



**SİLODOSİN ETKİN MADDESİNİN FARKLI
ORTAMLARDA MİKTAR TAYİNİ İÇİN YENİ
ANALİTİK YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ
VE VALİDASYONLARININ YAPILMASI**

Sinan YERLİ

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU

Doktora Tezi-2018

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

**SİLODOSİN ETKİN MADDESİNİN FARKLI
ORTAMLARDA MİKTAR TAYİNİ İÇİN YENİ ANALİTİK
YÖNTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE
VALİDASYONLARININ YAPILMASI**

Sinan YERLİ

**Analitik Kimya Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU**

**ERZURUM
2018**

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

**SİLODOSİN ETKİN MADDESİNİN FARKLI ORTAMLARDA
MİKTAR TAYİNİ İÇİN YENİ ANALİTİK YÖNTEMLERİN
GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONLARININ YAPILMASI**

Sinan YERLİ

Tez Savunma Tarihi : 18.05.2018

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Mehmet Serdar GÜLTEKİN (Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Alptuğ ATİLA (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Ali AŞÇI (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Hanif SHIRINZADEH (Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir

Prof. Dr. Duygu ARIKAN
Enstitü Müdürü

Doktora Tezi
ERZURUM – 2018

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	V
ÖZET	VI
ABSTRACT.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XI
TABLolar DİZİNİ.....	XIV
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Benign Prostat Hiperplazisinde Tedavi Yaklaşımları.....	2
2.1.1. Benign Prostat Hiperplazisinin Tanımı ve Tedavi Yöntemleri	2
2.1.2. 5 Alfa Redüktaz İnhibitör İlaçları	2
2.1.3. Fitoterapotik İlaçlar.....	3
2.1.4. Antikolinerjik ilaçlar	3
2.1.5. Fosfodiesteraz tip 5 enzim inhibitörleri	4
2.1.6. Desmopressin ve Loop Diüretikleri	4
2.1.7. Kombinasyon Tedavileri.....	4
2.1.8. Cerrahi Tedavi.....	4
2.1.9. Alfa Bloker İlaçları	5
2.2. Silodosin.....	6
2.2.1. Silodosinin Kimyasal Yapısı ve Özellikleri.....	6
2.2.2. Silodosinin Farmakodinamik Özellikleri	7
2.2.3. Silodosinin Farmakokinetik Özellikleri.....	7

2.2.5. Silodosinin Uygulama Yolları	8
2.2.6. Silodosinin Hamilelikte Kullanımı	8
2.2.7. Silodosin Tayinine Yönelik Daha Önce Bildirilmiş Analitik Yöntemler	8
2.3.1. Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi	13
2.3.2. Moleküler Absorpsiyon Spektroskopisi.....	14
2.3.3. Işının Absorplanması ve Lambert-Beer Yasası	15
2.3.4. Ultraviyole-Görünür Bölge Spektrofotometreleri	16
2.3.5. UV-Görünür Bölge Spektrofotometre Cihazının Kullanım Amaçları	17
2.4. Kromatografik Yöntemler.....	18
2.4.1. Kromatografik Yöntemlerinin Sınıflandırılması.....	19
2.4.2. Kromatografinin Dayandığı Temel Olaylar	20
2.4.3. Dağılma Kromatografisi	21
2.4.4. Adsorpsiyon Kromatografisi.....	21
2.4.5. İyon Değiştirme Kromatografisi	21
2.4.6. Boyut-Elme Kromatografisi	22
2.4.7. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	22
2.4.8. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinin Uygulama Alanları...	25
2.5. LC-MS/MS.....	26
2.5.1. LC-MS/MS'in Uygulama Alanları	29
2.6. Analitik Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)	30

2.6.1. Doğruluk ve Kesinlik	31
2.6.2. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi	31
2.6.3. Duyarlılık	31
2.6.4. Stabilité.....	32
2.6.5. Sağlamlık.....	32
2.6.6. Geri Kazanım	32
2.6.7. Seçicilik-Belirleyicilik	32
3. MATERYAL VE METOT.....	33
3.1. Kimyasal Maddeler ve Cam Malzemeler	33
3.2. Cihazlar	33
3.3. Yöntemler.....	34
3.3.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri Yöntem Şartları	34
3.3.2. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (LC-MS/MS) Yöntem Şartları	34
3.4. Silodosinin Plazmadan Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon Prosesi	35
3.5. Kapsül Çözeltilerinin Hazırlanması	36
4. BULGULAR.....	37
4.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri Yöntemi	37
4.1.1. Stok, Standart ve Kalite kontrol Çözeltilerin Hazırlanması	37
4.1.2. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon).....	38
4.1.3. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	42
4.1.4. Plazma Çalışması	43

4.1.5. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon).....	44
4.3. LC-MS/MS Yöntemi.....	47
4.3.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması	47
4.3.2. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon).....	49
4.3.3. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	52
4.4. LC-MS/MS Plazma Çalışması.....	53
4.4.1. Plazma Çözeltilerinin Hazırlanması.....	53
4.4.2. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon).....	54
4.4.3. Geliştirilen Yöntemin Gerçek Numunelere Uygulanması.....	58
5. TARTIŞMA.....	61
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	69
KAYNAKLAR	70
EKLER	78
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	78
EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU	79

TEŞEKKÜR

Bu doktora tezi, Sayın Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU yöneticiliğinde Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Doktora öğrenimim boyunca, değerli bilgi, deneyim ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen tez danışmanım, değerli hocam Sayın Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU'ya en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Çalışma süresince bana yardımcı olan Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Doç. Dr. Alptuğ ATILA, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Onur ŞENOL ve Sayın Arş. Gör. M. Emrah YAMAN'a, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu öğretim üyelerinden Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mevlüt Albayrak'a, çalışmalarımda LC-MS/MS cihazını kullanmama olanak sağlayan Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Araştırma Merkezi çalışanlarına, eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi tüm imkanları sunan ve bu günlere getiren anneme, babama ve tüm aile fertlerine, çalışmalarım süresince birçok fedakarlıklar göstererek beni destekleyen ve her zaman yanımda olan eşim Ezel Bilge YERLİ'ye en derin duygularla teşekkür ederim.

Sinan YERLİ

ÖZET

Silodosin Etkin Maddesinin Farklı Ortamlarda Miktar Tayini İçin Yeni Analitik Yöntemlerin Geliştirilmesi ve Validasyonlarının Yapılması

Amaç: $\alpha 1$ adrenoreseptör blokleri olan silodosinin farmasötik preparatlarda ve plazmada miktar tayini için literatürdeki mevcut yöntemlere alternatif olarak basit, hassas ve yeni bir UV-Görünür Bölge Spektrofotometri ve LC-MS/MS yöntemleri geliştirilip geçerlilik testlerinin yapılması ve daha sonra Benign Prostat Hiperplazisi tanısı almış hastaların plazmalarında silodosinin miktar tayinlerinin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminde, 272 nm dalga boyunda çözücü olarak metanol kullanıldı. LC-MS/MS yönteminde ise asetonitril-10 mM amonyum asetat(asetik asit ile pH 4.5'a ayarlanan) (40:60, h/h) hareketli fazı, C₈ kolon, 0,4 mL/dk akış hızı, MS dedektör, pozitif iyonizasyon, internal standart olarak karbamazepin kullanıldı. MS spektrumlarında silodosin ve karbamazepin için moleküler iyon değerleri sırasıyla 496 ve 237 olarak belirlendi.

