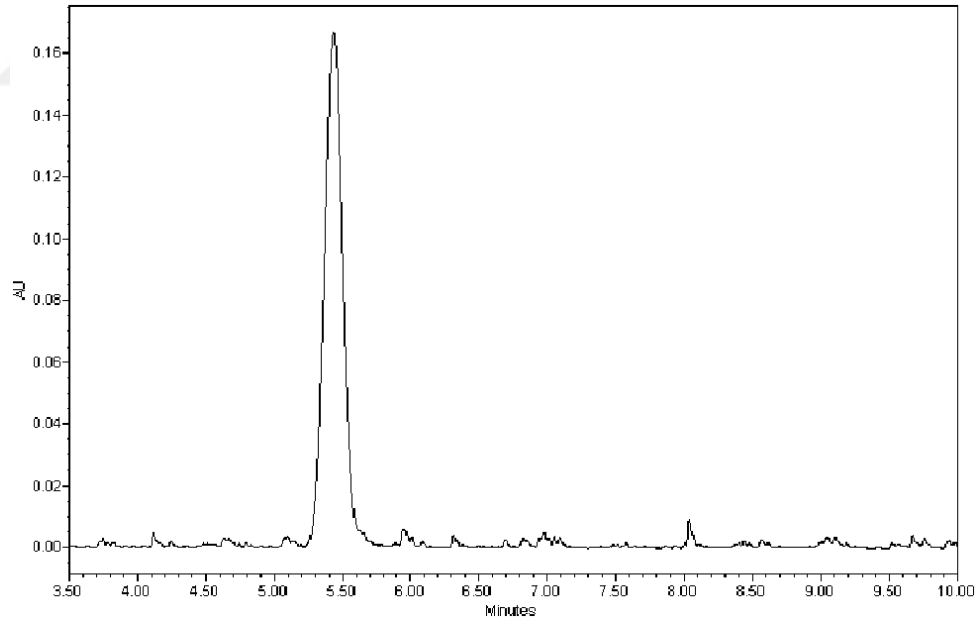
6.5.3 Marka C

Marka C mavi renkte olup tabletler 0.3830 g ağırlığındadır. Ürünün kutusunda tabletlerin içeriğinde 130 mg sildenafil olduğu iddia edilmektedir. Ürüne ait fotoğraf Şekil 6.22’de görülmektedir.



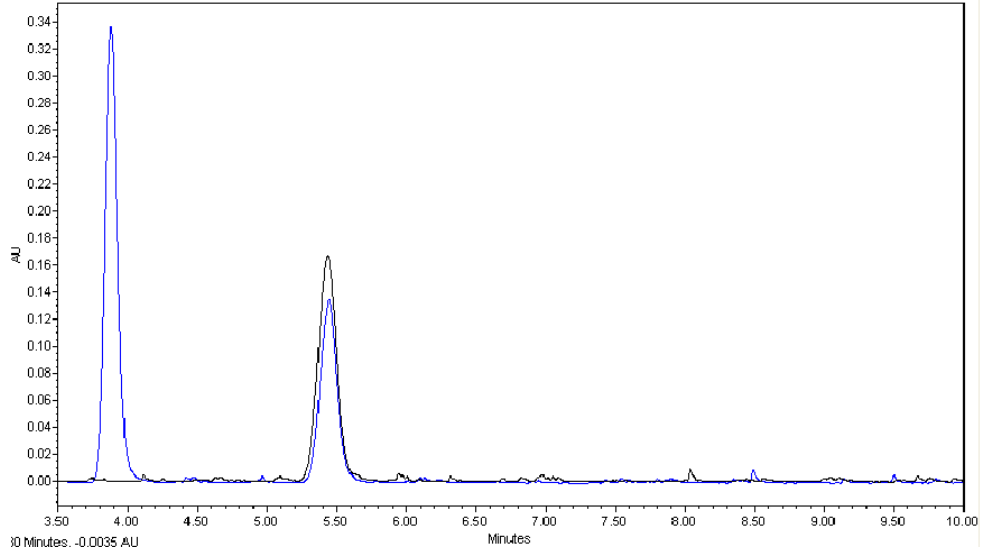
Şekil 6.22 Marka C ye ait fotoğraf

Ürünün yukarıda belirtilen şartlar altında ekstraksiyonu sonrası Agilent HPLC sisteminde elde edilen kromatogramı Şekil 6.23’te görülmektedir.



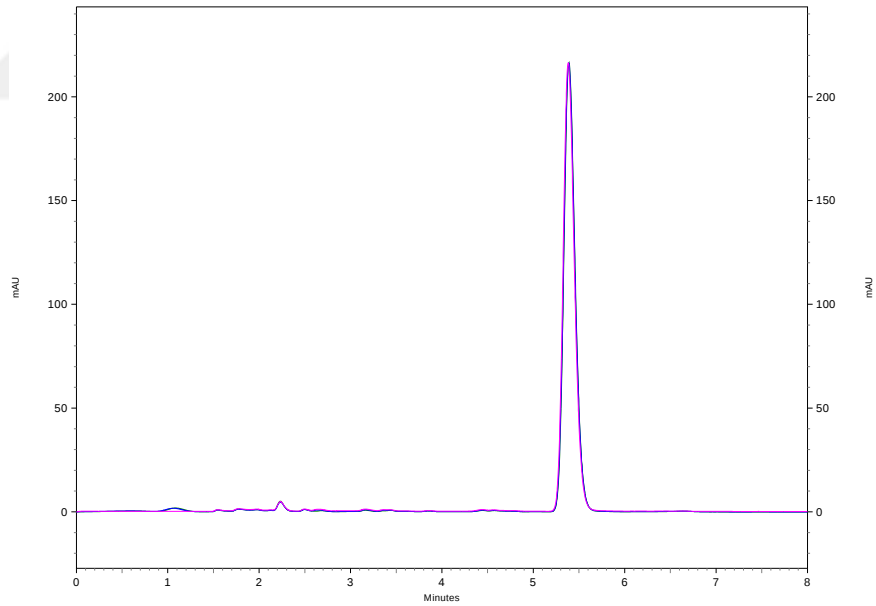
Şekil 6.23 Marka C’nin Çizelge 6.1’de görülen şartlar altında Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogram

20 mg L⁻¹ sildenafil sitrat ve tadalafil standardı ile Marka C’ye ait kromatogramlar Şekil 6.24’te görülmektedir.



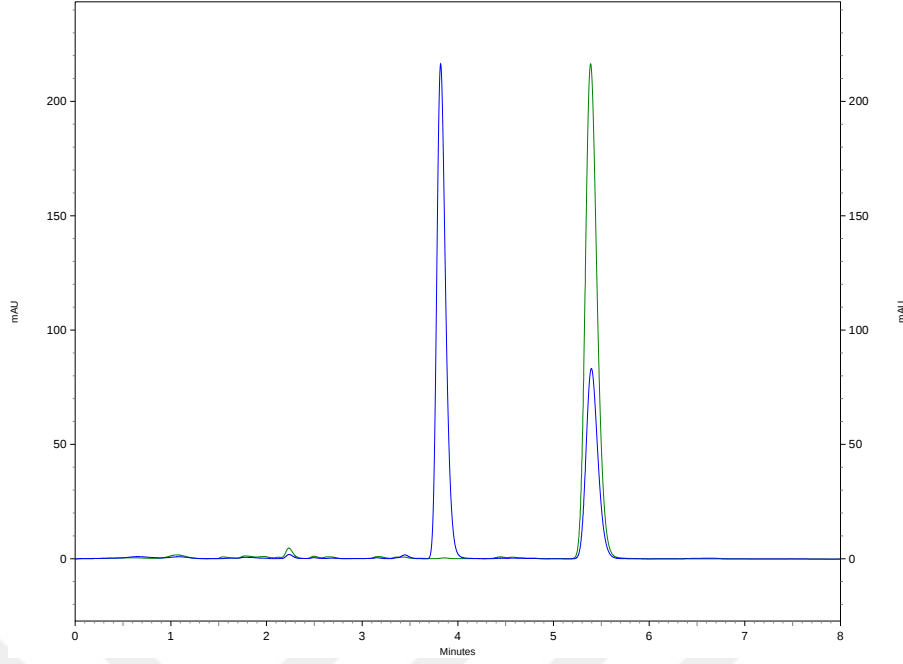
Şekil 6.24 20 mg L⁻¹ sildenafil ve tadalafil standardı ile Marka C'nin Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar

Benzer şekilde bu numuneye ait ekstraksiyon çözeltileri Thermo HPLC sisteminde analiz edilmiş ve Şekil 6.25'te görülen kromatogramlar elde edilmiştir.



Şekil 6.25 Marka C'nin Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Thermo HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar (3 paralel örnek)

Mix sildenafil sitrat ve tadalafil standardı ile Marka C'ye ait kromatogramlar Şekil 6.26'da görülmektedir.



Şekil 6.26 Mix sildenafil ve tadalafil standardı ile Marka C'nin Çizelge 6.1' de görülen şartlar altında Thermo HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar.

Yukarıdaki kromatogramlarda da görüldüğü gibi ürün kutusunda yazıldığını doğrular şekilde sildenafille ait sinyal tespit edilmiştir ve tablette tadalafil etken maddesi bulunmamaktadır. Sinyalin alıkonma süresinde herhangi bir kayma tespit edilmemiştir.

Pik alanları kullanılarak Marka C'nin her tabletinde bulunan sildenafil miktarı doğrusal kalibrasyon grafiği kullanılarak hesaplanmıştır. Marka C'ye ait tablette Agilent HPLC sisteminde sildenafil miktarı 128.2 ± 2.8 mg (N=3), Thermo HPLC sisteminde 133.0 ± 0.1 mg (N=3) bulunmuştur. Görüldüğü gibi Marka C'nin kutusunda her tablette 130 mg sildenafil bulunduğu iddiası yapılan analizler ile doğrulanmıştır. Her iki HPLC sisteminde de benzer sonuçlar elde edilmiştir.

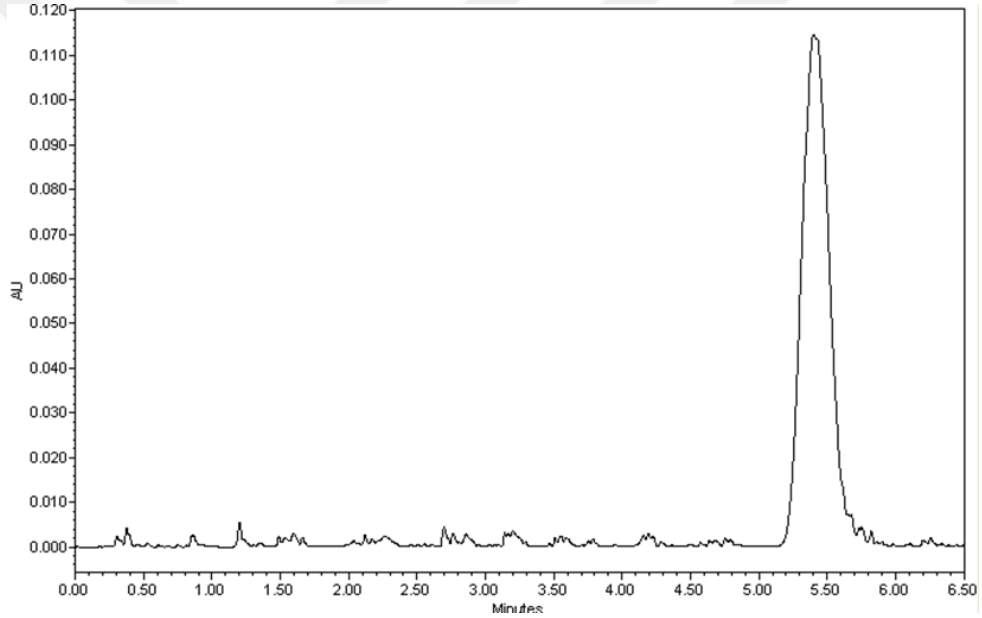
6.5.4 Marka D

Ülkemize kaçak yollarla sokulan ürünlerden biri olan bu marka diğer ürünlerde olduğu gibi Tahtakale/İstanbul'da seyyar satıcılardan satın alınmıştır. Tabletler mavi renkte olup 0.2483 g ağırlığındadır. Ürünün kutusunda her tablet içeriğinde 50 mg sildenafil olduğu iddia edilmektedir. Ürüne ait fotoğraf Şekil 6.27'de görülmektedir.



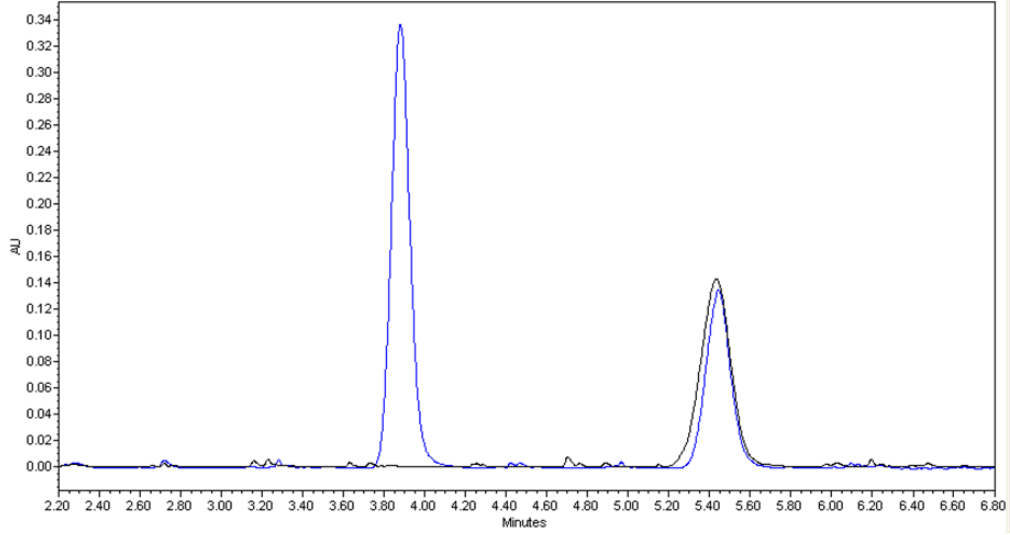
Şekil 6.27 Marka D' ye ait fotoğraf

Belirtilen markaya ait tabletlerden 3 tanesine optimum şartlarda ekstraksiyon/analiz prosedürü uygulanmış ve yapılarında bulunan etken maddenin kalitatif/kantitatif tayinleri yapılmıştır. Üründen elde edilen kromatogram Şekil 6.28’de görülmektedir.



Şekil 6.28 Marka D’nin Çizelge 6.1’de görülen şartlar altında Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogram

20 mg L⁻¹ sildenafil sitrat ve tadalafil içeren standardın Agilent HPLC sisteminde elde edilen kromatogramı ile Marka D’ye ait kromatogramlar Şekil 6.29’da görülmektedir.



Şekil 6.29 20 mg L⁻¹ sildenafil sitrat ve tadalafil standardı ile Marka D'nin Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar

Şekil 6.29'da görüldüğü üzere belirtilen markanın yapısında sildenafil etken maddesi tespit edilmiştir. Pik simetriktir ve sinyalin alıkonma süresinde herhangi bir kayma tespit edilmemiştir. Tadalafile ait alıkonma süresinde herhangi bir sinyal tespit edilmemiştir. Tabletlerin yapısında bulunan sildenafil miktarı 48.4 ± 0.5 mg (N=3) bulunmuştur. Tespit edilen bu değer kutu üzerinde yazan değer olan 50 mg sildenafil değerini doğrular niteliktedir.