Bulgular: Plazmaya katılım yapılan numunelerde günüçi- günlerarası doğruluk ve kesinlik değerleri UV-Görünür Bölge sıfırıncı türev yöntemi için sırasıyla %1.59 – 2.04, %0.67 – 1.4 ve %-0.76 – 3.88, %0.98 – 3.67 aralığında, birinci türev spektrofotometri yöntemleri için %-1.56 – 4.72, %0.98 – 2.10 ve %-1.47 – 3.72, %1.51 – 3.63 aralığında bulundu. LC-MS/MS yönteminin günüçi- günlerarası doğruluk ve kesinlik değerleri sırasıyla %-4.3 – 7.4, %1.5 – 5.3 ve %0.4 – 2.7, %-2.5 – 1.4 aralığında bulundu. Plazmadan geri kazanım değerleri ise LC-MS/MS yöntemi için ortalama %97, UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yöntemi için ortalama %98.7 olarak belirlendi.

Sonuç: Geliştirilip geçerlilik testleri yapılan her üç yöntem ile piyasada tek mevcut farmasötik preparatta ve plazmada silodosin miktar tayinleri yapıldı. Benign Prostat Hiperplazisi tanısı konulan dört hastanın plazmasında LC-MS/MS yöntemiyle silodosin miktar tayinleri gerçekleştirildi. Çalışma sonucunda, her iki yöntemin kalite kontrol ve klinik çalışmalarında başarıyla uygulanabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: LC-MS/MS, silodosin, spektrofotometri

ABSTRACT

Development and Validation of New Analytical Methods for the Quantitative Determination of the Silodosin in Different Media

Aim: It was aimed to develop and validate a simple, sensitive and novel UV-Visible Spectrophotometric and LC-MS/MS methods to determination of silodosin which is α_1 adrenoreceptor blocker in pharmaceutical preparation and biological media as an alternative to present methods in the literature, and than apply this proposed methods on to the plasma samples collected from patients diagnosed with Benign Prostat Hyperplasia disorder.

Material and Method: Methanol was used as the solvent at a wavelength of 272 nm in UV-Vis Spectrophotometry. In LC-MS/MS method, acetonitrile-10 mM ammonium acetate (adjusted to pH 4.5 with acetic acid) (40:60, v/v) as mobile phase, C₈ column, 0.4 mL/min flow rate, MS detector, positive ionization and carbamazepine parameters were preferred. Molecular ion for silodosin and carbamazepine were detected 496 and 237 respectively.

Results: The intraday- interdays accuracy and precision values of the UV-Visible Region zeroth derivative for the samples participating in the plasma were found to be between 1.59 – 2.04%, 0.67 – 1.4% and -0.76 – 3.88%, 0.98 – 3.67% respectively. The intraday- interdays accuracy and precision of the first derivative method of UV-Visible region were found between -1.56 – 4.72%, 0.98 – 2.10% and -1.47 – 3.72%, 1.51 – 3.63% respectively. The intraday- interdays accuracy and precision of the LC-MS/MS method were found between -4.3– 7.4%, 1.5 – 5.3% and 0.4 – 2.7%, -2.5 – 1.4% respectively. Plasma recovery values were found 97% for LC-MS/MS method and 98.7% for UV-Visible Spectrophotometry method.

Conclusion: Quantative determination of silodosin in the only existing pharmaceutical preparation and plasma samples were performed by both of three methods which are developed and validated. Silodosin quantification was performed by LC-MS/MS method on the plasma of four patients diagnosed with benign prostatic hyperplasia. As a result of the study, it was concluded that both methods could be successfully applied in quality control and clinical studies.

Key Words: LC-MS/MS, silodosin, spectrophotometry

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	: Absorbans
AUC	: Eğri Altında Kalan Alan
BH	: Bağlı Hata
BPH	: Benign Prostat Hiperplazisi
BSS	: Bağlı Standart Sapma
CI	: Kimyasal İyonizasyon
C_{max}	: Maksimum Plazma konsantrasyonu
cm	: Santimetre
ÇA	: Çalışma Aralığı
DAD	: Diyod Array Dedektör
dk	: Dakika
λ	: Dalga Boyu
ESI	: Elektro Sprey İyonizasyon
FDA	: Gıda ve İlaç İdaresi
g	: Gram
GK	: Geri Kazanım
h	: Hacim
HPLC	: Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
HPTLC	: Yüksek Performans İnce Tabaka Kromatografisi
HPLC-MS	: Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi
ICH	: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı
IM	: İntramüsküler
IR	: İnfrared
IS	: İnternal Standart

L	: Litre
LC	: Sıvı Kromatografisi
LC-MS	: Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografisi-Ardışık Kütle Spektrometrisi
LOD	: Gözlenebilme Sınırı
LOQ	: Miktar Tayin Alt Sınırı
LR	: Lineer Regresyon
MTBE	: Metil Tersiyer Butil Eter
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
mmol	: Milimol
M	: Molarite
NA₂CO₃	: Sodyum Karbonat
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
PSA	: Prostat Spesifik Antijen
R	: Korelasyon Katsayısı
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
°C	: Santigrat Derece
S_a	: Regrasyon eğrisindeki kaymanın standart sapması

S_b	: Regrasyon eğrisindeki eğimin standart sapması
SS	: Standart Sapma
S/G	: Sinyal/Gürültü Oranı
T	: Geçirgenlik
TFA	: Trifloro Asetik Asit
t_{1/2}	: Yarılanma Ömrü
T_{max}	: Doruk Plazma konsantrasyonuna Ulaştığı Süre
TLC	: İnce Tabaka Kromatografisi
UHPLC	: Ultra Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
UV	: Ultra Viyole
UV/ VIS	: Ultra Viyole/ Görünür bölge
V	: Volt

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Silodosinin kimyasal yapısı.....	7
Şekil 2.2. Karbamazepinin kimyasal yapısı.....	7
Şekil 2.3. Elektromanyetik ışınların sistematik olarak tanımlanması	13
Şekil 2.4. Moleküler elektronik, titreşim ve dönme enerji seviyelerini gösteren enerji diyagramı	14
Şekil 2.5. P_0 şiddetindeki ışın demetinin absorplandıktan sonra P şiddetinde çıkması..	15
Şekil 2.6. Spektrofotometre cihazının basit bir şematik gösterimi.....	17
Şekil 2.7. Kromatografinin hareketli ve sabit faza göre sınıflandırılması.....	19
Şekil 2.8. Tek bileşenli bir bileşik için kromatogram.....	20
Şekil 2.9. HPLC cihazının şematik gösterimi.....	23
Şekil 2.10. ESI LC-MS/MS ⁶¹	28
Şekil 2.11. LC-MS/MS cihazının şematik gösterimi.....	30
Şekil 4.1. 5, 10, 15, 20, 30, 40 ve 50 µg/mL konsantrasyonlarda standart silodosin çözeltilerinin UV-Görünür Bölge Spektrofotometri sıfırıncı türev absorpsiyon spektrumları	37
Şekil 4.2. 5, 10, 15, 20, 30, 40 ve 50 µg/mL konsantrasyonlarda standart silodosin çözeltilerinin UV-Görünür Bölge Spektrofotometri birinci türev absorpsiyon spektrumları	38
Şekil 4.3. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminde standart çözeltilerin sıfırıncı türev kalibrasyon eğrisi	39
Şekil 4.4. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminde standart çözeltilerin birinci türev kalibrasyon eğrisi.....	39

Şekil 4.5. İlaç çözeltisine eklenen 3 farklı konsantrasyondaki silodosinin standart çalışma çözeltilerinin spektrumları	42
Şekil 4.6. 5, 10, 15, 20, 30, 40 ve 50 µg/mL konsantrasyondaki silodosin plazma çözeltilerinin UV sıfırıncı türev spektrumları	43
Şekil 4.7. 5, 10, 15, 20, 30, 40 ve 50 µg/mL konsantrasyondaki silodosin plazma çözeltilerinin UV birinci türev spektrumları	44
Şekil 4.8. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminde plazma çözeltilerinin sıfırıncı türev kalibrasyon eğrisi	44
Şekil 4.9. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminde plazma çözeltilerinin birinci türev kalibrasyon eğrisi	45
Şekil 4.10. LC-MS/MS sisteminde, 400 ng/mL IS içeren farklı silodosin çözeltilerinin kromatogramları	48
Şekil 4.11. Silodosine ait 200 V fragmentör voltaj altında elde edilen MS/MS spektrumu	48
Şekil 4.12. Silodosin ve Karbamazepine ait MRM-MS/MS spektrumları	48
Şekil 4.13. Silodosin standart çalışma çözeltilerinin LC-MS/MS yöntemiyle elde edilen kalibrasyon eğrisi	49
Şekil 4.14. 40 ng/mL standart silodosin çözeltisinin MRM spektrum ve kromatogramı	49
Şekil 4.15. 0,3 ng/mL konsantrasyondaki silodosin çözeltisinin kromatogramı	50
Şekil 4.16. 400 ng/mL IS içeren farklı konsantrasyonlardaki silodosin plazma çözeltilerinin LC-MS/MS kromatogramları	53
Şekil 4.17. Boş insan plazmasına ait kromatogram	53
Şekil 4.18. Plazma çalışmasında, LC-MS/MS yöntemiyle elde edilen plazma çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi	54

Şekil 4.19. 0.3 ng/mL insan plazması çözeltisinde silodosinin MRM spektrumları	55
Şekil 4.20. A.R.D isimli hastanın LC-MS/MS kromatogramı	59
Şekil 4.21. N.T. isimli hastanın LC-MS/MS kromatogramı	60
Şekil 4.22. M.K. isimli hastanın LC-MS/MS kromatogramı	60
Şekil 4.23. M.U.K. isimli hastanın LC-MS/MS kromatogramı	60



TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Ayırabildikleri maksimum madde miktarına göre kolonlar	24
Tablo 3.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yöntem şartları.....	34
Tablo 3.2. LC-MS/MS yöntem şartları	35
Tablo 4.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz sonuçları.....	40
Tablo 4.2. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminin doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)	41
Tablo 4.3. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminin analitik geri kazanım değerleri	42
Tablo 4.4. Silodosin urorec kapsülünün miktar tayini (n=6)	43
Tablo 4.5. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yöntemi, plazma çözeltilerinin kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz sonuçları.....	45
Tablo 4.6. Plazma çalışmasında, UV-Görünür Bölge Spektrofotometri ve birinci türev yöntemlerinin doğruluk, kesinlik değerleri (n=6).....	46
Tablo 4.7. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminin plazmadan geri kazanım değerleri	47
Tablo 4.8. LC-MS/MS yönteminin kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz sonuçları	50
Tablo 4.9. LC-MS/MS yönteminin doğruluk ve kesinlik değerleri	51
Tablo 4.10. LC-MS/MS yönteminin farmasötik preparatlarda analitik geri kazanım değerleri	52
Tablo 4.11. LC-MS/MS yöntemi ile kapsül başına 8 mg silodosin içeren urorec kapsül miktar analizi (n=3).....	52

Tablo 4.12. Plazma çalışmasında, LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz sonuçları	55
Tablo 4.13. Plazma çalışmasında LC-MS/MS yönteminin doğruluk ve kesinlik değerleri (n=3)	56
Tablo 4.14. LC-MS/MS yönteminin plazmadan geri kazanım değerleri.....	56
Tablo 4.15. Silodosinin LC-MS/MS yöntemi ile belirlenen stabilite değerleri	57
Tablo 4.16. LC-MS/MS yöntemi ile matriks etkisi.....	58
Tablo 4.17. BPH tanısı alan hastaların özellikleri.....	59



1. GİRİŞ

Fizyolojik sistemleri veya patolojik durumları insan yararı için değiştirmek amacıyla kullanılan kimyasal maddelere ilaç denir. Daha kısa bir tanımla ilaç, hastalıkların önlenmesi, tanısı ve tedavisi için kullanılan kimyasal maddelerdir.¹ Benign Prostat Hiperplazisi (BPH) prostat bezinin yavaşça büyüyerek idrar akışını azaltan bir durumdur. BPH tedavisi için günümüzde alternatif tedavi seçenekleri bulunmaktadır. $\alpha 1$ reseptör antagonisti bir ilaç olan silodosin, BPH semptomlarının tedavisinde kullanılan etkili bir ilaçtır.^{2,3} Kaba formülü olan $C_{25}H_{32}F_3N_3O_4$ silodosinin molekül ağırlığı 495,534 g/mol'dür.⁴ Silodosinin piyasada 4 mg ve 8 mg halinde iki kapsül formu bulunmaktadır. Ağızdan alımını takiben iyi emilir ve emilim doz ile orantılıdır. Ağızdan alımdan yaklaşık 2,5 saat sonra en yüksek plazma konsantrasyonuna ulaşır ve yarılanma ömrü 7 ile 17 saat arasında değişir. BPH'lı hastalarda kullanılan silodosinin günlük dozu 4 veya 8 mg olup günlük tek doz verilmesi etkili olmaktadır.⁵

Bu çalışmada, BPH tedavisinde büyük bir öneme sahip olarak kullanılan $\alpha 1$ reseptör antagonisti bir ilaç olan silodosin etkin maddesinin farmasötik preparatta hem de plazmada miktar tayini için literatürdeki mevcut yöntemlere alternatif olarak basit, hassas ve yeni bir UV-Görünür Bölge Spektrofotometri, Birinci Türev Spektrofotometri ve Sıvı Kromatografisi-Ardışık Kütle Spektrometrisi (LC-MS/MS) yöntemlerinin geliştirilip geçerlilik testlerinin (validasyon) yapılması amaçlanmıştır. Ayrıca geliştirilen yöntemlerden LC-MS/MS yöntemiyle BPH tanısı almış hastaların plazmalarında silodosin miktar tayinlerinin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Benign Prostat Hiperplazisinde Tedavi Yaklaşımları

2.1.1. Benign Prostat Hiperplazisinin Tanımı ve Tedavi Yöntemleri

BPH genellikle 50 yaşından büyük erkeklerde karşılaşılan bir hastalıktır. Uzun zaman ile yaşamına devam eden birçok erkeğin çoğunda mevcudiyetini sürdüren problemdir.⁶ Nüfus yaşlandıkça bu hastaların sayısı da göreceli olarak artmaktadır. Alt üriner sistem belirtilerinin prevalansını değerlendiren bir analiz, 40 ile 79 yaş aralığında BPH hastalığının başladığını, geliştiğini göstermiştir. BPH, yaşlı erkekler için en yoğun görülen hastalıklardan biri olması ile beraber, etki mekanizması hakkında soru işaretleri bulunmaktadır. Yapılan sık araştırmalara rağmen, neden sonuç ilişkisi belirsizliğini korumaktadır.⁷ Prostat Hiperplazisi tedavisinde kullanılan ilaçların hastalar üzerinde etkilerini inceleyen birçok yayın mevcuttur. Günümüzde mevcut tedavi yöntemleri aşağıda anlatılmıştır.