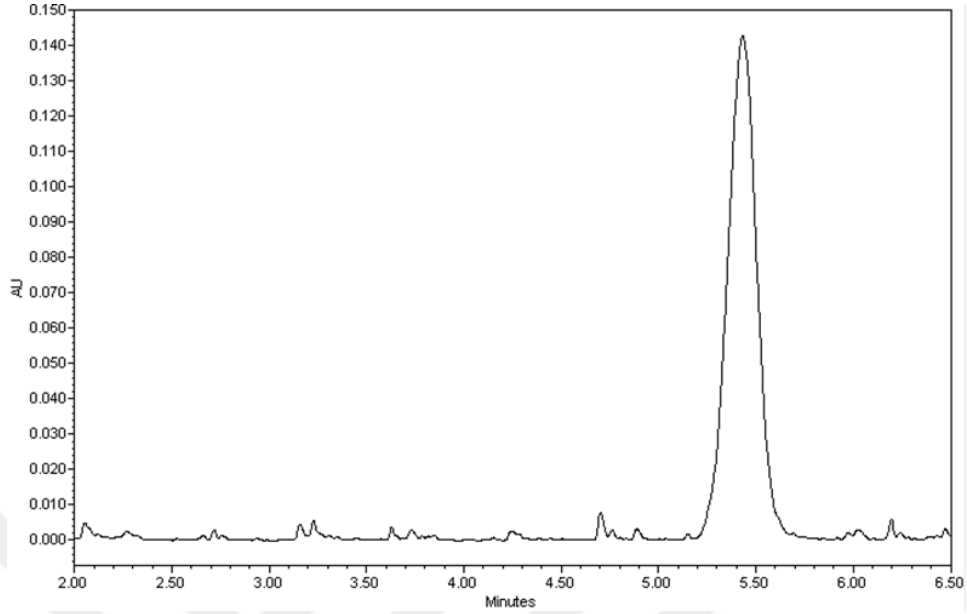
6.5.5 Marka E

Bu marka da diğerlerinde olduğu gibi ülkemize kaçak yollarla sokulmuş olup Tahtakale/İstanbul'da seyyar satıcılardan ücret karşılığı temin edilmiştir. Tabletler mavi renkte olup 0.5523 g ağırlığındadır. Ürünün kutusunda tabletlerin içeriğinde hakkında herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Ürüne ait fotoğraf Şekil 6.30'da görülmektedir.



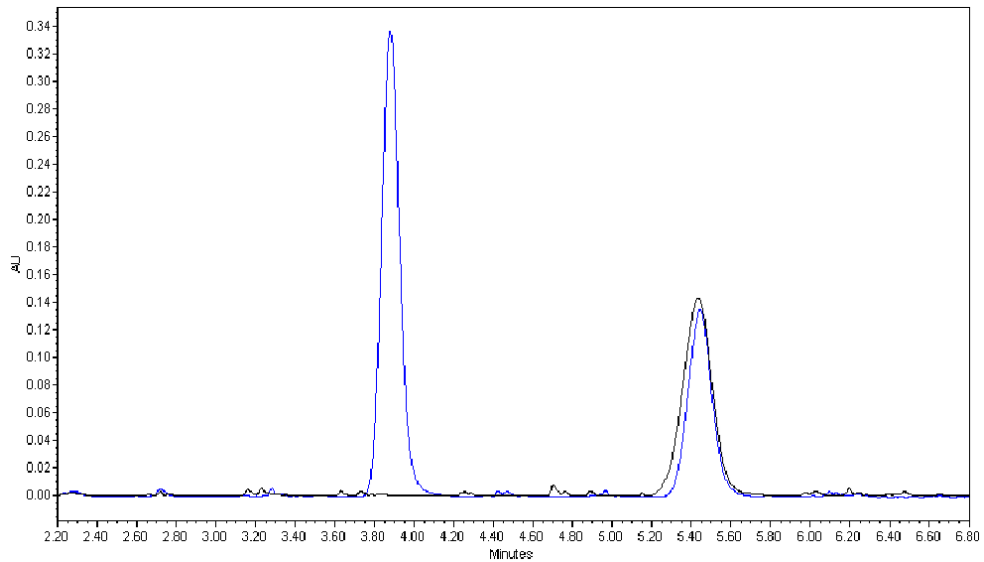
Şekil 6.30 Marka E'ye ait fotoğraf

Ürünün optimum şartlar altında ekstraksiyonu sonrası Agilent HPLC sisteminde elde edilen kromatogramı Şekil 6.31’de görülmektedir.



Şekil 6.31 Marka E’nin Çizelge 6.1’de görülen şartlar altında Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogram

20 mg L⁻¹ sildenafil sitrat ve tadalafil standardı ile Marka E’ye ait kromatogramlar Şekil 6.32’de görülmektedir.



Şekil 6.32 20 mg L⁻¹ sildenafil sitrat ve tadalafil standardı ile Marka E’nin Çizelge 6.1’de görülen şartlar altında Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar

Kromatogramda görüldüğü üzere tabletlerde sildenafil etken maddesi tespit edilmiş olup tadalafil etken maddesi bulunmamaktadır. Pikler simetrik olup sinyalin alıkonma

süresinde herhangi bir kayma tespit edilmemiştir. Pik alanları kullanılarak Marka E'ya ait tabletlerde bulunan sildenafil miktarları doğrusal kalibrasyon grafiği kullanılarak hesaplanmıştır. Marka E'ya ait her tablette sildenafil miktarı 131.4 ± 14.1 mg (N=3) bulunmuştur. Belirtilen markanın kurusunda etken madde miktarı ile ilgili bir bilgi bulunmadığından tespit edilen sonuçlar ile bir karşılaştırma yapılamamıştır.

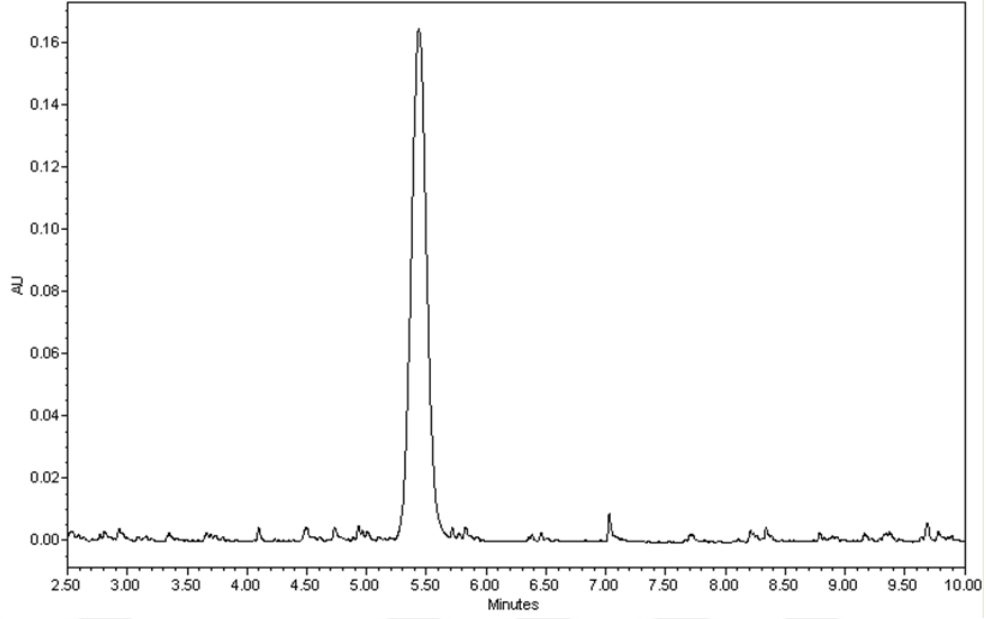
6.5.6 Marka F

Tahtakaleden temin edilen bu üründe bulunan tabletlerin rengi mavi renkte olup tabletler 0.6715 g ağırlığındadır. Ürünün kutusunda içeriğinde etken madde olarak sildenafil bulunduğu ve miktarının 130 mg olduğu iddia edilmektedir. Ürüne ait fotoğraf Şekil 6.33'te görülmektedir.



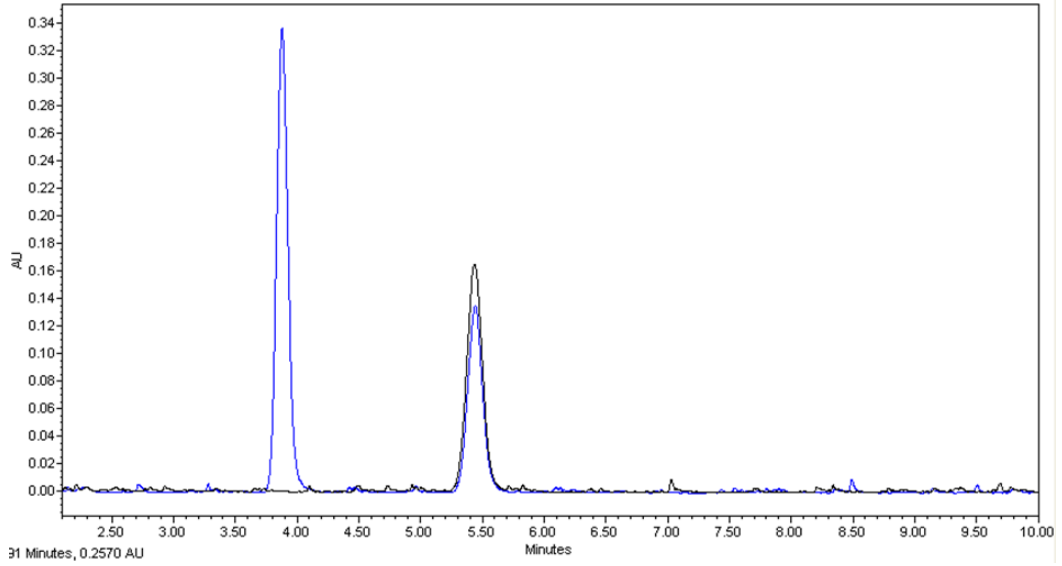
Şekil 6.33 Marka F' ye ait fotoğraf

Marka F tabletlerinin ekstraksiyonu sonrası Agilent HPLC sistemine enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram Şekil 6.34'te görülmektedir.



Şekil 6.34 Marka F'nin Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogram

Sildenafil ile ait sinyalin alıkonma süresinde bir kaymanın olup olmadığının tespiti için 20 mg L^{-1} sildenafil sitrat ve tadalafil standardı ile Marka F'ye ait kromatogramlar üst üste çakıştırılmıştır (Şekil 6.35).



Şekil 6.35 20 mg L^{-1} sildenafil sitrat ve tadalafil standardı ile Marka F'nin Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar

Şekil 6.35'te görüldüğü gibi alıkonma süresinde bir kayma yoktur ve pik simetriktr. Ürün kutusunda yazılan türü doğrular şekilde sildenafil tespit edilmiştir. Pik alanları esas alınarak Marka F'ye ait her tablette sildenafil miktarı $122.3 \pm 1.8 \text{ mg}$ ($N=3$)

bulunmuştur. Görüldüğü gibi Marka F'nin kutusunda her tablette 130 mg sildenafil bulunduğ u iddia edilse de belirtilen değ erden yaklaşık 8 mg eksik miktarda sildenafil etken maddesi tespit edilmiştir.

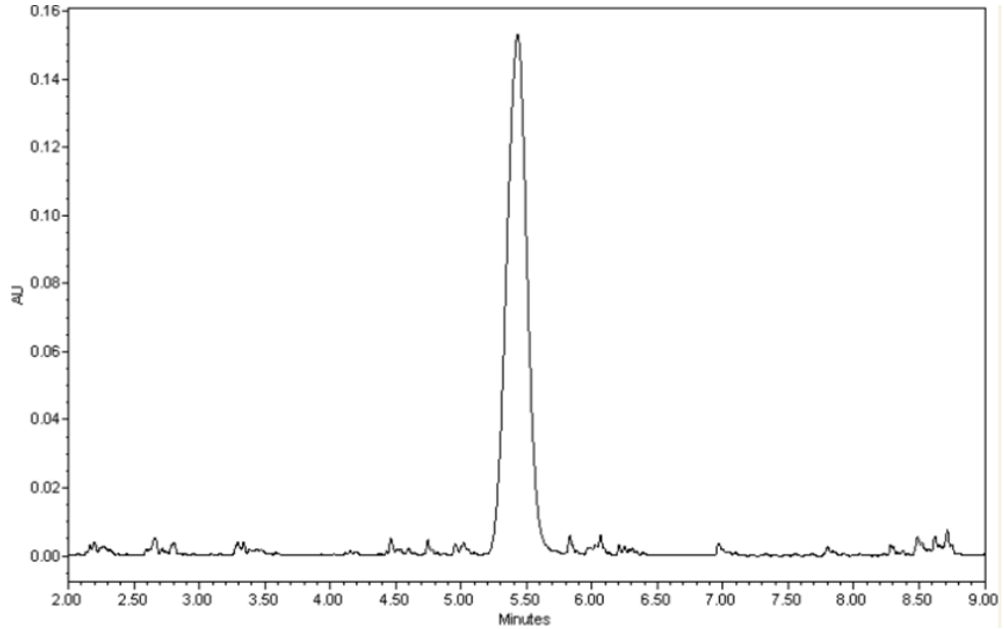
6.5.7 Marka G

Marka G ürünü ülkemizde jenerik ilaç üretimi yapan ilaç firmaların birine aittir. Ürün sarı renkte olup tabletler 0.3673 g ağırlığındadır. Tabletlerin içeriğinde 50 mg sildanafil olduğ u ürün kutusunda iddia edilmektedir. Ürüne ait fotoğraf Şekil 6.36'da görölmektedir.



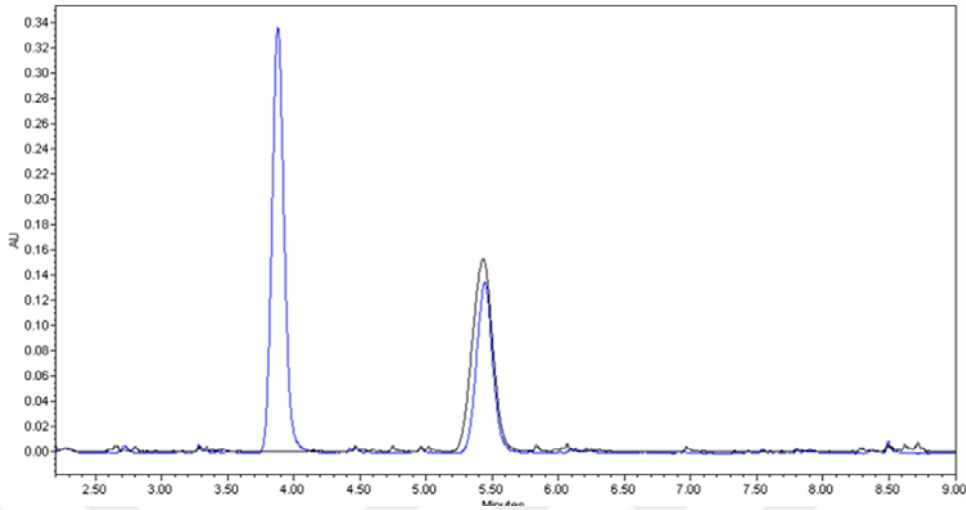
Şekil 6.36 Marka G' ye ait fotoğraf

Ürünün ekstraksiyonu sonrasında optimum şartlarda HPLC sisteminde elde edilen kromatogramı Şekil 6.37'de görölmektedir.



Şekil 6.37 Marka G'nin Çizelge 6.1'de görölen optimum şartlarda Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogram

20 mg L⁻¹ sildenafil sitrat ve tadalafil standardı ile Marka G'ye ait kromatogramlar üst üste çakıştırılmıştır ve alıkonma zamanlarında herhangi bir kayma saptanmamıştır.



Şekil 6.38 20 mg L⁻¹ sildenafil sitrat ve tadalafil standardı ile Marka G'nin Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar

Şekil 6.38'de görüldüğü gibi 20 mg L⁻¹ mix standart ile marka G'nin alıkonma süresinde bir kayma yoktur ve pik simetriktir. Ürün kutusunda yazıldığı gibi sildenafil tespit edilmiştir. Pik alanları esas alınarak Marka G'ye ait her tablette sildenafil miktarı 51.6 ± 0.36 mg (N=3) bulunmuştur. Görüldüğü gibi Marka G'nin kutusunda her tablette 50 mg sildenafil bulunduğu iddia edilse de belirtilen değerden yaklaşık %3 fazla miktarda sildenafil etken maddesi tespit edilmiştir.