2.1.2. 5 Alfa Redüktaz İnhibitör İlaçları

5 alfa redüktaz enziminin iki subtipi mevcuttur. Tip I olanı en fazla yağ bezleri olmak üzere tüm dokularda mevcuttur. Genetik olarak bu enzimin görevini tam olarak yerine getiremediği kişilerde şimdiye kadar herhangi bir geri bildirim olmayıp, görevi net bir şekilde ifade edilememiştir.⁸ Tip II 5 alfa olan enzim prostat bezi dahil diğer genital dokularda yaygınlık göstermektedir. 5 Alfa redüktaz inhibitör ilaçlarının tip II için etkili olan finasterid ve tip I-II için etkili olan dutasterid içerikli farmasötik preparatları eczanelerde bulunmaktadır.

a) Finasterid: Semptomların giderilmesinde ilk kullanılan 5 alfa redüktaz inhibitör ilacıdır. Finasterid serum ve prostattaki dihidrotestosteron seviyelerini sırasıyla yüzde olarak 70 ve 85 ile 90 arasında inhibe eder.⁹ Prostat bezinin 30 cc'den fazla düzeyde olduğu hastalarda 5 alfa redüktaz inhibitörlerinin toplam ve tranzisyonel zon

volümünü önemli ölçüde azalttığı görülmüştür. Bu olay alt üriner sistem semptomlarında iyileşmeyi gerçekleştirmektedir.¹⁰⁻¹² Yapılan çalışmalarda; finasterid ile prostat bezinin boyutlarında %24 civarında düşüş olduğu saptanmıştır.^{13,14} İlaç maksimum etkisini altıncı ayda göstermektedir. İlaç alımı terkedilirse prostat hacmi yaklaşık 90 gün sonra eski haline döner.¹⁵

b) Dutasterid: Serum dihidrotestosteron düzeyinde yaklaşık %90 oranında azalma sağlamaktadır.¹⁶ Dutasterid, serum prostat spesifik antijen (PSA) seviyesinde altıncı aydan itibaren %50 oranında azalmaya neden olmakla beraber prostat hacmini de yaklaşık iki yılda %25 oranında azaltmaktadır.¹⁷ BPH tedavisinde orta ve şiddetli semptomlu hastaların tedavisinde kullanılır. 12 aylık tedavi süresince prostat hacmi %23.6, tranzisyonel zon hacmi %17.8 düzeyinde azalma sağlamıştır.¹⁸

2.1.3. Fitoterapotik İlaçlar

Bu ilaçlar, BPH ile alakalı akut üriner sistem semptomlarının iyileştirilmesinde özellikle Avrupa'da bir süredir tercih edilmektedir. Piyasada bulunanlar; Cucurbita pepo, Hypoxis rooperi, Pygeum africanum, Secale cereale, Saw Palmetto ve Urtica dioica'dır. Saw Palmetto pazar payında en fazla tercih edilen ilaçtır.¹⁹ Fakat etki mekanizması tam olarak laboratuvar çalışmalarında aydınlatılmamıştır.²⁰

2.1.4. Antikolinerjik ilaçlar

BPH ile ilişkili akut üriner sistem semptomlarının tedavisinde antikolinerjik ilaçlar son yıllarda tercih edilmeye başlanmıştır. Eczanelerde antikolinerjik ilaçlar olarak Darifenasin, Fesoterodin, Oksibutinin HCL, Propiverin, Solifenasin, Tolterodin ve Trospiyum klorür bulunmaktadır. Bunları kullananlar akut üriner sistem belirtileri stabil oluncaya kadar kontrol 28-42 günde bir, sonrasında 180-360 günde bir olmalıdır.¹⁹

2.1.5. Fosfodiesteraz tip 5 enzim inhibitörleri

BPH ile alakalı akut üriner sistem semptomlarının iyileştirilmesinde bu grup son zamanlarda mevcut tedavi seçenekleri arasında yerini almaktadır. Çünkü BPH ile ilişkili akut üriner sistem semptomları ve erektil disfonksiyon benzer özelliklere sahip rahatsızlıklardır. Bundan ötürü tek ilaç ile iki rahatsızlığın iyileştirilmesi hastalar ve de doktorlar açısından kolaylık sağlamaktadır. Ancak klinik veriler şimdiye kadar bekleneni verememiştir. Yeni çözüm odaklı verilere ihtiyaç duyulmaktadır.²¹ Fosfodiesteraz tip-5 inhibitörleri'nin Avrupa Üroloji Birliği Kılavuzunda orta şiddetli derecede akut üriner sistem semptomları bulunan kişiler tarafından alınması tavsiye edilmektedir.²²

2.1.6. Desmopressin ve Loop Diüretikleri

BPH ile alakalı hastalıkların iyileştirilmesinde birkaç yıldır kullanıma girmişlerdir. Tedaviye cevap alınamayan durumlarda noktüri sebebiyle kullanılması akla gelebilecek türlerdir. Desmopressin kullanmadan evvel noktüriye neden olabilecek durumlar iyileştirilmelidir. 72 saat geçince mutlaka serum sodyum düzeyi hekim tarafından kontrol edilmelidir. Serum sodyum düzeyinde düşüş gözlenmiş ise ilaç bırakılmalıdır.^{20,21}

2.1.7. Kombinasyon Tedavileri

BPH'lı kişilerde tek ilacın yeterli olmadığı durumlar olabilir. Daha fazla tercih edilen kombinasyonlar alfa bloker + 5 alfa redüktaz inhibitör ilaçları (5 ARİ), alfa bloker + antikolinergik ilaçlar, alfa bloker + fosfodiesteraz tip 5 enzim inhibitörleri, alfa bloker + 5-ARİ ilaçlar + antikolinergik ilaçlardır. Fakat bunların birlikte alınması ile alakalı bir genel görüş yoktur.^{20,21}

2.1.8. Cerrahi Tedavi

BPH ve üriner sistem semptomlarının ilaç ile tedaviye cevap vermediği

durumlarda ameliyat tercihi göz önünde bulundurulmalıdır. Cerrahi tedavi seçenekleri prostat bezinin boyutuna göre transüretral prostat rezeksiyonu, açık prostatektomi, holmium laser ile prostat enükleasyonu, transüretral prostat vapprizasyonu ve transüretral prostat insizyonudur.¹⁹