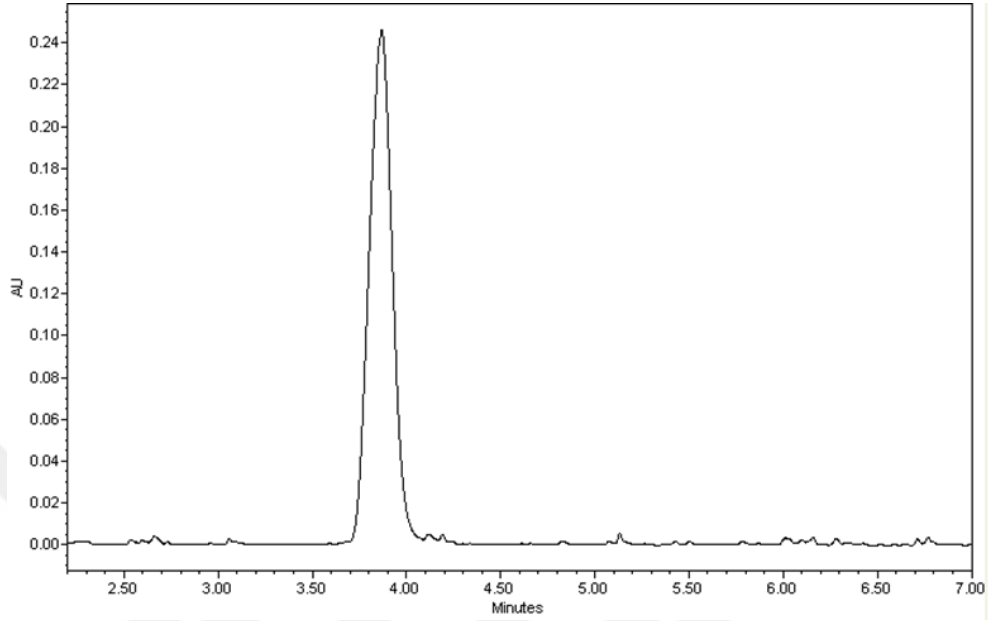
6.5.8 Marka H

Marka H ürünü satış ruhsatına sahip olduğu bilinen ilaç firmaların birine aittir. Ürün sarı renkte olup tabletler 0.4291 g ağırlığındadır. Tabletlerin içeriğinde 20 mg tadalafil olduğu ürün kutusunda iddia edilmektedir. Ürüne ait fotoğraf Şekil 6.39'da görülmektedir.

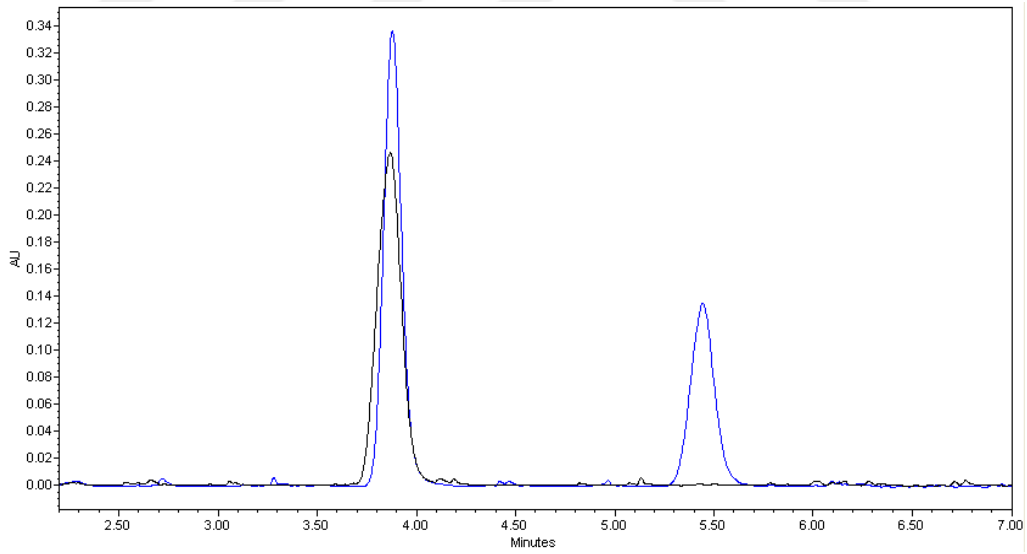


Şekil 6.39 Marka H' ye ait fotoğraf

Tabletlerin ekstraksiyonu sonrası Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogram Şekil 6.40'ta, mix standart ile Marka H nin kromatogramları ise Şekil 6.41'de görülmektedir.

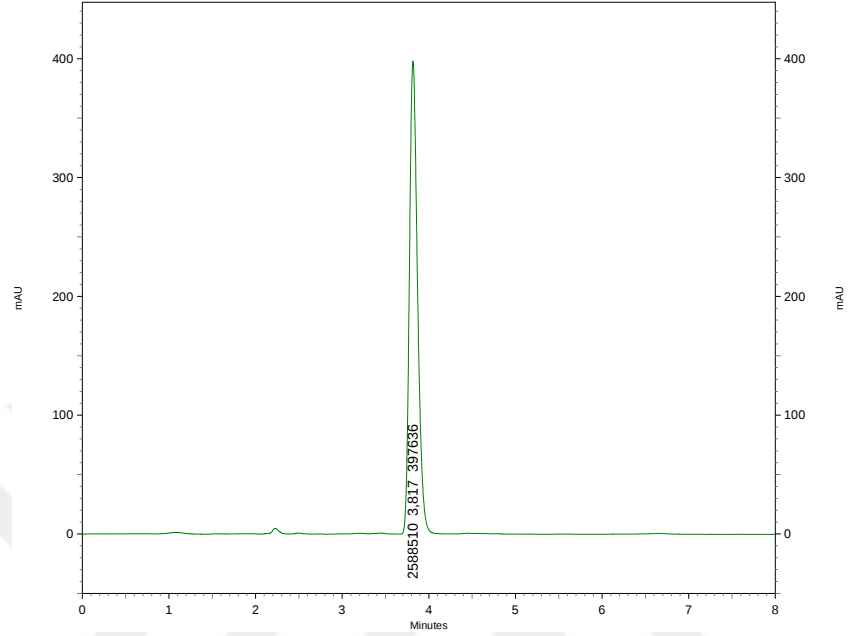


Şekil 6.40 Marka H'nin Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogram

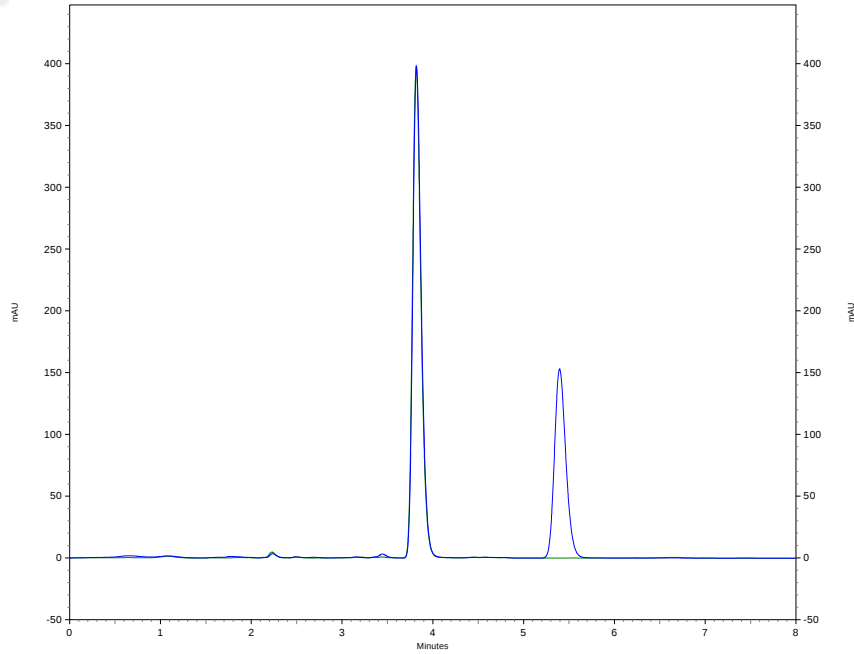


Şekil 6.41 20 mg L⁻¹ sildenafil sitrat ve tadalafil standardı ile Marka H'nin Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar

Marka H'den elde edilen çözeltinin Thermo HPLC sistemine optimum şartlarda gönderilmesi ile elde edilen kromatogram Şekil 6.42'de, aynı numunenin mix standart ile aynı kromatogramda gösterildiği grafik de Şekil 43'te görülmektedir.

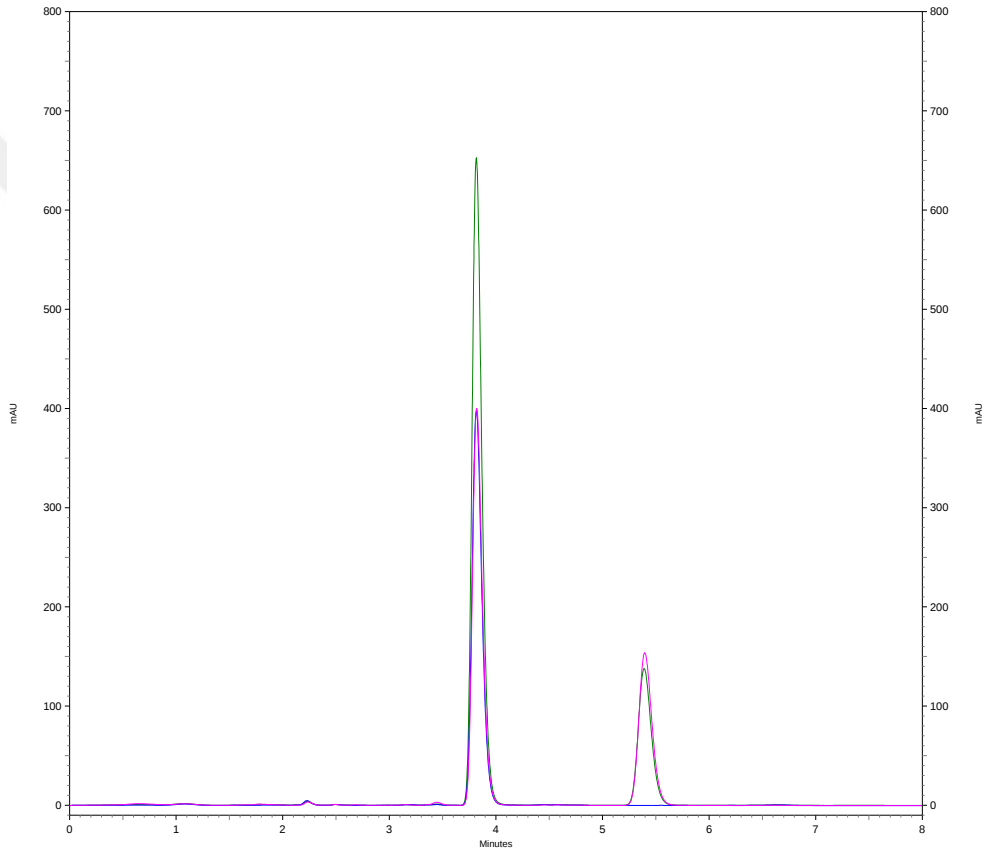


Şekil 6.42 Marka H'nin Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Thermo HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogram



Şekil 6.43 20 mg L⁻¹ sildenafil sitrat ve tadalafil standardı ile Marka H'nin Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Thermo HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar

Şekil 6.40-6.43'te görüldüğü gibi ürün kutusunda yazıldığını doğrular şekilde tadalafil ait sinyal tespit edilmiştir. Tadalafile ait sinyalin alıkonma süresinde herhangi bir kayma tespit edilmemiş olup pik simetriktir. Kromatogramlarda görüldüğü üzere sildenafilin alıkonma süresinde bir sinyal tespit edilmemiş olup tabletlerde sildenafil etken maddesi bulunmamıştır. Örnek matriksinin tadalafil sinyali üzerine bir etkisinin olup olmadığını tespit etmek amacı ile numune ekstraktine enjeksiyon öncesi mix standart spike edilmiştir. Bu amaçla 0.80 mL ekstrakt üzerine 0.20 mL 100 mg L⁻¹ mix standart spike edilmiştir. Kromatogramlar Şekil 6.44'te görülmektedir.



Şekil 6.44 0.8 mL Marka H ekstraktine 0.2 mL 100 mg L⁻¹ mix standart ilave sonrası Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Thermo HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar (Mavi: Marka H, Pembe: 20.0 mg L⁻¹ mix standart, Yeşil: 0.80 mL numune + 0.20 mL 100 mg L⁻¹ mix standart)

Şekil 6.44'te görüldüğü üzere matriksin analit sinyali üzerine bir etkisi bulunmamaktadır. Tadalafile ait sinyalin alıkonma süresinde herhangi bir kayma gözlenmemiştir.

Pik alanları kullanılarak Marka H'nin tabletinde bulunan tadalafil miktarı doğrusal kalibrasyon grafiği kullanılarak hesaplanmıştır. Marka H'ye ait her tablette tadalafil miktarı Agilent HPLC sisteminde 20.2 ± 0.5 mg (N=3), Thermo HPLC sisteminde 21.1 ± 1.0 mg (N=3) bulunmuştur. Ürün kutusunda yazılan değer 20 mg olduğundan, bulunan sonuçlar iddia edilen değeri doğrulayıcı niteliktedir.

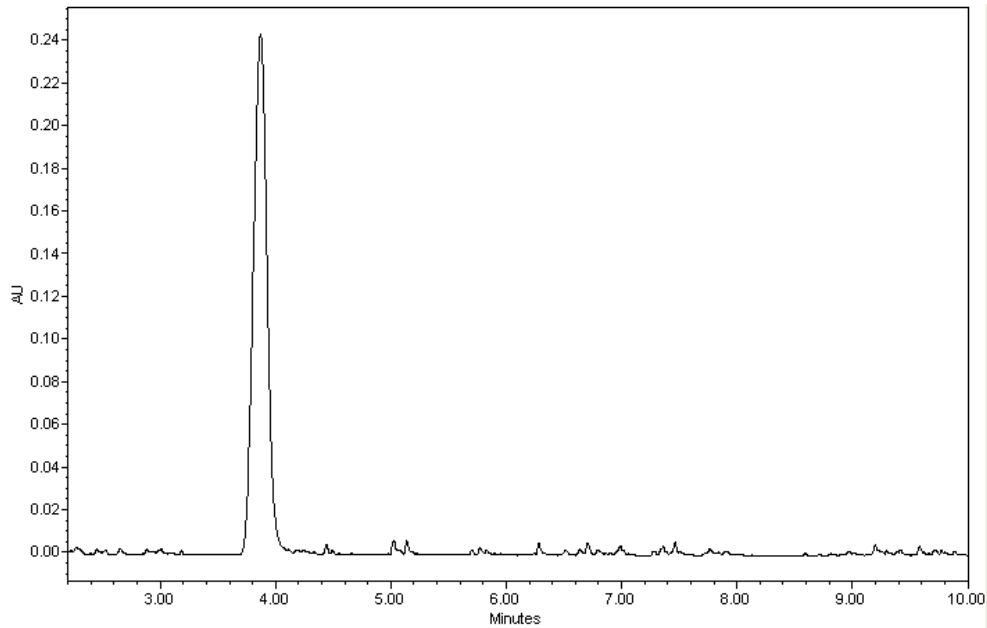
6.5.9 Marka I

Marka I ürünü ülkemizde satış ruhsatına sahip bir ilaç firmasına aittir. Ürün mavi renkte olup tabletler 0.3177 g ağırlığındadır. Marka tabletlerde 20 mg tadalafil olduğu iddia etmektedir. Ürüne ait fotoğraf Şekil 6.45'da görülmektedir.