2.1.9. Alfa Bloker İlaçları

Bu grubun sınıflarına ayrılması, reseptöre bağlanma ilgilerine ve vücuttan uzaklaştırılma zamanlarına göre yapılır. 1990'lı yıllara kadar, hasta uyumu ve uzun süre ilaç kullanımı gerektiren BPH tedavisinde nonselektif ve etkisi uzun olmayan ilaçlar tercih edilmiştir. 1990'larda terazosin, doksazosin ile 2009'dan sonra silodosin gibi uzun etkili ve selektif ilaçların BPH tedavisinde kullanılmaya başlaması yeni bir dönem başlangıcı olmuştur.²³ Fenoksibenzamin'in BPH üzerine etkisi olduğu belirtilmiştir.²⁴ Fakat α_1 ve α_2 reseptörler ile etkileşmesi sonucu ilacın yan etkileri artmaktadır ve bu yüzden BPH tedavisinde kullanımı bulunmamaktadır.²³

a) Terazosin: Terazosin, kinazolin türevidir. Yarılanma zamanı yaklaşık 8 ile 12 saat arasındadır. İlk olarak hipertansiyon tedavisinde kullanılmakta iken; günümüzde α_1 adreno reseptör blokleri olarak BPH'nin semptomatik tedavisi için tercih edilmektedir. Bağırsaklardan emilimi tamama yakındır ve proteinlere bağlanması yüksektir. Biyoyararlanımı alınan besinlere bağlı olarak değişim göstermez. Böbreklerin görevlerini tam olarak yerine getirememesi ilacın vücuttan uzaklaştırılmasını ciddi anlamda etkilemez. Düşük dansiteli lipoprotein düzeyini azaltırken, yüksek dansiteli lipoprotein ve trigliserit düzeylerinde bir etkide bulunmaz.^{25,26} Tek doz kullanım avantajları mevcuttur. Lepor ve ekibi tarafından bulunan semptomatik Benign Prostat Hiperplazili kişilerde günde bir defa terazosin alınmasıyla alakalı detaylı analizler araştırmalara rehberlik etmektedir.²⁷

b) Doksazosin: Doksazosin yapı ve etki bakımından terazosine benzerlik göstermektedir. Etkisi uzun sürüp yarılanma zamanı 22 saate yakındır. Belirtilerin iyileşmesi yedi güne yakın sürmektedir ve terazosine oranla süresi azdır. Vertigo, yorgunluk, dispne, düşük tansiyon en sık görülen yan etkiler olarak göze çarpmaktadır. Maksimum doz 8 miligrama kadar verilebilir. Yan etkiler ilacın dozu arttıkça artar.²⁸ Cinsel fonksiyon bozukluğuna yol açmadığı belirtilmiştir.²⁹

c) Alfuzosin: Alfuzosin de kinazolin türevlerindendir. $\alpha 1$ adrenerjik reseptör alt tiplerine seçiciliği bulunmamaktadır.³⁰ Yavaş ve orta olmak üzere iki salınım tipi bulunmaktadır. Türkiye’de orta salınımlı tipi kullanımda olmamıştır.²¹ Alfuzosin tansiyonu etkilemeden hastalığın semptomlarını %30’a kadar azaltabilir. Ağız yoluyla dolaşıma hızla geçmektedir. Yavaş salınımlı tipinin maksimum plazma konsantrasyonu 3 saat sonra oluşur. Biyoyararlanımı yaklaşık olarak %49’dur. Plazma proteinlerine bağlanma oranı yaklaşık %90’dır. Metabolizasyonu karaciğerden, atılımı ise fekal yoluyla olur. Metabolitleri aktif değildir. Böbrek ve karaciğer fonksiyon bozukluklarında kullanılabilirliği güvenlidir.^{31,32}

d) Tamsulosin: Günlük alınması gereken miktar 0.4 mg’dır. Tansiyon düşüklüğü, bayılma gibi yan etkileri nadir seviyededir. Yarılanma zamanı 13 ile 22 saat arasındadır. Bu yüzden günde tek doz olarak kullanılabilirler. Plazma proteinlerine bağlanma oranı yaklaşık % 99’dur. Sistemik dolaşıma geçmesi %100 civarındadır.²¹ Diğer yan etkileri vertigo, sindirim sistemi rahatsızlıklarıdır.^{33,34}

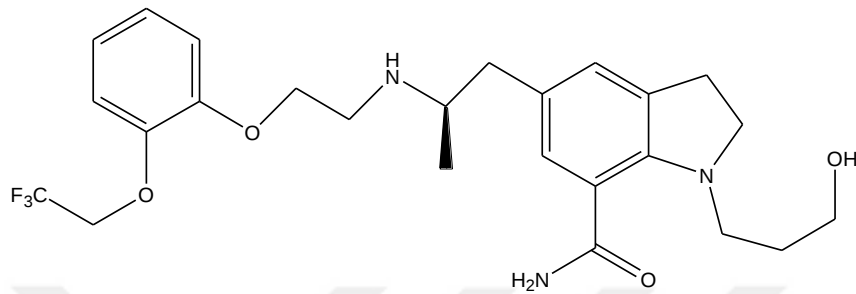
2.2. Silodosin

2.2.1. Silodosinin Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

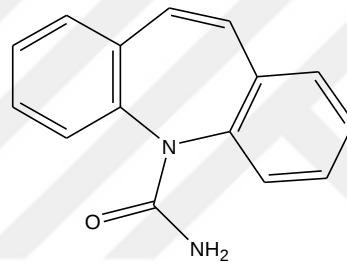
- Kaba formülü $C_{25}H_{32}F_3N_3O_4$ şeklindedir.
- Molekül ağırlığı 495.534 g/mol’dür.
- Suda çok az çözünür, asetik asit, metanol, etanol ve N,N-dimetilformadid’de

- Erime noktası 105-109 °C arasındadır.

Alfa 1 reseptör antagonisti olan silodosinin ve çalışmada internal standart olarak kullanılan karbamazepinin kimyasal yapısı sırası aşağıdaki gibidir.⁴



Şekil 2.1. Silodosinin kimyasal yapısı



Şekil 2.2.Karbamazepinin kimyasal yapısı

2.2.2. Silodosinin Farmakodinamik Özellikleri

Seçici α -1 reseptör antagonistidir ve prostat dokusuna yüksek seçiciliği vardır. Prostat düz kasının kasılmasını inhibe eder ve BPH ile ilişkili alt üriner sistem semptomlarını hafiflettiği kanıtlanmıştır. Silodosinin α_{1B} reseptörlerine afinitesi düşüktür.⁵

2.2.3. Silodosinin Farmakokinetik Özellikleri

Ağız yoluyla emilimi yüksektir ve doz arttıkça artmaktadır. Sistemik dolaşıma %32 civarında geçer. Yiyecekler plazmadaki maksimum konsantrasyonu %30 civarında azaltır. Plazmadaki maksimum konsantrasyonuna yaklaşık 2.5 saat sonra ulaşmaktadır. Yarılanma zamanı yaklaşık 11 saattir. Kan hücrelerine geçmeyerek plazma proteinlerine

yaklaşık %96 civarında bağlanma gösterir. Plazmadaki ana metaboliti glukuronid konjugatıdır. Eliminasyonu yaklaşık %33.5 idrardan, %59.9'u dışkıdan olur.⁵

2.2.4. Silodosinin Günlük Kullanım Dozu

Günde 8 mg'lık doz halinde 1 kapsül, özel hastalarda ise 4 mg'lık bir kapsül tavsiye edilir.⁵

2.2.5. Silodosinin Uygulama Yolları

Silodosin, BPH tedavisinin belirti ve semptomlarında hastaya ağızdan kapsül yoluyla uygulanabilir. Yiyeceklerle birlikte 1 bardak su ile aynı saatte alınmalıdır.⁵

2.2.6. Silodosinin Hamilelikte Kullanımı

Silodosin yalnızca erkek hastalar içindir.⁵

2.2.7. Silodosin Tayinine Yönelik Daha Önce Bildirilmiş Analitik Yöntemler

Zhao ve ark.³⁵ BPH hastalarının plazmalarında silodosin miktar tayini için LC-MS/MS yöntemini geliştirmişlerdir. Metil Tersiyer-Butil Eter kullanarak (MTBE) sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi ile 1ng/mL için %85.9, 10ng/mL için %84.6, 50 ng/mL için %86.1 geri kazanım sağlamışlardır. İnsan plazmasında yöntemin 0.5-50 ng/mL konsantrasyon aralığında doğrusal olduğunu, gün içi ve günler arası kesinlik değerlerinin ise %2 ile %7.3 arasında olduğunu, miktar tayin alt sınırı (LOQ) değerini ise 0.50 ng/mL olarak belirlemişlerdir.

Harischandran ve ark.³⁶ farmasötik preparatlarda silodosin miktar tayini için ters faz C₁₈ kolon ve PDA dedektör kullanarak Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemini geliştirmişlerdir. Mobil faz olarak pH 3.2 metanol, su, asetonitril ve glasiyel asetik asit (60:27:10:3, h/h) kullanmışlardır. 270 nm'de gerçekleştirdikleri analizlerinde silodosinin akış hızının 2 µL/dk ve gün içi-günler arası kesinlik değerinin %0.29 ile 1.53 arasında, LOD değerini 3 µg/mL, LOQ değerini ise 10 µg/mL olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca çalışmanın 10-100 µg/mL arasında doğrusal olduğunu

göstermişlerdir.

Aneesh ve ark.³⁷ ters faz HPLC-UV yöntemini farmasötik preparatlarda silodosin miktar tayini için geliştirmişlerdir. 269 nm dalga boyunda mobil faz olarak metanol, asetonitril, su (40:40:20, h/h/h) kullanarak, akış hızının 1.0 mL/dk olduğu çalışmalarının 10-60 µg/mL aralığında doğrusal olduğunu, LOQ değerinin 16.57 µg/mL, LOD değerinin 5.46 µg/mL, ortalama gün içi ve günler arası kesinlik değerlerinin 0.56 ve 0.73 olduğunu belirtmişlerdir. Silodosinin alıkonma zamanının 2.5 dakika olduğu çalışmalarında ortalama geri kazanım değerini %98.9 ile %100.2 arasında olduğunu bulmuşlardır.

Chinnalalaiah ve ark.³⁸ ters-faz C₈ kolon ve PDA dedektör kullanarak farmasötik preparatlarda silodosin miktar tayini için HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Enjeksiyon hacmi 10 µL, akış hızı 1 mL/dk ve kolon sıcaklığı 30 °C olan pH:4.5 amonyum asetat tamponu-asetonitril (50:50, h/h) hareketli faz kullanılarak gerçekleştirilen analiz sonucunda 40-120 µg/mL aralığında çalışmanın doğrusal olduğunu, alıkonma zamanının 2.8 dakika, ortalama geri kazanım değerini %99.04 olarak belirlemişlerdir.

Sayana ve ark.³⁹ farmasötik preparatlarda silodosini tayin etmek için Yüksek Performans İnce Tabaka Kromatografisi (HPTLC) yöntemini geliştirmişlerdir. 366 nm dalga boyunda floresans dedektör ile sabit faz 0.2 mm kalınlığında F₂₅₄ silika jel ile kaplı alimünyum plaklarda toluen, metanol, dietilamin (8:1:1, h/h/h) hareketli faz kullanarak gerçekleştirdikleri analizde LOQ ve LOD değerlerini sırasıyla 260 ng/mL ve 85 ng/mL, geri kazanım değerini ise %98.9 ile %100.2 aralığında belirlemişlerdir.

Rajasekaran ve ark.⁴⁰ farmasötik preparatlarda silodosini tayin etmede UV/ Görünür Bölge Spektrofotometri yöntemini geliştirmişlerdir. 5-50 µg/mL doğrusal aralığında, 269 nm dalga boyunda gerçekleştirilen analizde, çözücü olarak metanol kullanmışlar ve LOD değerini 0.5 µg/mL, LOQ değerini 1.55 µg/mL, geri kazanımı ise

%98.1 ile %101.8 arasında olduğunu belirlemişlerdir.

Goud ve ark.⁴¹ farmasötik preparatlarda silodosini tayin etmek için 219 nm dalga boyunda ters faz HPLC-UV yöntemini geliştirmişlerdir. Akış hızının 0.8 mL/dakika olduğu C₁₈ kolonda mobil faz olarak orto fosforik asit ile pH 3'e ayarlanmış fosfat tamponu ve asetonytril (40:60, h/h) kullanılmış ve silodosinin alıkonma zamanının 2.32 dakika olduğu çalışmalarının 50 ile 90 µg/mL aralığında doğrusal olduğunu, yöntemin geri kazanımının %100.1 olduğunu göstermişlerdir.

Mounika ve ark.⁴² farmasötik preparatlarda silodosin analizi için üç farklı UV-spektrofotometri yöntemini geliştirmişlerdir. Üç farklı yöntemde geri kazanımı karşılaştırmışlardır. 479 nm dalga boyunda 10-50 µg/mL doğrusal aralığında yapılan analizde geri kazanımı %102.37, 732 nm dalga boyunda 300-500 µg/mL doğrusal aralığında yapılan analizde geri kazanımı %128, 620 nm dalga boyunda 10-50 µg/mL doğrusal aralığında yapılan analizde geri kazanımı %102.9 olarak bulmuşlardır.

Jahan ve ark.⁴³ farmasötik preparatlarda silodosini tayin etmek için HPLC-UV yöntemini geliştirmişlerdir. C₁₈ kolon kullanarak gerçekleştirdikleri izokratik elüsyonlu analizde, hareketli faz olarak orto fosforik asit tamponu-metanol (60:40, h/h) kullanmışlardır. 269 nm'de, 1 mL/dk akış hızında alıkonma zamanını 1.583 dakika, yöntemin 10-30 µg/mL aralığında doğrusal olduğu ve geri kazanım değerini de %99.08 olarak belirlemişlerdir.

Shah ve ark.⁴⁴ katı dozaj formunda silodosin ve dutasteridi tayin etmek için ters faz HPLC-UV yöntemini geliştirmişlerdir. 40°C sıcaklıkta C₈ kolon ile 0 ile 5. dakika arasında 270 nm dalga boyunda, 5. dakika ile 10. dakika arasında 210 nm dalga boyunda yapılan analizlerinde 1 mL/dk akış hızında pH 3'de dipotasyum hidrojen fosfat tamponu-methanol asetonytril karışımı (50:50, h/h) (20:80, h/h) hareketli fazını kullanmışlar ve silodosinin 39.56-118.68 µg/mL çalışma aralığında doğrusal olduğunu

belirtmişlerdir. Silodosin için alıkonma zamanının 2.7 dakika olduğu çalışmalarında, silodosinin LOD ve LOQ değerlerini sırasıyla 9.58 µg/mL ve 95.8 µg/mL olarak, analiz yapılan bileşenlerin 36 saate kadar stabil olduğunu belirlemişlerdir.

Prachibhamre ve ark.⁴⁵ silodosinin farmasötik dozaj formlarında miktarını tayin etmek için spektrofotometri yöntemi geliştirmişlerdir. Metanolde çözünen silodosinin spektrofotometrede eksitasyon dalga boyu 272 nm, emisyon dalga boyu 450 nm olarak ölçülmüştür. Doğrusal aralığın 0.01-1 µg/mL olduğu analizde, LOD ve LOQ değerlerini 0.003 µg/mL ve 0.0091 µg/mL, geri kazanım değerini %98.53 ile %99.27 arasında belirlemişlerdir. Metanolde çözünen silodosin çözeltilerinin oda sıcaklığında 48 saate kadar, 5 °C sıcaklıkta buzdolabında 5 güne kadar stabil olduğunu belirtmişlerdir.