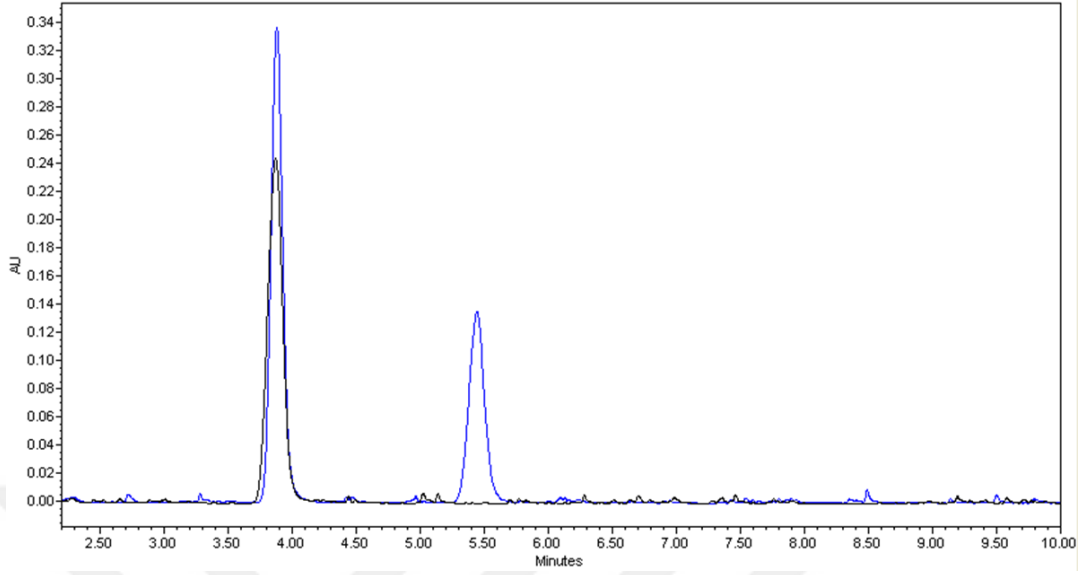
Şekil 6.45 Marka I' ya ait fotoğraf

Bu marka tabletlerden elde edilen örnek Agilent HPLC kromatogramı Şekil 6.46'da görülmektedir.



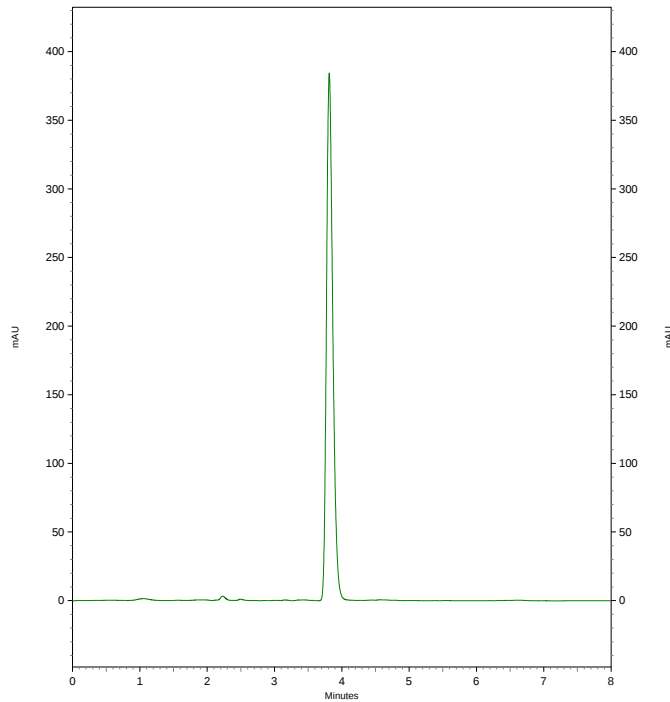
Şekil 6.46 Marka I'nın Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogram

Mix sildenafil ve tadalafil standardı ile Marka I'ya ait sinyaller Şekil 6.47'de görülmektedir.

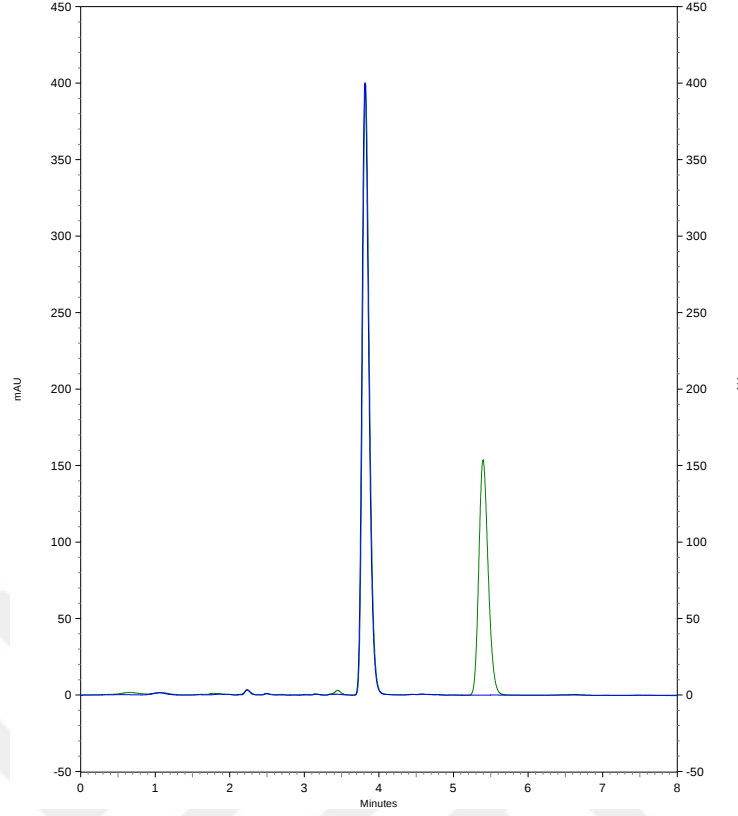


Şekil 6.47 20 mg L⁻¹ sildenafil sitrat ve tadalafil standardı ile Marka I'nın Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Agilent HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar

Marka I'nın Thermo HPLC sisteminde analizi sonrası elde edilen kromatogramlar Şekil 6.48 ve Şekil 6.49'da görülmektedir.



Şekil 6.48 Marka I' nın Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Thermo HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogram



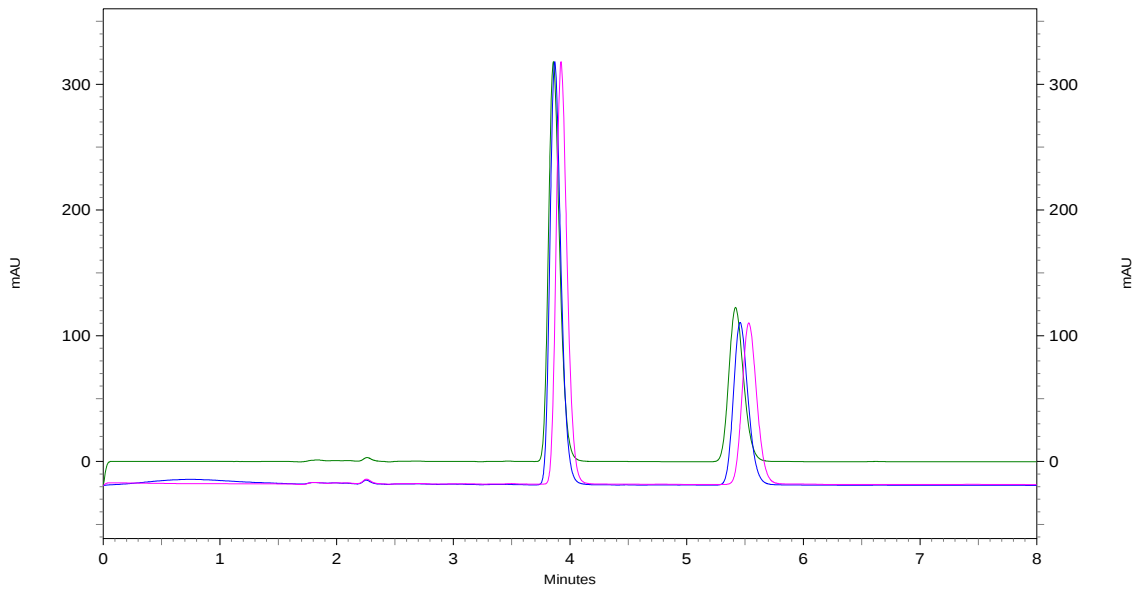
Şekil 6.49 20 mg L⁻¹ sildenafil sitrat ve tadalafil standardı ile Marka I'nın Çizelge 6.1'de görülen şartlar altında Thermo HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar

Şekil 6.46-6.49'da görüldüğü gibi ürün kutusunda yazıldığını doğrular şekilde tadalafil ait sinyal tespit edilmiştir. Marka I'ya ait her tablette tadalafil miktarı pik alanları esas alınarak Agilent HPLC sisteminde 18.3 ± 0.3 mg (N=3), Thermo HPLC sisteminde 19.4 ± 0.3 mg (N=3) tadalafil bulunmuştur. İki HPLC sisteminden elde edilen değerler birbirleri ile uyum içerisindedir. Bulunan bu değerler tablet kutusunda iddia edilen 20 mg değerinden daha küçüktür.

6.6 Sildenafil ve Tadalafil Etken Maddelerinin Atıksu Örneklerinde Tayinleri

Tez kapsamında HPLC sisteminde geliştirilen analitik yöntem ile sildenafil ve tadalafil analitlerinin atıksu örneklerinde eşzamanlı tayin edilip edilmediğinin araştırılması amacı ile bir seri deney planlanmıştır. Atıksu arıtma sistemlerinde bu analitler için bir arıtma stratejisinin geliştirilebilmesi için ilk şart atıksu matriksinde bu bileşenlerin doğru bir şekilde tayinlerinin yapılabilmesidir. Literatürde sildenafil ve tadalafil türlerinin farklı matrikslerde tayinlerine yönelik çalışmalar yer alsa da atıksu örneklerinde HPLC sistemi yardımı ile eşzamanlı tayinlerine yönelik bir çalışma rapor

edilmemiştir. Yüksek verimde arıtımı yapılmayan bu bileşenlerin içme suyu ile her yaş ve cinsiyet grubunda bulunan insanlar üzerinde olumsuz etkiler doğurabileceği muhakkaktır. Belirtilen aktif bileşen(ler)ini içeren ilaçların tüketimi sonrası büyük bir kısmının vücuttan atıldığı ve atıksu matriksinin bir parçası olduğu bilinmektedir. Atıksu sistemlerinde uzun süre boyunca analitlerin yapısında bir değişiklik olup olmadığına ilişkin bir bilgi literatürde rapor edilmemiştir. Çözelti ortamında sildenafil ve tadalafilin yapısında bir değişiklik olup olmadığının tespiti amacı ile tez kapsamında çalışmalar yürütülmüştür. Bu amaçla 20 mg/L sildenafil ve tadalafil içeren bir mix standart hazırlanıp üç farklı vial 1.5 mL konulmuştur. Viallerden biri oda sıcaklığında (23-24 °C), diğeri buzdolabında (-4 °C) ve sonuncu buzlukta (-20 °C) 45 gün süre ile tutulup her 7 günde bir numuneler analiz edilmiştir. Buzdolabında (-4 °C) bekletilen vialin Thermo HPLC sistemine optimum şartlar altında gönderilmesi sonucu çalışmanın başı ortası ve sonunda elde edilen kromatogramlar Şekil 6.50’de görülmektedir.

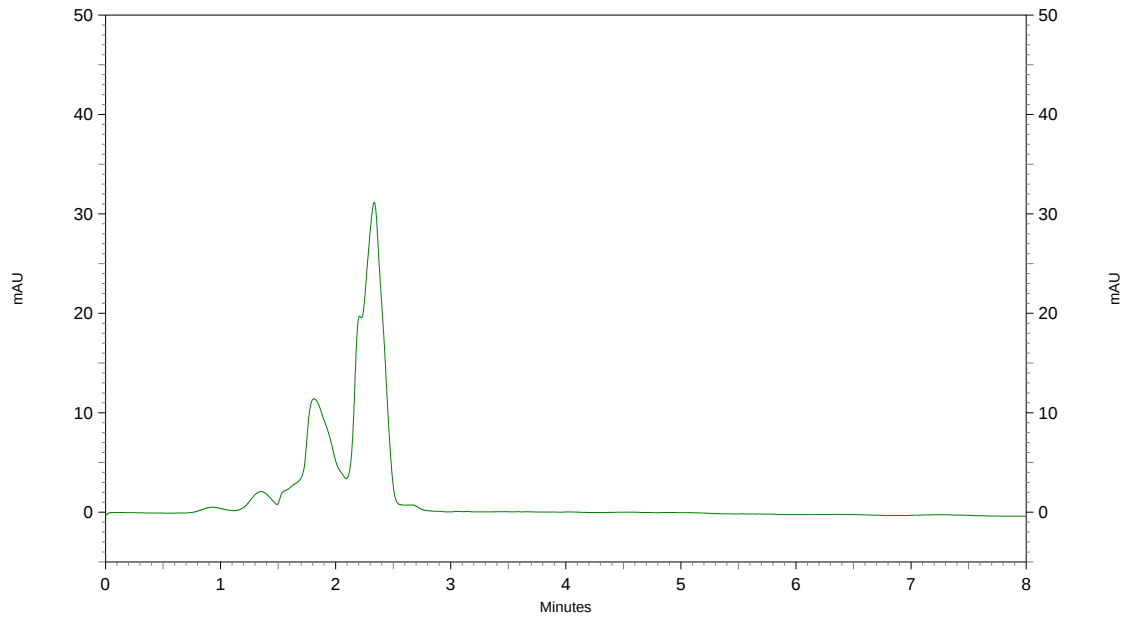


Şekil 6.50 Buzdolabında (-4 °C) bekletilen vialin Thermo HPLC sistemine optimum şartlar altında gönderilmesi sonucu çalışmanın başı ortası ve sonunda elde edilen kromatogramlar

Şikil 6.50’de de görüldüğü üzere her iki analitin sinyali harcinde bir sinyal kromatogramda görülmemiştir. Bu durum analitlerin kimyasal yapısında bir değişikliğin olmadığı geçen süre zarfında analitlerin bozunmadığını göstermektedir. Benzer sonuçlar oda sıcaklığı ve -20 °C de tutulan örneklerden de elde edilmiştir. Her üç numunede bulunan analitlerin sinyallerinde bir değişiklik olmamış ve analit sinyallerine ilave sinyal(ler) kromatogramda ortaya çıkmamıştır. Bu durum vücuttan bozunmadan atılan

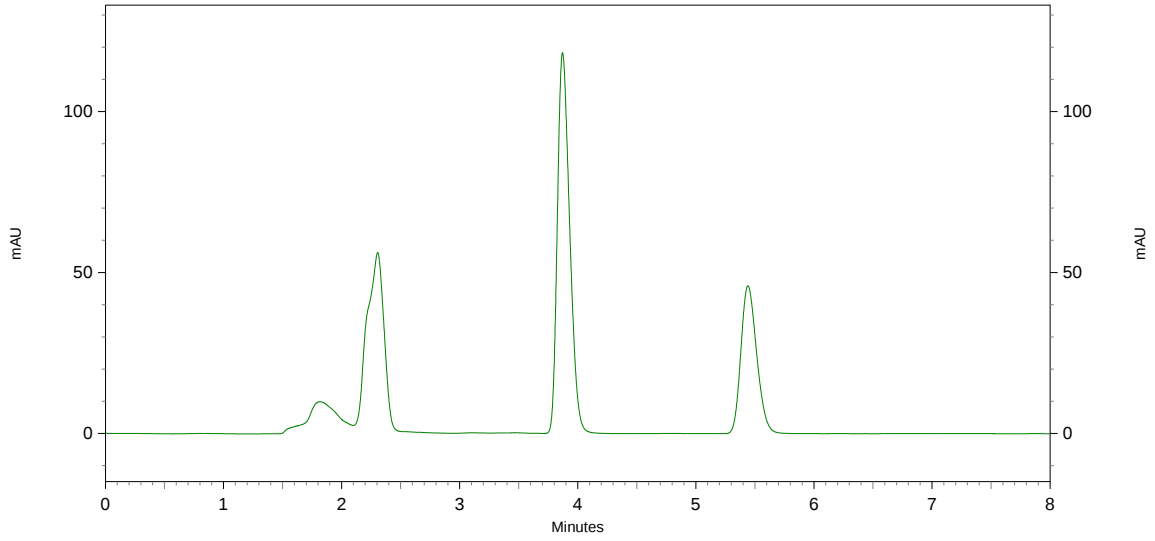
sildenafil ve tadalafil kimyasallarının uzun süre atıksu matriksinde bir bozunmaya uğramadan kalabileceğini ortaya koymaktadır. Bu durum da belirtilen analitlerin atıksu matriksinde arıtılmalarının elzem olduğu sonucunu ortaya çıkartmaktadır.