Jahan ve ark.⁴⁶ farmasötik formülasyonlarda silodosin miktar tayini için UV-Spektrofotometri yöntemini geliştirmişlerdir. Üç yöntem belirledikleri çalışmalarında birinci yöntemde silodosini metanolde çözüp 269 nm dalga boyunda doğrusal aralığı 10-50 µg/mL, geri kazanımı %100.28, LOD ve LOQ değerlerini 0.779 ve 2.36066 µg/mL olarak belirlemişlerdir. İkinci ve üçüncü yöntemler kompleks oluşturma reaksiyonlarına takiben oksidasyona dayanır ve silodosin 1,10-fenantroline ve 2,2'-bipiridil ile turuncu-kırmızı renkli bir kromojen oluşturmuştur. 507 nm dalga boyunda yapılan ikinci yöntem analizinde doğrusal aralık 2-10 µg/mL, geri kazanım %99.9, LOD ve LOQ değerleri 0.237 ve 0.71868 µg/mL olarak belirlenmiştir. Üçüncü yöntemde ise 518 nm dalga boyunda yapılan analizde doğrusal aralık 4-20 µg/mL, geri kazanım %100.02, LOD ve LOQ değerleri 0.0153 ve 0.614 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Devadasu ve ark.⁴⁷ kapsül formülasyonlarındaki silodosini tayin etmek için UV-Spektrofotometri ve ters faz HPLC-UV yöntemlerini geliştirmişlerdir. UV-Spektrofotometri ile iki yöntem geliştirilen analizde birinci yöntemde suda çözünen

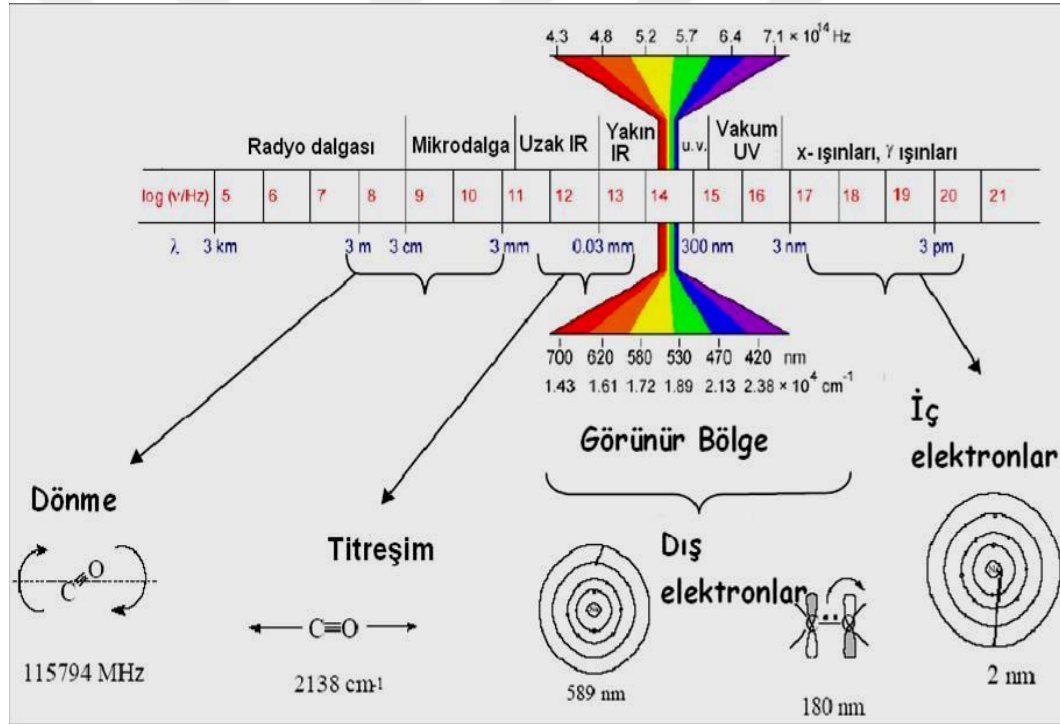
silodosinin 268 nm dalga boyunda, 10-60 µg/mL doğrusal aralığında geri kazanımı %99.75 olarak saptanmıştır. UV-Spektrofotometri ile yapılan ikinci yöntemde yine suda çözünen silodosinin 263-273 nm dalga boyu aralığında, 10-60 µg/mL doğrusal aralığında geri kazanımı %98.75 olarak elde edilmiştir. Ters faz HPLC-UV yönteminde C₁₈ kolon, hareketli faz olarak; pH 3.2’de fosfat tamponu-asetonitril (60:40, h/h) kullanmışlardır. 230 nm dalga boyunda, 1 mL/dk akış hızında, 4-20 µg/mL doğrusal aralığında yapılan analizde alıkonma zamanını 8.717 dakika, ortalama geri kazanım değerini %97.5 olarak belirlemişlerdir

Shaik ve ark.⁴⁸ silodosinin stabilite çalışması için Ultra Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (UHPLC) yöntemini geliştirmişlerdir. Hidroliz, oksidasyon, fotoliz ve termal bozulma gibi işlemlere maruz bırakılan silodosinin bu yöntemle stabilite testleri yapılmıştır. Kolon olarak C₁₈, gradient elüsyon ile gerçekleştirilen analizde hareketli faz olarak da asetonitril ve %0.1 trietil amin ile pH 6’ya ayarlanmış 10 mM amonyum asetat tamponu farklı oranlarda kullanılmıştır. 273 nm dalga boyunda PDA dedektör ile yapılan analizde akış hızı 0.7 mL/dk, enjeksiyon hacmi 10 µL olarak ayarlanmıştır.

2.3. Spektroskopik Yöntemler

Elektromagnetik ışının madde ile etkileşmesini inceleyen bilim dalına spektroskopi denir. Molekül yapılarının aydınlatılmasında organik ve inorganik bileşiklerin nitel, nicel analizlerinde, asit-baz denge sabitlerinin bulunmasında bu yöntemler tercih edilmektedir. Spektroskopi, elektromanyetik ışınların maddeler üzerine etkilerini inceleyen genel bir bilim dalıdır. Elektromanyetik ışınlar dalga ve parçacık yapısında bulunup uzayda çok büyük bir hızla hareket etmekte olup, pek çok yapıya girebilen bir enerji türüdür. Elektromanyetik ışının madde (atom ya da moleküller) tarafından soğurulmasına soğurma (absorpsiyon) spektroskopisi, yayılmasına ise yayılma (emisyon) spektroskopisi denir. Spektroskopik analizlerde maddelere dalga

boyu 110 nm'den 30000 nm'ye kadar çeşitli ışınlar gönderilir (Şekil 2.3). Tüm bu dalga boylarını gösterecek ve absorplanmanın hangi dalga boylarında olduğunu tespit edecek tek bir cihaz mevcut olmadığından, belirli dalga boyları aralığında çalışan cihazlar geliştirilmiştir. 110-1000 nm dalga boylarındaki ışınlarla çalışan cihazlara ultraviyole ve görünür alan, 2500-30000 nm dalga boylarında çalışan cihazlara infrared ve dalga boyları yüzlerce metreye kadar değişen radyo dalgalarıyla çalışan cihazlara da nükleer manyetik rezonans cihazları denir. Bu cihazların geçerli oldukları alan spektroskopilerine de sırasıyla Ultraviyole-Görünür Bölge (UV-Visible), Infrared (IR titreşim) ve Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektroskopileri adı verilir.^{49,50}