Atıksu örneğinde bulunan sildenafil ve tadalafil kimyasallarının tayinine yönelik yapılan çalışmanın ilk aşamasında Yıldız Teknik Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümünden temin edilen atıksu örneği 0.22 µm filtre ile süzülerek optimum şartlar altında Thermo HPLC sistemine gönderilmiş ve aşağıda görülen kromatogram elde edilmiştir.



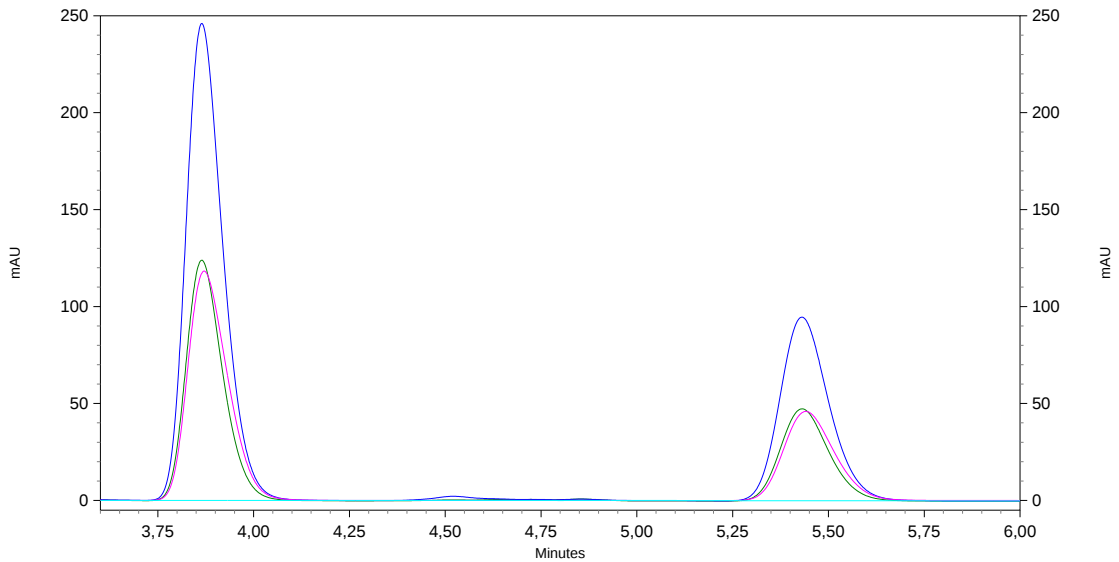
Şekil 6.51 Atıksu örneğinin Thermo HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogram

Kromatogramda da görüldüğü üzere sildenafil ve tadalafilin bulunduğu alıkonma sürelerinde herhangi bir sinyal görülmemiştir. Bu durum incelenen atıksu örneğinde analitlerin olmadığını göstermektedir. Ancak yoğun bir matrikse sahip atıksu örneğinde analit alıkonma sürelerinde bir kayma olup olmadığının tespitine yönelik standart katma deneyi yapılmıştır. Bu amaçla uygun miktarda mix standart atıksu numunesine ilave edilerek 5.0 µg/mL derişimde standart karışımı atıksu matriksinde hazırlanmıştır. Numune 15 dakika boyunca homojenliğin sağlanmasına yönelik mekanik karıştırıcı yardımı ile işleme tabii tutulmuş ve sonrasında 0.22 µm filtre ile süzülerek optimum şartlar altında HPLC sistemine gönderilerek analiz edilmiştir. Elde edilen kromatogram



Şekil 6.52 Atıksu matriksinde hazırlanmış 5.0 µg/mL sildenafil ve tadalafil içeren standardın optimum şartlar altında HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogram

Kromatogramda görüldüğü üzere analit sinyalleri matriksten etkilenmeden simetrik sinyaller vermişlerdir. Analit alıkonma sürelerinde bir kayma olup olmadığının tespiti amacı ile atıksu örneği, atıksu matriksinde hazırlanmış 5.0 µg/mL mix standart, tampon çözelti ile hazırlanmış 5.0 ve 10.0 µg/mL mix standartlar ardışık olarak HPLC sistemine gönderilmiş ve aşağıda görülen kromatogramlar elde edilmiştir.

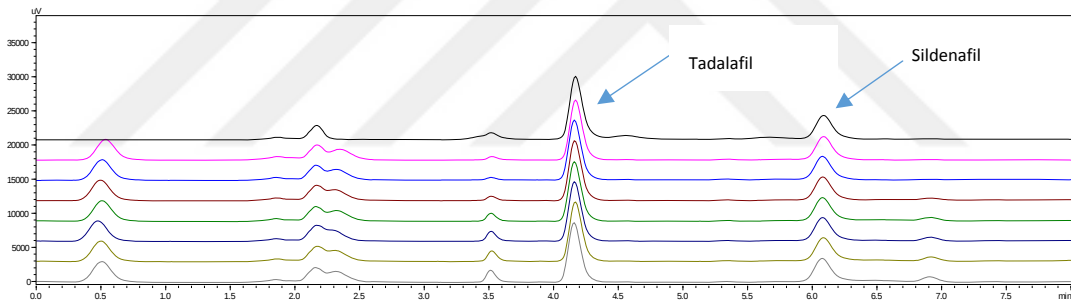


Şekil 6.53 Analit alıkonma sürelerinde bir kayma olup olmadığının tespitine yönelik elde edilen HPLC kromatogramları: Atıksu örneği (Turkuaz), atıksu matriksinde hazırlanmış 5.0 µg/mL mix standart (Pembe), tampon çözelti ile hazırlanmış 5.0 (Yeşil) ve 10.0 µg/mL (Mavi) mix standartlar

Kromatogramlardanda görüldüğü üzere analit sinyallerinin alıkonma sürelerinde matriks kaynaklı herhangi bir kayma ortaya çıkmamıştır. Tampon çözelti ortamında hazırlanan standarttan elde edilen sinyaller ile atıksu matriksinde hazırlanan standarttan elde edilen analit sinyalleri arasında fark olmadığı matriksin optimum şartlar altında analitlerin kalitatif ve kantitatif tayinini etkileyecek bir etkisinin olmadığını ispatlamıştır. Aynı şartlar altında atıksu ortamında hazırlanan 5.0 µg/mL karışık standart çözeltiden elde edilen sinyal alanları aynı derişimde tampon çözeltide hazırlanmış standart çözeltiden elde edilen sinyal alanları kullanılarak %geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Sildenafil ve tadalafil için elde edilen değerler sırası ile 101.30 ± 3.43 ve 102.68 ± 1.59 olarak bulunmuştur. Sonuçlardan ortaya çıktığı üzere geliştirilen kromatografik tayin yöntemi ile çok yoğun bir matrikse sahip atıksu örneğinde bulunan sildenafil ve tadalafilin yüksek doğrulukta tayinleri yapılabilmektedir. %RSD değerleri her iki analit için de %3.5' un altında bulunmuştur. Bu durum sonuçların tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğunu göstermektedir.

6.7 Sildenafil ve Tadalafil Etken Maddelerinin Piyasada Satılan Enerji İçeceklerinde Tayinleri

Piyasada enerji içeceği konsepti ile satışa sunulan içeceklerin yapısında bu tez kapsamında analitik tayin yöntemi geliştirilen cinsel gücü artırıcı sildenafil ve tadalafil kimyasallarının bulunup bulunmadığını tespit etmek amacı ile deneysel çalışmalar yapılmıştır. Bu kapsamda özellikle benzin istasyonlarında satılan ve tüketimi çok olan dört farklı enerji içeceği temin edilmiş ve optimum şartlar altında analize tabii tutulmuştur. Çalışmanın bir kısmında Yıldız Teknik Üniversitesi Araştırma Laboratuvarlarında bulunan Shimadzu HPLC HPLC-DAD cihazı kullanılmıştır. Daha önce kullanılan hareketli faz ve kolon bu HPLC-DAD cihazında da kullanılarak sistem analitik performansı tespit edilmiştir. Sildenafil ve tadalafil analitlerinin LOD ve LOQ değerlerinin tespitinde kalibrasyonda ilk nokta olarak yer alan ve sinyal/gürültü oranı yaklaşık 4-5 olan 0.50 mg/L mix standart çözelti kullanılmıştır. Elde edilen kromatogramlar aşağıda görülmektedir.

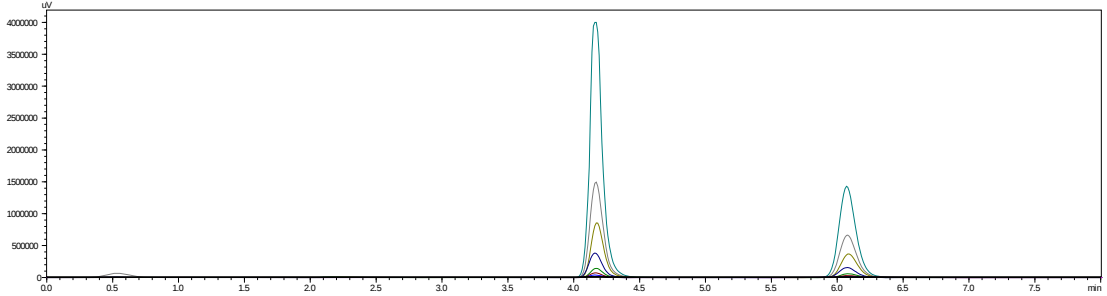


Şekil 6.54 0.50 mg L⁻¹ sildenafil ve tadalafil standardının Shimadzu HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar

Elde edilen kromatogramlarda sinyal alanları kullanılarak LOD ve LOQ değerleri her iki analit için de hesaplanmıştır. Sildenafil sitrat için elde edilen kalibrasyon grafiğinin denklemi $y = 63925x - 42513$ olup R^2 değeri 0.999 olarak elde edilmiştir. Sildenafil sitrat için gözlenebilirlik sınırı 20.6 ng/mL, tayin limiti 68.6 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Tadalafil için doğrusal kalibrasyon denklemi $y = 95581x + 25277$, R^2 değeri 0.9994, LOD değeri 25.9 ng/mL ve LOQ değeri 86.2 ng/mL olarak tayin edilmiştir. Görüldüğü gibi elde edilen değerler çok küçük derişimlerde önderiştirmeye ihtiyaç duyulmadan kantitatif tayinlerin yapılabileceğini ıspatlamıştır.

Enerji içeceklerinin analizlerinde Thermo ve Shimadzu marka HPLC cihazları kullanılmıştır. Shimadzu sisteminde kalibrasyon grafiği elde etmede kullanılan

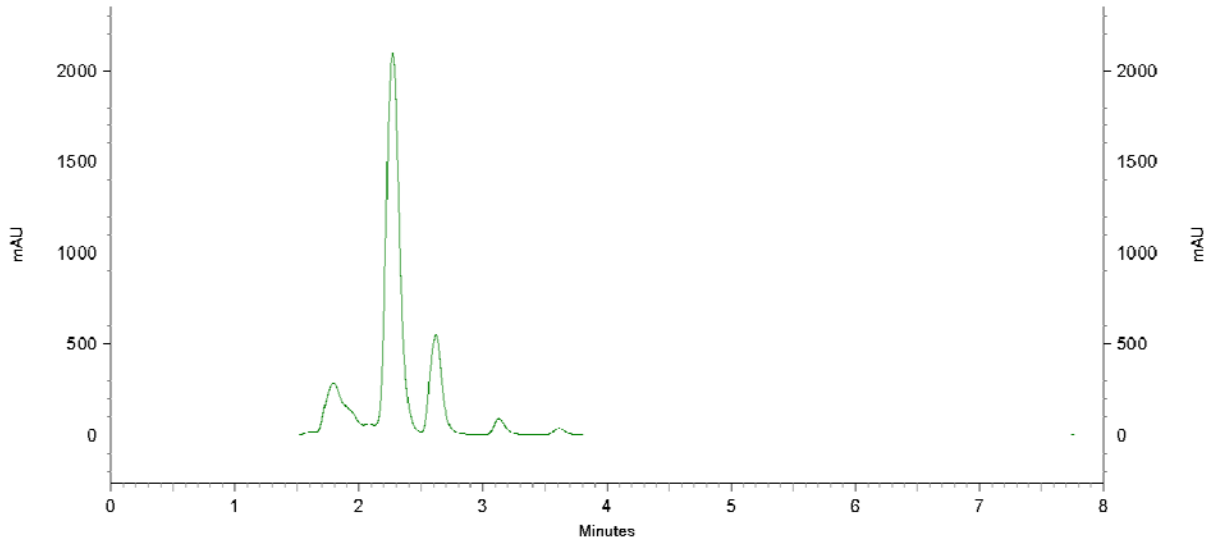
kromatogramlar Şekil 6.55'te görülmektedir. Kromatogramlarda görüldüğü üzere sinyallerin alıkonma süreleri diğer iki HPLC sisteminden farklı bulunmuştur. Tadalafil için alıkonma süresi 4.17 min, sildenafil için ise 6.08 min bulunmuştur. Pikler simetrik ve sinyallerde herhangi bir omuz ve kuyruk tespit edilmemiştir.



Şekil 6.55 Farklı derişimlerde sildenafil sitrat ve tadalafil mix standartlarının Shimadzu HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar

6.7.1 Marka X

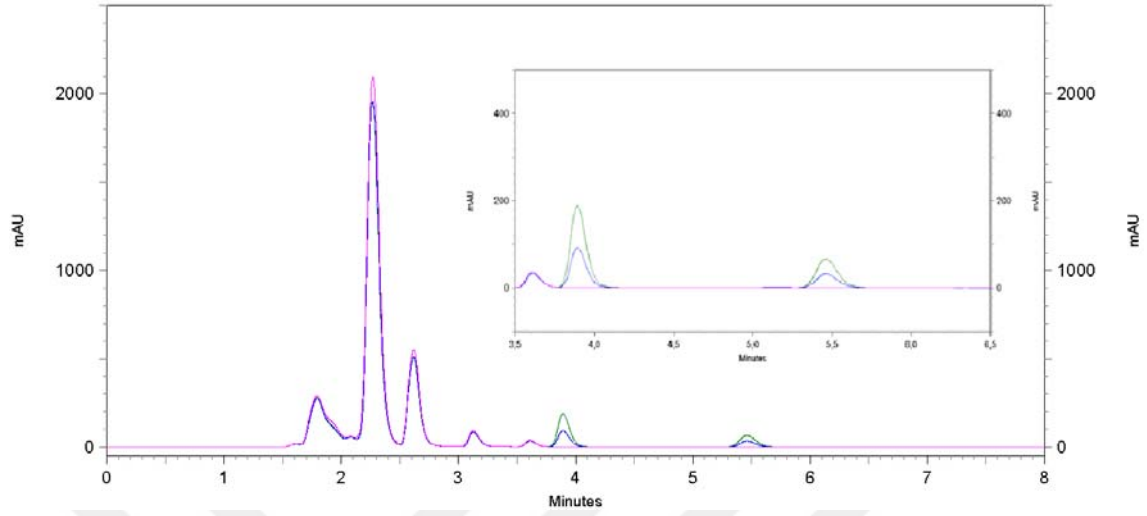
Piyasadan temin edilen Marka X Thermo HPLC sisteme analiz edilerek yapısında sildenafil ve tadalafil olup olmadığı tespit edilmeye çalışılmıştır. Marka X in Thermo HPLC sistemine enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram Şekil 6.56'da görülmektedir.



Şekil 6.56 Marka X enerji içeceğinin Thermo HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogram

Şekil 6.56 Marka X in yapısında iki analitin de olmadığı ortaya koymaktadır. Analit alıkonma sürelerinin öncesinde 1.5-3.7 dakika aralığında matriksin yapısında bulunan ve çalışma dalgaboyunda absorpsiyona sahip kimyasal(lar)a ait beş analitik sinyal elde edilmiştir. Matriks etkisi ile analit alıkonma sürelerinde bir kayma olup olmadığının

belirlenmesi amacı ile 50 ve 100 mg/L mix standart çözeltilerden Marka X numunesine düşük hacimde spike edilerek aşağıda görülen kromatogramlar elde edilmiştir.

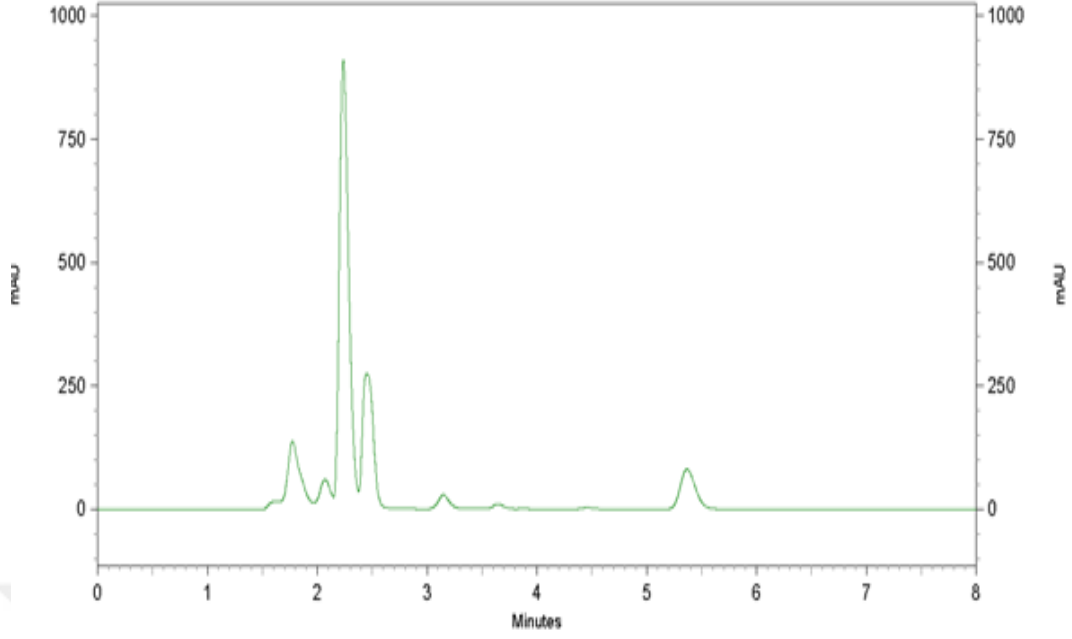


Şekil 6.57 Marka X enerji içeceğine 50 mg L⁻¹ ve 100 mg L⁻¹ derişimlerde mix standarttan eşit hacimde spike edilmesi sonrası Thermo HPLC sisteminde elde edilen kromatogramlar

Şekil 6.57’de görüldüğü üzere analitlerin alıkonma sürelerinde matris kaynaklı bir kayma oluşmamıştır. 1.5-3.7 dakika aralığında elde edilen sinyaller sildenafil ve tadalafil ile ilgili değildir. Bu durum Marka X in yapısında sildenafil ve tadalafilin tayin limitlerinin üzerindeki derişimlerde olmadığını açıkça ortaya koymaktadır.

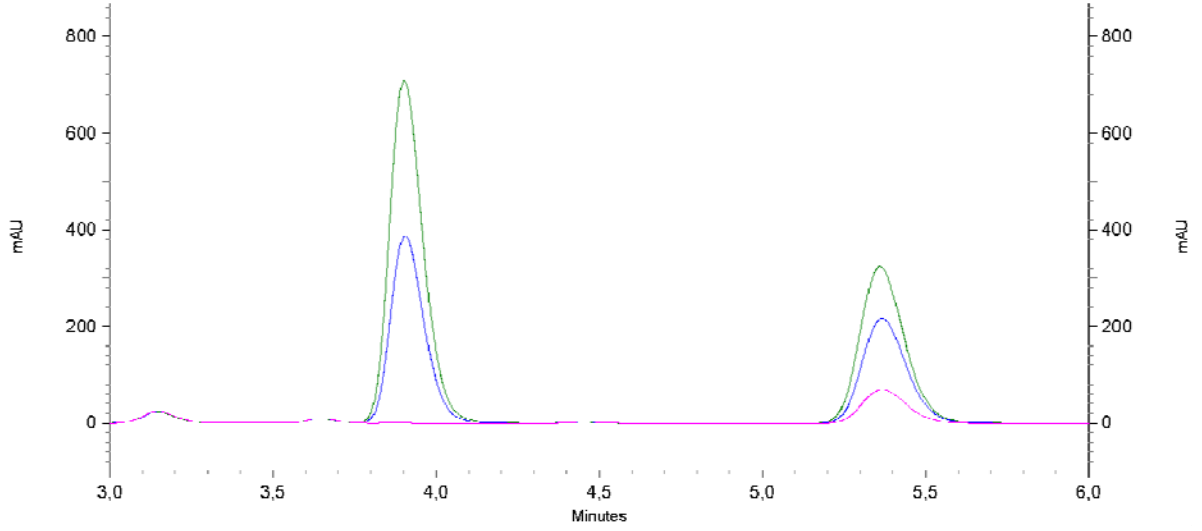
6.7.2 Marka Y

İstanbulda bulunan bir petrol istasyonunun market bölümünden temin edilen bu enerji içeceği içeriğinde bulunması muhtemel olan sildenafil ve tadalafil analitlerinin kalitatif ve kantitatif tayinlerinin yapılması amacı ile Thermo HPLC sisteminde analiz edilmiştir. Numune mobil faz ile beş kat seyreltilerek optimum şartlar altında HPLC sistemine gönderilmiş ve aşağıda görülen kromatogram elde edilmiştir.



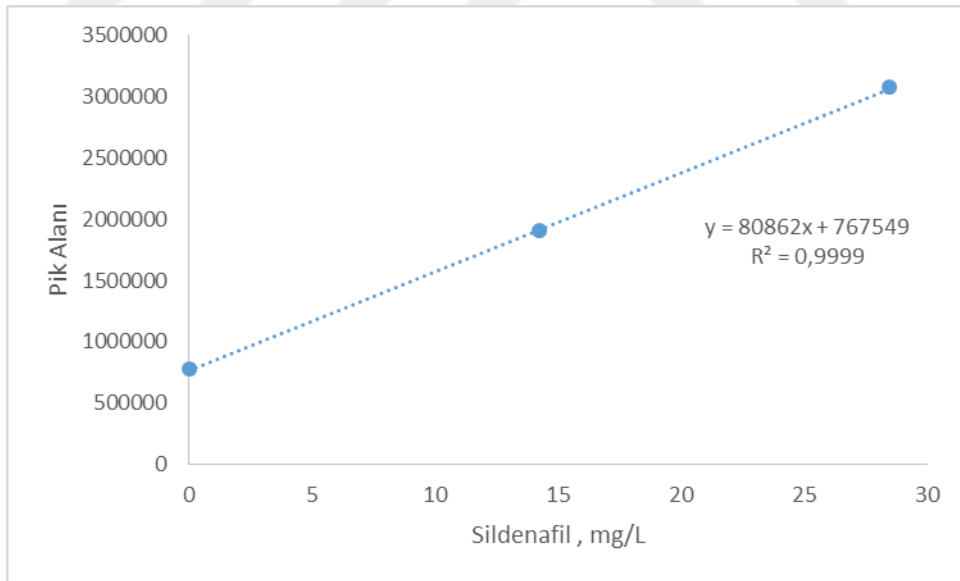
Şekil 6.58 Beş kat seyreltilmiş Marka Y enerji içeceğinin Thermo HPLC sisteminde elde edilen kromatogramı

Kromatogramda görüldüğü üzere sildenafille ait alıkonma süresinde analitik bir sinyal tespit edilmiştir. Yapıda bulunan sildenafil miktarının tespiti amacı ile bir seri standart çözelti HPLC sistemine gönderilmiş ve pik alanlarından hareketle doğrusal kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Matriksten kaynaklı bir interferans olup olmadığının tespiti amacı ile standart katma deneyi yapılmıştır. Doğrusal kalibrasyon grafiğinin eğimi 84733 olarak bulunmuşken standart katma deneyinde bu değer 80862 olarak tespit edilmiştir. Eğimler arasında tespit edilen yaklaşık %5' lik farklılıktan dolayı kantitatif tayinin matriks etkisinden bağımsız yapılabilmesi için standart katma deneyi ile yapıda bulunan sildenafil türünün miktar tayini yapılmıştır. Bu amaçla seyreltilmiş numune kullanılarak üç noktalı standart katma deneyi yapılmış ve aşağıdaki kromatogramlar elde edilmiştir.



Şekil 6.59 Marka Y enerji içeceğinin Thermo HPLC sisteminde elde edilen standart katma kromatogramları (Pembe:+0, Mavi:+20 mg/L sildenafil sitrat, Yeşil:+40 mg/L sildenafil sitrat)

Elde edilen kromatogramlardan da görüldüğü üzere analite ait alıkonma süresinde bir kayma meydana gelmemektedir. Standart katma deneyinden elde edilen kalibrasyon grafiği Şekil 6.60'ta görülmektedir.

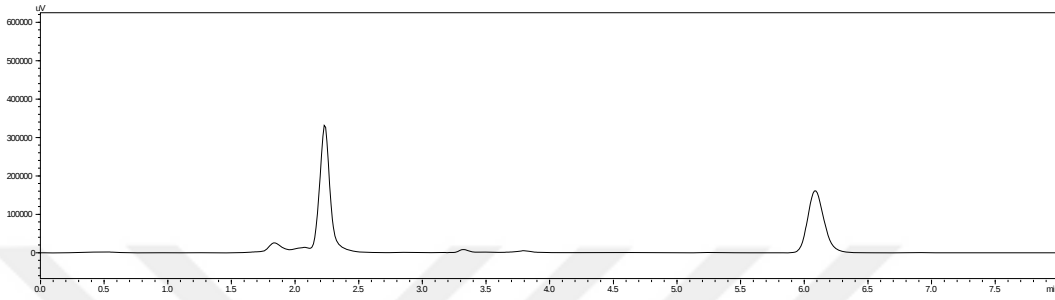


Şekil 6.60 Marka Y enerji içeceğinin standart katma deneyinde elde edilen kalibrasyon grafiği

Şekil 6.60'ta görüldüğü üzere R^2 değeri 0.9999 olarak tespit edilmiştir. Marka B' nin yapısında bulunan sildenafil derişimi 59.33 ± 1.38 mg/L olarak tespit edilmiştir.

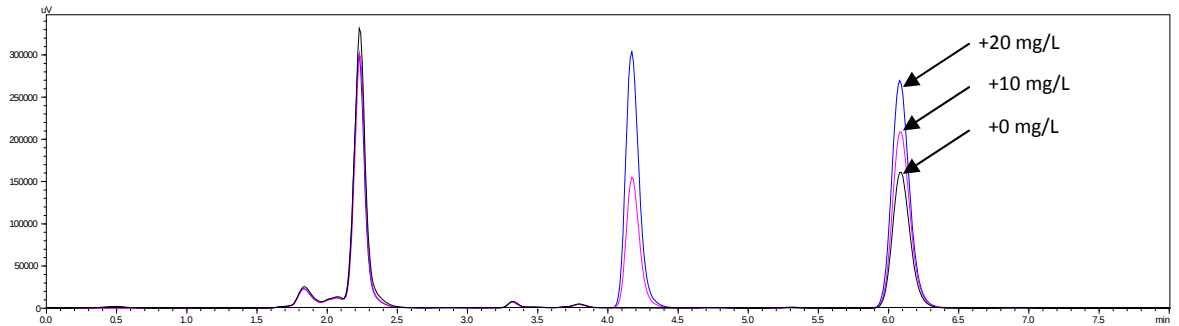
6.7.3 Marka Z

Piyasada tüketimi çok fazla olan enerji içeceklerinden biri Marka Z' dir. Bu enerji içeceği marketlerden temin edilerek Shimadzu HPLC sisteminde yapılarında analitlerin var olup olmadığını tespit etmek amacı ile analiz edilmiştir. 20 kat seyreltilmiş numunenin sisteme enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram Şekil 6.61'de görülmektedir.



Şekil 6.61 20 kat seyreltilmiş Marka Z enerji içeceğinin Shimadzu HPLC sisteminde elde edilen kromatogram

Doğrusal kalibrasyon grafiği kullanılarak Marka Z nin içeriğinde bulunan sildenafil derişimi tespit edilmiştir. Matriksten kaynaklı bir interferans olup olmadığının tespiti amacı ile üç noktali standart katma deneyi yapılmıştır. Elde edilen garfikler Şekil 6.62'de görülmektedir.



Şekil 6.62 Marka Z enerji içeceğinin Shimadzu HPLC sisteminde elde edilen standart katma kromatogramları

Kromatogramlardan görüldüğü üzere numunede tadalafil bulunmamaktadır. Sildenafil sinyalinin ise alıkonma süresinde bir değişiklik tespit edilmemiştir. Standart katma deneyi sonrasında elde edilen eğim ile doğrusal kalibrasyon garfiğinde elde edilen eğimler arasında yaklaşık %25 fark görülmüştür. Bu durum analit sinyali üzerine matriksten kaynaklı bir girişim etkisinin olduğunu göstermektedir. Bu sebeple numunede bulunan sildenafilin kantitatif tayini standart katma deneyi ile yapılmış ve derişim 464.9 ± 6.5 mg/L olarak tespit edilmiştir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında, kullanımı gün geçtikçe artan erektil disfonksiyon ilaç etken maddelerinin aktif bileşenleri arasında yer alan sildenafil ve tadalafil kimyasallarının farklı matrislerde yüksek doğruluk ve duyarlılıkta tayinlerine yönelik bir analitik yöntem geliştirilmiştir. Yasal markaların haricinde piyasada tüketimi yüksek olan kaçak ve sahte ilaçların yapısında hangi analitten ne miktarlarda bulunduğu tespiti amacı ile duyarlılığı yüksek, hızlı ve ucuz bir rutin analiz yöntemi geliştirmek bu tez kapsamında hedeflenmiş ve gerçekleştirilmiştir. Birçok rutin analiz laboratuvarında bulunan ve kullanımı büyük bir uzmanlık gerektirmeyen yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazı kullanılarak belirtilen analitlerin eşzamanlı tayinlerine yönelik bir analitik yöntem geliştirilmiştir. HPLC sisteminin değişen tüm parametreleri (mobil faz bileşenleri, mobil faz pH ve akış hızı...) optimize edilerek analitlerin kalitatif ve kantitatif tayinlerine yönelik sistemli deneysel çalışmalar yapılmıştır. pH 6.6' ya ayarlanmış 50 mM fosfat tamponu ile asetronitril (35:65, v/v) hareketli faz olarak kullanılmıştır. Inertsil (ODS 3V 4.6 x250mm,5µ) analitik kolonu sildenafil ve tadalafil analitlerinin ayrılmasında kullanılmış ve optimum hareketli faz akış hızı 1.0 mL/min olarak belirlenmiştir. Kantitatif tayinlerde üç farklı marka HPLC cihazı (Thermo, Shimadzu ve Agilent) kullanılmış, her bir cihaz için sistem analitik performans değerleri tespit edilerek geliştirilen yöntemin etkinliği ortaya konulmaya çalışılmıştır. Her üç HPLC sisteminde de düşük tayin limitleri elde edilerek önderiştirmeye gerek kalmadan farklı matrislerde analitlerin yüksek doğrulukta eşzamanlı tayinlerine olanak sağlanmıştır. Geliştirilen analitik yöntem ülkemizde yasal yollarla üretilen tabletlerin

yanısıra yurda kaçak yollarla sokulan ve İstanbul'da yüksek miktarda tüketilen tablet formda bulunan farklı marka örneğe uygulanarak yapılarında bulunan erektil disfonksiyon kimyasalının türü ve miktarı belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışılan tabletlerde optimum şartlar altında analitlerin kalitatif ve kantitatif tayinleri üzerine matriksten kaynaklı bir etkinin olup olmadığını belirlemek amacı ile standart katma deneyleri yapılmıştır. Vücuda yüksek miktarda alınacak bu tür kimyasalların, sonu ölümle sonuçlanabilecek ciddi sağlık problemlerine neden olduğu bilindiğinden belirtilen kaçak malzemelerin analiz edilmesi son derece önemlidir. Analizin hızlı ve ucuz olması, elde edilen sonuçların doğruluk ve duyarlılığının yüksek olması analiz laboratuvarları tarafından istenmektedir. Bu tez kapsamında geliştirilen yöntem belirtilen bu özelliklerin tamamını içermektedir.

Atıksu sistemlerinde sildenafil ve tadalafil kimyasallarının arıtım stratejilerinin geliştirilmesi için belirtilen matrikste girişimlerden uzak, doğruluk ve duyarlılığı yüksek bir tayin yönteminin geliştirilmesi gerekmektedir. Atıksu sisteminde bulunabilecek analitlerin arıtılamaması durumunda içme sularımız kontamine olabilecek ve bu durum doğrudan sağlığımızı olumsuz yönde etkileyecektir. Bu amaçla tez kapsamında geliştirilen tayin yöntemi atıksu örneklerine uygulanmış ve yapılan spike deneyleri ile yüksek geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Tayinlerde pik alanı kullanılmış, sildenafil ve tadalafil için geri kazanım değerleri sırası ile 101.30 ± 3.43 ve 102.68 ± 1.59 olarak bulunmuştur. Görüldüğü üzere yoğun bir matrikse sahip atıksu örneğinde optimum şartlar altında sildenafil ve tadalafil yüksek doğrulukta eşzamanlı tayin edilebilmiştir. Her iki analit için de tekrarlanabilirliğinin bir göstergesi olan %RSD değeri %3.5' un altında bulunmuştur.

Cinsel gücü arttırıcı kimyasallar arasında yer alan sildenafil ve tadalafil kimyasallarının enerji içeceklerinin içeriğinde bulunup bulunmadığının tespitinde geliştirilen analitik yöntemin kullanılabilirliğini test etmek amacı ile piyasadan temin edilen enerji içecekleri yapılarında bulunan analitlerin kalitatif ve kantitatif tayini amacı ile analiz edilmiştir. Marka X analizinde analitlere ait alıkonma sürelerinde sinyal elde edilmemiştir. Matriks etkisi ile analit alıkonma sürelerinde bir kayma olup olmadığının test etmek amacı ile farklı derişimlerde spike deneyi yapılmış ve analit sinyalleri üzerine optimum şartlar altında bir matriks etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Marka Y nin içeriğinde sildenafil tespit edilmiştir. Doğrudan kalibrasyon ve standart katma deneylerinden elde edilen eğimler arasında yaklaşık %5' lik fark bulunduğundan bu

markanın içeriğinde bulunan sildenafil analitin kantitatif tayininde üç noktalı standart katma deneyi kullanılmıştır. Benzer deneyler Marka Z için de yapılmıştır. Miktar tayininde standart katma kalibrasyon grafiği kullanılmasına karar verilmiş ve yapılan analizler sonucunda bu markanın yapısında 464.9 ± 6.5 mg/L sildenafil tespit edilmiştir.

Tez kapsamında sildenafil ve tadalafil türlerinin eşzamanlı tayinleri için geliştirilen analitik yöntem ilaçlara, atıksu örneklerine ve enerji içeceklerine başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Analitik performansı ortaya konulan bu analitik yöntem farklı matrikslerde bulunan sildenafil ve tadalafil analitlerinin yüksek doğruluk ve duyarlılıkta tayin edilmesinde rahatlıkla kullanılabilecektir.



KAYNAKLAR

- [1] Yavaşcaoglu, İ., Vuruşkan, H. ve Oktay, B., (2003). “Eretil Disfonksiyonlu Hastalarda Sildenafil Sitratın Klinik Etkinliğı ve Güvenilirliğı”, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakóltesi Dergisi, 29(1):15-18.
- [2] Feldman, H.A., Goldstein, I., Hatzichristou, D.G., Krane, R.J. ve McKinlay, J.B., (1994). “Impotence and Its Medical and Psychosocial Correlates: Results of the Massachusetts Male Aging Study”, J. Urol., 151(1):54-61.
- [3] Kaiser, F.E., (1999). “Erectile Dysfunction in the Aging Man”, Med. Clin. North. Am., 83:1267-1278.
- [4] Gresser, U. ve Gleiter, C.H., (2002). “Erectile Dysfunction: Comparison of Efficacy and Side Effects of the PDE-5 Inhibitors Sildenafil, Vardenafil and Tadalafil Review of the Literature”, Eur. Med. Res., 7:435-446.
- [5] Washington, S.L. ve Shindel, A.W., (2010). “A Once-Daily Dose of Tadalafil for Erectile Dysfunction: Compliance and Efficacy”, Drug Des. Devel. Ther., 4:159-171.
- [6] Tsertsvadze, A., Fink, H.A., Yazdi, F., MacDonald, R., Bella, A.J., Ansari, M.T., Garritty, C., Soares-Weiser, K., Daniel, R., Sampson, M., Fox, S., Moher, D. ve Wilt, T.J., (2009). “Oral Phosphodiesterase-5 Inhibitors and Hormonal Treatments for Erectile Dysfunction: A Systematic Review and Meta-Analysis”, Ann. Intern. Med., 151(9):650–661.
- [7] Carson, C.C., (2006). “PDE5 Inhibitors: Are There Differences?”, Can. J. Urol., 13(1):34–39.
- [8] Ljunggren, C., Hedelin, H., Salomonsson, K. ve Stroberg, P., (2008). “Giving Patients with Erectile Dysfunction the Opportunity to Try All Three Available Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors Contributes to Better Long-Term Treatment Compliance”, J. Sex. Med., 5:469–475.
- [9] Fejos, I., Neumajer, G., Beni, S. ve Jankovics, P., (2014). “Qualitative and Quantitative Analysis of PDE-5 İnhibitors in Counterfeit Medicines and Dietary Supplements by HPLC-UV Using Sildenafil as A Sole Reference”, J. Pharm. Biomed. Anal., 98: 327-333.
- [10] Zou, P., Oh, S.S., Hou, P., Low, M.Y. ve Koh, H.L., (2006). “Simultaneous Determination of Synthetic Phosphodiesterase-5 Inhibitors Found in A Dietary Supplement and Pre-Mixed Bulk Powders for Dietary Supplements Using High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and

- Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry”, *J. Chromatogr. A*, 1104: 113-122.
- [11] Choi, D.M., Park, S., Yoon, T.H., Jeong, H.K., Pyo, J.S. ve Park, J., (2008). “Determination of Analogs of Sildenafil and Vardenafil in Foods By Column Liquid Chromatography with A Photodiode Array Detector, Mass Spectrometry, and Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry”, *J. AOAC Int.*, 91:580-588.
 - [12] Venhuis, B.J. ve De Kaste, D., (2012). “Towards A Decade of Detecting New Analogues of Sildenafil, Tadalafil and Vardenafil in Food Supplements: A History, Analytical Aspects and Health Risks”, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 69: 196-208.
 - [13] Sacré, P.Y., Deconinck, E., Chiap, P., Crommen, J., Mansion, F., Rozet, E., Courselle, P. ve De Beer, J.O., (2011). “Development and validation of a ultra-high-performance liquid chromatography–UV method for the detection and quantification of erectile dysfunction drugs and some of their analogues found in counterfeit medicines”, *J. Chromatogr. A*, 1218: 6439-6447.
 - [14] Reepmeyer J.C. ve Woodruff, J.T., (2007). “Use of Liquid Chromatography–Mass Spectrometry and A Chemical Cleavage Reaction for the Structure Elucidation of A New Sildenafil Analogue Detected as An Adulterant in An Herbal Dietary Supplement”, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 47:887-893.
 - [15] Ren, Y., Wu, C. ve Zhang, J., (2012). “Simultaneous Screening and Determination of 18 Illegal Adulterants in Herbal Medicines and Health Foods for Male Sexual Potency by Ultra-Fast Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry”, *J. Sep. Sci.*, 35: 2847-2857.
 - [16] Lee, H. ve Lee, B.J., (2011). “A Novel Approach to Simultaneous Screening and Confirmation of Regulated Pharmaceutical Compounds in Dietary Supplements by LC/MS/MS with An Information-Dependent Acquisition Method”, *Food Addit. Contam. Part A: Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.*, 28: 396-407.
 - [17] Damiano, F., Silva, C., Gregori, A., Vacondio, F., Mor, M., Menozzi, M. ve Di Giorgio, D., (2014). “Analysis of Illicit Dietary Supplements Sold in the Italian Market: Identification of A Sildenafil Thioderivative as Adulterant Using UPLC-TOF/MS and GC/MS”, *Sci. Justice*, 54: 228-237.
 - [18] Özkara, H., Kulaksızoğlu, H., Akand, M. Ve Peşkircioğlu, L., (2012). “Fosfodiesteraz-5 İnhibitörleri”, *Güncelleme Serileri*, 1:2
 - [19] Andersson K.E., (2001). “Pharmacology of Erectile Function and Dysfunction” *Urologic Clinics of North America*, 28(2): 233.
 - [20] Eardley, I., Ellis, P., Boolell, M., ve Wulff, M., (2002). “Onset and Duration of Action of Sildenafil for the Treatment of Erectile Dysfunction”, *British Journal of Clinical Pharmacology*, 53(1): 61.
 - [21] Fisher, W.A., Rosen, R.C., Eardly, I., Niederberger, C., Nadel, A., Kaufman, J. ve Sand, M., (2004). “The Multinationan Men’s Attitudes to Life Events and Sexuality (MALES) Study Phase II: Understanding the PDE5 Inhibitor Treatment Seeking Pattern, Among Men with Erectile Dysfunction. *Journal of Sexual Medicine*, 1(2): 150-160.

- [22] Alwaal, A., Al-Mannie, R. ve Carrie, S.,(2011). “Future Prospects in the Treatment of Erectile Dysfunction: Focus on Avanafil”, Drug Design Development and Therapy 5: 435.
- [23] Kim, H., Sohn, D.W. ve Kim, S.D., (2010). “The Effect of Mirodenafil on the Penile Erection and Corpus Cavernosum in the Rat Model of Cavernosal Nerve Injury”, International Journal of Impotence Research, 22:291.
- [24] Corbin, J.D. ve Francis, S.H., (2003). “Molecular Biology and Pharmacology of PDE-5- Inhibitor Therapy for Erectile Dysfunction”. Journal of Andrology 24:6.
- [25] Çelik, M., 2011. Sildenafilin Sıçan Overlerinde Oluşturulan İskemi Reperfüzyon Hasarındaki Etkisinin Biyokimyasal Ve Histopatolojik Olarak Araştırılması, Uzmanlık Tezi, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Erzurum.
- [26] Fernandes, M.A., Marques, R.J., Vicente, J.A., Santos, M.S., Monteiro, P., Moreno, A.J. ve Custódio, J.B., (2008). “Sildenafil Citrate Concentrations Not Affecting Oxidative Phosphorylation Depress H₂O₂ Generation by Rat Heart Mitochondria”, Mol Cell Biochem, 309:77-85.
- [27] Colle, I., De Vriese, Van Vlierberghe, H., Lamerie, N.H. ve De Vos, M., (2004). “Systemic and Splanchnic Haemodynamic Effects of Sildenafil in an in vivo Animal Model of Cirrhosis Support for a Risk in Cirrotic Patients”, Live International, 24:63-68.
- [28] Şimşek, T., 2011. Tıkanma Sarılığında Sildenafil Sitratın Karaciğer Morfolojisi ve Fonksiyonları Üzerine Etkisi: Deneysel Bir Çalışma, Uzmanlık Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tokat.
- [29] Şavlı, E., 2009. Antidepresanların ve Sildenafil Sitratın Öğrenme ve Bellek Üzerine Olan Etkilerinin Sıçanda Pasif Sakınma Yöntemiyle Araştırılması, Uzmanlık Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Samsun.
- [30] Gilman, A.G., (2009). Goodman & Gilman Tedavinin Farmakolojik Temeli, Nobel Tıp Kitabevleri. Bölüm: I, II, III, V, Appendix.
- [31] Kayaalp, O.S., (2002). Tıbbi Farmakoloji, Hacettepe Taş, 10.baskı, Bölüm III, VI, VII, X.
- [32] Turan, U., 2012. Böbrek İskemi Reperfüzyonunda Sildenafilin Koruyucu Etkisi, Uzmanlık Tezi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Edirne.
- [33] Boyce, E.G. ve Umland, E.M., (2001). “Sildenafil Citrate: a Therapeutic Update”, Clin Ther, 23:2-23.
- [34] Gandolfo, C., Sugo, A. ve Del Sette, M., (2003). “Sildenafil and Transient Global Amnesia”, Neurol Sci, 24:145-146.
- [35] Purvis, K., Muirhead, G.J. ve Harness, J.A., (2002). “The Effects of Sildenafil on Human Sperm Function in Healthy Volunteers”, Br J Clin Pharmacol, 53:53-60.
- [36] Sarıfakıoğlu, N., Gökem, S., Ateş L.,Ünzile, B. ve Gürcan, A., (2004). “The Influence of Sildenafil on Random Skin Flap Survival in Rats : an Experimental Study”, The British Association of Plastic Surgeons, 57:769-772.

- [37] T.C. Sağlık Bakanlığı Türk İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, E-Reçete İlaç Listesi, <http://www.titck.gov.tr/SKRS3>, 21 Haziran 2016.
- [38] Zippe, C.D., Jhavari, F.M., Klein, E.A., Kedia, S., Pasqualotto, F.F., Kedia, A., Agarwal, A., Montague, D.K. ve Lakin, M.M., (2000). "Role of Viagra After Radical Prostatectomy", *Urology*, 55:241-5.
- [39] Hancıoğlu, İ.E., (2011). Deneysel Subaraknoid Kanamada Tadalafil'in Serebral Vazospazma Etkisi, Uzmanlık Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı, Eskişehir.
- [40] Koktekir, E., Erdem, Y., Bayar, M.A., Gokcek, C., Karatay, M. ve Kilic, C., (2010). "A New Approach to the Treatment of Cerebral Vasospasm: The Angiographic Effects of Tadalafil on Experimental Vasospasm", *Acta. Neurochir.*, ; 152:463–469.
- [41] Çerkez, C., (2012). Sıçan Sirtında Oluşturulan Random Paternli Cilt Flep Modelinde Tadalafil'in Flep Yaşayabilirliği Üzerine Olan Etkisinin Araştırılması (Deneysel Çalışma), Uzmanlık Tezi, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı, Ankara.
- [42] Kloner, R.A., (2004). "Cardiovascular Effects of the 3 Phosphodiesterase-5 Inhibitors Approved for the Treatment of Erectile Dysfunction", *Circulation* 110:3149–55.
- [43] Wright, P.J., (2006). "Comparison of Phosphodiesterase Type 5 (PDE5) Inhibitors", *Int. J. Clin. Pract.*, 60:967–75.
- [44] Kaçar, D., (2014). Farklı Fosfodiesteraz Tip 5 Enzim İnhibitörlerinin İzole Sıçan Miyometriyum Kasılması Üzerine Etkilerinin İncelenmesi, Uzmanlık Tezi, Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Konya.
- [45] Lau, L.C. ve Adaikan, P.G., (2006). "Mechanisms of Direct Relaxant Effect of Sildenafil, Tadalafil and Vardenafil on Corpus Cavernosum", *Eur. J. Pharmacol.*, 541:184 90.
- [46] Borel, O.C., Mckee, A., Para, A., Haglund, M.M. ve Solan, A., (2003). "Possible Role for Vascular Cell Proliferation in Cerebral Vasospasm after Subarachnoid Hemorrhage", *Stroke*, 34(2):427-33.
- [47] Özmerdiven, Ç.G., (2015). Sıçanlarda Testis İskemi/Reperfüzyon Hasarında Nitrik Oksit (L-Arjinin) ve Fosfodiesteraz Tip 5 İnhibitörünün (Tadalafil) Etkisi, Uzmanlık Tezi, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, Bursa.
- [48] Cleber, E.T., Fernanda, B.M. ve Webb, C.R., (2006). "Differential Effects of the Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors Sildenafil, Vardenafil, and Tadalafil in Rat Aorta", *J Pharmacol*, 316:654-61.
- [49] Reffelmann, T., (2008). "The Cardiovascular Safety of Tadalafil", *Expert Opin. Drug Saf.*, 7(1):43-52.
- [50] Brock, G.B., McMahon, C.G., Chen, K.K., Costigan, T., Shen, W. Ve Watkins, V., (2002). "Efficacy and Safety of Tadalafil for the Treatment of Erectile Dysfunction: Results of Integrated Analyses", *J. Urol.*, 168: 1332–6.

- [51] Galie, N., Brundage, B.H., Ghofrani, H.A., Oudiz, R.J., Simonneau, G. ve Safdar Z., (2009). "Tadalafil Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension", *Circulation*, 119:2894– 903.
- [52] Toklu, H.Z. ve Ayanoglu Dülger, G., (2011). "Akılcı İlaç Kullanımı ve Eczacının Rolü", *Marmara Pharmaceutical Journal*, 15:89-93.
- [53] Dünya Sağlık Örgütü, (1985). *The Rational Use of Drugs Raporu*, Nairobi.
- [54] Laing, R.O., (1990). "Rational Drug Use: An Unsolved Problem", *Trop. Doct.*, 20: 101-103.
- [55] Vance, M.A. ve Millington, W.R., (1986). "Principles of Irrational Drug Therapy", *Int. J. Health Serv.*, 16: 355-361.
- [56] Prof. Dr. Nurettin Abacıoğlu, Akılcı (Rasyonel) İlaç Kullanımı, <http://www.universite-toplum.org/text.php3?id=251>, 24 Haziran 2016.
- [57] Dünya Sağlık Örgütü, (1993). *How to Investigate Drug Use in Health Facilities*, World Health Organization Action Programme on Essential Drugs and International Network for the Rational Use of Drugs, 1993.
- [58] Akıcı, A., Kalaça, S., Uğurlu, M.Ü., Çalı, Ş. ve Oktay, Ş., (2001). "Pratisyen Hekimlerin Yaşlılarda Akılcı İlaç Kullanımı Alışkanlıklarının Değerlendirilmesi", *Turk. J. Geriatr.*, 4(3):100-105.
- [59] De Vries, T.P.G.M., Henning, R.H., Hogerzeil, H.V. ve Fresle, D.A., (1994). "Guide to Good Prescribing", WHO Action Programme on Essential Drugs, Geneva.
- [60] Le Grand, A., Hogerzeil, H.V. ve Haaijer-Ruscamp, F.M., (1999). "Intervention Research in Rational Use of Drugs: A Review", *Health Policy and Planning*, 14(2):89-102.
- [61] Aydın, B. ve Gelal, A., (2012). "Akılcı İlaç Kullanımı: Yaygınlaştırılması ve Tıp Eğitiminin Rolü", *DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 1:57-63.
- [62] Koçoğlu, E.S., (2016). Sertralinin GC-MS Sisteminde Düşük Seviyelerde Tayinine Yönelik Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Yapay Mide Ortamındaki Kararlılığının Tespit Edilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, İstanbul.
- [63] Serbest, H., (2016). Valsartanın Farklı Matrislerde Tayinine Yönelik Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Kararlılık Çalışması, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, İstanbul.
- [64] Küçükkolbaşı, S., Gündüz, B. ve Kılıç, E., (2004). "Tabletlerde Mebendazolün Spektroflorimetrik Tayini", *GÜ Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 24(3):159-174.
- [65] Skoog, D., Holler, F.J. ve Nieman, T.A., (1998). *Principles Of Instrumental Analysis*, Fifth Edition, Brooks/Cole Thomson Learning, USA, S; 673-766.
- [66] Maden, M., (2010). Spectrofluorimetric Determination of Organic And Inorganic Selenium in Vitamin Supplements After Cloud Point Extraction, Yüksek Lisans Tezi, Ortadoğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- [67] Udenfriend, S., (1962 ve 1969). Fluorescence Assay in Biology and Medicine, Volumes I and II, Academic Press, New York.
- [68] Guilbault, G., (1967). Fluorescence: Theory and Intepretation, and Practice, Marcel Dekker Inc., New York.
- [69] Wang, C.C. ve Fernandez, L., (2012). "Spectrofluorimetric Determination of Sildenafil: A New Analytical Alternative for Its Analysis", JCMRD, 1(2):54–60.
- [70] El-Enin, M.A.B.A., Hammouda, M.E.S.A.A.G., El-Sherbiny, D.T., El-Wasseef, D.R. ve El-Ashry, S.M., (2015). "Validated Spectrofluorimetric Method for Determination of Two Phosphodiesterase Inhibitors Tadalafil and Vardenafil in Pharmaceutical Preparations and Spiked Human Plasma", Luminescence, 31:173-178.
- [71] Unutkan, T., (2016). Amoksisilinin Farklı Matrislerde Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi Sistemi ile Düşük Seviyelerde Tayini, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, İstanbul.
- [72] Sakar, M.K. ve Tanker, M., (1991). Fotokimyasal Analizler, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 67, Ankara.
- [73] Yılmaz, B., (2014). Diklofenak Etkin Maddesinin Farmasötik Preparatlarda Analitik Yöntemlerle Miktar Tayini, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- [74] Holler, J.F., Skoog, D.A. ve West, D.M., (1999). Analitik Kimya Temelleri, Bilim Matbaa, 497-597, Ankara.
- [75] Yeo, S.K., Lee, H.K. ve Li, S.F.Y., (1991). "Separation of Antibiotics by High Performance Capillary Electrophoresis with Photodiode-Array Detection", J. Chromatogr., 585(1):133-137.
- [76] Trefi, S., Routaboul, C., Hamieh, S., Gilard, V., Malet-Martino, M. Ve Martino, R., (2008). "Analysis of Illegally Manufactured Formulations of Tadalafil (Cialis®) by ¹H NMR, 2D DOSY ¹H NMR and Raman Spectroscopy", J Pharm Biomed Anal., 47:103-113.
- [77] Wawer, I., Pisklak, M. Ve Chilmonczyk, Z., (2005). "1H, 13C, 15N NMR Analysis of Sildenafil Base and Citrate (Viagra) in Solution, Solid State and Pharmaceutical Dosage Forms", J Pharm Biomed Anal., 38:865-870.
- [78] Baba, B., (2007). Biga Yarımadası (Çanakkale) Sıcak Su Kaynaklarındaki Arsenik (AS)' in Voltametri ve İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi (ICP-MS) Teknikleri ile Kantitatif Tayini, Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale.
- [79] Henden, E., Deniz, T., Yayayürek, O. ve Erdem, N., (2005). "Sularda Arsenik Bileşimi ve Arıtımı", Ondokuzuncu Ulusal Kimya Kongresi, 30 Eylül - 4 Ekim 2005, Kuşadası.
- [80] Demir, E., İnam, R., Ozkan, S.A. ve Uslu, B., (2014). "Electrochemical Behavior of Tadalafil on TiO₂ Nanoparticles-MWCNT Composite Paste Electrode and Its Determination in Pharmaceutical Dosage Forms and Human

- Serum Samples using Adsorptive Stripping Square Wave Voltammetry”, *J Solid State Electr.*, 18(10):2709-2720.
- [81] Batista, E.F., Sartori, E.R., Medeiros, R.A., Rocha-Filho, R. ve Fatibello-Filho, O., (2010). “Differential Pulse Voltammetric Determination of sildenafil Citrate (Viagra®) in Pharmaceutical Formulations using a Boron-Doped Diamond Electrode”, *Anal. Lett.*, 43(6):1046-1054.
- [82] Beşergil, B., (2015). *Enstrümantal Analiz*, 1. Baskı, Gazi Kitabevi, Ankara.
- [83] Zhu, X., Xiao, S., Chen, B., Zhang, F., Yao, S., Wan, Z., Yang, D. Ve Han, H., (2005). “Simultaneous Determination of Sildenafil, Vardenafil and Tadalafil as Forbidden Components in Natural Dietary Supplements for Male Sexual Potency by High-Performance Liquid Chromatography–Electrospray İonization Mass Spectrometry”, *J. Chromatogr. A.*, 1066(1-2):89-95.
- [84] Starno-rossi, S., Anzillotti, L., De La Torre, X. ve Botre, F., (2010). “A Gas Chromatography/Mass Spectrometry Method for The Determination of Sildenafil, Vardenafil and Tadalafil and Their Metabolites in Human Urine”, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 24(11):1697-1706.
- [85] Kupiec, T., (2004). “Quality-Control Analytical Methods: High-Performance Liquid Chromatography”, *Int. J. Pharm. Compd.*, 8(3):223-227.
- [86] Joshi, S., (2002). “HPLC Separation of Antibiotics Present in Formulated and Unformulated Samples”, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 28(5): 795-809.
- [87] Bhardwaj, S.K., Dwivedi, K. ve Agarwal, D.D., (2015). “A Review: HPLC Method Development and Validation”, *International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 5(4): 76-81.
- [88] Gündüz , T., (1999). *İnstrümantal Analiz*, Gazi Kitabevi Ankara, 1225-1273.
- [89] White, R., (1990). *Chromatography/Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Its Applications*, New York and Basel, Marcel Dekker, Inc: 1-15.
- [90] Snyder, L.R., Glajch, J.L. ve Kirkland J.J. (1988). *Practical HPLC Method Development*, John Wiley & Sons, USA.
- [91] Koyunoğlu, S., (2008). *Paeonia Türleri İçerisindeki Monoterpen Glikozitlerinin Yapı Tayinleri ve Kromatografik Analizleri İçin Yöntem Geliştirilmesi*. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [92] Saylan, Y., (2011). *Boronat Afinite Kromatografisi İçin Monolitik HPLC Kolonlarının Hazırlanması*. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [93] İleri, H., (2011). *Bir Grup Antioksidan Bileşiğinin Tayini İçin HPLC Yöntemi Geliştirilmesi ve Çoklu Dedektör Analitik Yöntem Validasyonu Çalışmaları*. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- [94] Sahu, K.P. ve Patro, C.S., (2014). “Application of Chemometric Response Surface Methodology in Development and Optimization of a RP-HPLC method for the Separation of Metaxalone and Its Base Hydrolytic Impurities”, *J. Liq. Chromatogr.*, 37(17):2444-2464.

- [95] Kromidas, S. (2005). *More Practical Problem Solving in HPLC*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- [96] Snyder, L.R., Kirkland, J.J. ve Dolan, J.W., (2010). *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 3rd edition, John Wiley & Sons: Hoboken, New Jersey.
- [97] Bojanapu, A., Subramaniam, A.T., Munusamy, J., Dhanapal, K., Chennakesavalu, J., Sellappan, M. ve Jayaprakash, V., (2015). "Validation and Method Development of Tadalafil in Bulk and Tablet Dosage Form by RP-HPLC", *Drug Research*, 65(2):82-85.
- [98] Al-Hroub, H., Alkhawaja, B., Alkhawaja, E. ve Arafat, T., (2016). "Sensitive and Rapid HPLC-UV Method with Back-Extraction Step for the Determination of Sildenafil in Human Plasma", *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in The Biomedical and Life Sciences*, 1009:1-6.
- [99] Mehenna, M.M., Motawaa, A.M. ve Samaha, M.W., (2012). "Quantitation of Transdermal Tadalafil in Human Skin by Reversed- Phase High-Performance Liquid Chromatography", *Journal of AOAC International*, 95(4):1064-1068.
- [100] Strach, B., Wyska, E., Pociğcha, K. ve Jachowicz, R., (2015). "Sensitive and Precise HPLC Method with Back-Extraction Clean-Up Step for the Determination of Sildenafil in Rat Plasma and Its Application to a Pharmacokinetic Study", *Biomedical Chromatography*, 29(10):1559-1566.
- [101] Zailina, A.M., Aminah, A. ve Ambar, Y.M., (2013). "Optimization of Extraction Methods for Determination of Phosphodiesterase-5 (PDE5) Inhibitors in Premix Coffee", *Sains Malaysiana*, 42(2):135-142.
- [102] Fejos, I., Neumajer, G., Beni, S. ve Jankovics, P., (2014). "Qualitative and Quantitative Analysis of PDE-5 Inhibitors in Counterfeit Medicines and Dietary Supplements by HPLC-UV Using Sildenafil as a Sole Reference", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 98:327-333.
- [103] Bakırdere, S., (2009). *Speciation Studies Using HPLC-ICP-MS and HPLC-ES-MS*, PhD. Thesis, The Graduate School of Natural and Applied Sciences of Middle East Technical University, Ankara.
- [104] Caner, C., (2015). *Bazı Metal İyonlarının Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu ile Zenginleştirilerek USN-ICP-OES Cihazı ile Tayini*, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya.
- [105] Akpınar, D., (2013). *Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu ile Amonyanın Önderiştirilmesi ve Tayini*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [106] Krishnamurthy, B., Shivaprakash, R. ve Amitabha, G., (2009). "Quantitation of Sildenafil in Human Plasma by Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography", *Pharmacologyonline*, 2:67-74.
- [107] Tripathi, A.S., Sheikh, I., Dewani, A.P., Shelke, P.G., Bakal, R.L., Chandewar, A.V. ve Mazumder, P.M., (2013). "Development and Validation of RP-HPLC Method for Sildenafil Citrate in Rat Plasma-Application to Pharmacokinetic Studies", *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(3):317-321.

- [108] Atalay, E. D., (2012). Katı Faz Ekstraksiyonu Yöntemiyle Endüstriyel Atık Sulardaki Kromun Tayini ve Uzaklaştırılması, Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- [109] Guermouche, M.H. ve Bensalah, K., (2006). “Solid Phase Extraction and Liquid Chromatographic Determination of Sildenafil and N-demethylsildenafil in Rat Serum with Basic Mobile Phase”, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 40(4):952-957.
- [110] Geankoplis, C.J., (2011). Taşınma Süreçleri ve Ayırma Süreci İlkeleri, Çeviren: Yapıcı, S., 4:771-772.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ali Kemal FİDAN
Doğum Tarihi ve Yeri : 28.08.1987, Dinar/AFYON
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : alikemalfidan87@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Analitik Kimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	-
Lisans	Kimya Bölümü	Süleyman Demirel Üniversitesi	2010
Lise	Fen Bilimleri	Ataköy Lisesi	2005

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2016-Devam Ediyor	Kansuk Lab.	KKL/Müd.Yard.
2015-2016	Abdi İbrahim	KKL/Uzman
2013-2015	World Medicine	KKL/Uzm.Yard.
2012-2013	Pharmactive İlaç	KKL/Uzm.Yard.

YAYINLARI

1. Fidan, A.K., Bakirdere, S., (2016). “Simultaneous Determination of Sildenafil and Tadalafil in Legal, Illicit/Counterfeit Drugs and Waste Water Samples by High Performance Liquid Chromatography”, Journal of AOAC International, 99:923-928.
2. Bakirdere S., Yaroğlu T., Tırık N., Demiröz M., Fidan A.K., Maruldaı O., Karaca A., (2014). “Su Örneklerinde Bulunan Arsenik, Kadmiyum ve Kurşunun Optimize Edilmiş Pd-Mg ve Ni Matriks Modifierli Grafit Fırınlı Atomik Absorpsiyon Spektrofotometre Sistemi ile Eser Seviyelerdeki Tayinleri”, III. Eser Analiz Çalıştay1, 15-18 Mayıs 2014, Tokat.