Şekil 2.3. Elektromanyetik ışınların sistematik olarak tanımlanması⁵¹

2.3.1. Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi

Atomların en dış tabaka elektronlarının uyarılması ile ilgilenen spektroskopi dalına atomik absorpsiyon spektroskopisi denir. Atomlarda, iç tabaka elektronları uyarılamadığı halde, dış tabaka elektronları ultraviyole ve görünür bölge ışınlarla uyarılır. İç tabaka elektronlarını uyarabilmek için X-Işınları kullanılır. X-Işınları

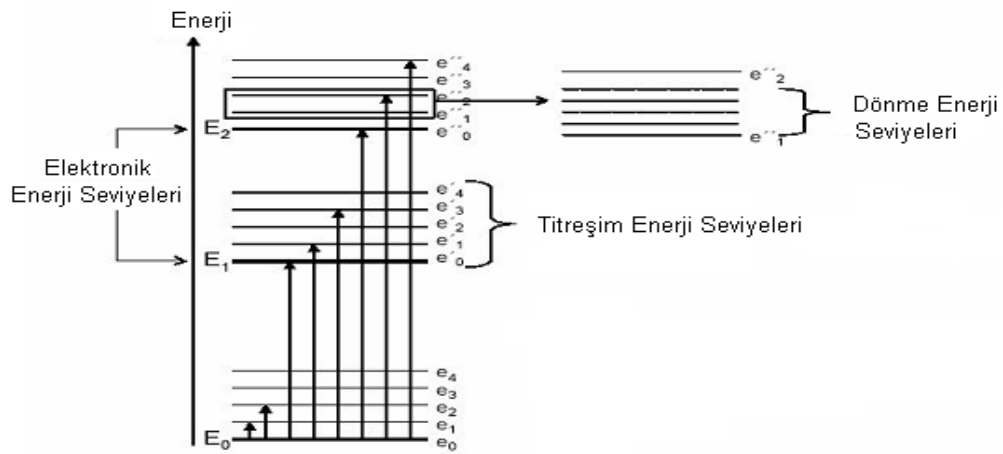
görünür bölge ışınlarından daha fazla enerjilidirler.^{50,52}

2.3.2. Moleküler Absorpsiyon Spektroskopisi

Moleküler Absorbans, UV ve görünür ışınları, düşük enerjili atomik ve moleküler orbitallerdeki elektronlarını, daha yüksek enerjili orbitallere çıkarılması sonucunda gerçekleşir. Moleküller, UV, görünür ve infrared ışınları ile uyarıldıkları zaman, kuantlaşmış 3 tip geçiş vardır. Bunlar elektronik geçişler ve ışın ile oluşturulabilen titreşim ve dönme geçişleridir (Şekil 2.4). Bir molekülün toplam enerjisi E_T ;

$$E_T = E_{\text{elektronik}} + E_{\text{titreşim}} + E_{\text{dönme}}$$

olarak gösterilir. Elektronik geçiş enerjisi; molekülün çeşitli dış orbitallerindeki elektronlarla, titreşim enerjisi; atomlar arası titreşimlerle, dönme enerjisi ise molekül ağırlık merkezi etrafında dönmesi ile ilişkili enerji olarak ifade edilir.^{50,52}



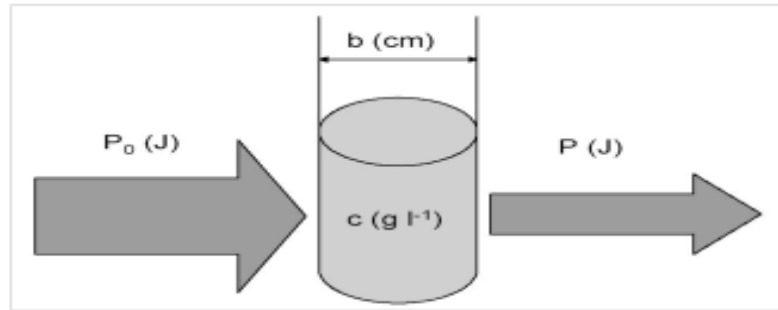
Şekil 2.4. Moleküler elektronik, titreşim ve dönme enerji seviyelerini gösteren enerji diyagramı⁵⁰

Moleküler absorpsiyon spektroskopisinin, atomik absorpsiyon spektroskopisinden ayrılan en üstün özelliği; atomik absorpsiyon spektroskopisinde birbirinden farklı dalga boylarında keskin çizgiler meydana gelirken, moleküler absorpsiyon spektroskopisinde, birçok dalga boylarını içine alan geniş absorpsiyon bantlarının meydana gelir.

2.3.3. Işığın Absorplanması ve Lambert-Beer Yasası

Çeşitli dalga boylarında ışın içeren bir demet, saydam ve şeffaf bir ortamdan geçirildiği zaman, içinden bazı dalga boyları kaybolur. Bu ışının absorplanması olarak ifade edilir. Enerjiyi absorplayan molekül, atom veya iyonlar uyarılırlar.

Uyarılan bir atom veya molekül 10^{-8} saniye varlığını sürdürebilir. Sonra enerjiyi geri vererek temel durumuna geçer. Absorplanan ışın enerjisinin madde tarafından geri verilmesi, genellikle ısı yayılması ile olur ve madde az çok ısınır. Bazı maddelerde ise absorplanan ışın enerjisi daha uzun dalga boylu ışınlar halinde yayılır. Buna fotoluminesans olayı denir. Bu olayın çok kısa süreli olanına floresans, daha uzun süreli olanına fosforesans adı verilir. Her maddenin kendine özgü bir absorpsiyon spektrumu vardır ve maddenin temel haliyle uyarılmış halleri arasındaki enerji farkları başka bir maddeninkinden farklıdır. Absorpsiyon spektrumları; atomik absorpsiyon spektrumları ve moleküler absorpsiyon spektrumları olmak üzere iki bölüme ayrılır.⁵²



Şekil 2.5. P_0 şiddetindeki ışın demetinin absorplandıktan sonra P şiddetinde çıkması⁵²

Monokromatik (tek dalgaboylu ışın) ve P_0 şiddetindeki bir ışın demeti, kalınlığı b cm olan bir küvette bulunan çözelti tarafından absorplandığında şiddeti azalma gösterir ve P şiddetinde ortamdan çıkar (Şekil 2.5). Buna göre ışın demetinin ortamdan geçme oranına geçirgenlik (T) denir.^{49,50,52}

$$T = P / P_0$$

şeklinde belirtilir. Geçirgenlik, genellikle yüzde olarak verilir:

$$\%T = P / P_o \cdot 100$$

Geçirgenliğin eksi logaritması absorptans (A) olarak isimlendirilir ve absorptans

$$A = -\log_x T = -\log P / P_o$$

şeklinde formüle edilir.

Moleküllerin seçilen dalgaboyundaki ışınmayı absorptlaması sonucu ortaya çıkan azalma Lambert-Beer eşitliği ile verilir.^{49,50,52}

$$A = \log P_o / P = \epsilon \cdot b \cdot C$$

ϵ : Molar absorptivite katsayısı, C: Konsantrasyon (mol/L)

2.3.4. Ultraviyole-Görünür Bölge Spektrofotometreleri

Spektrofotometre, elektromanyetik ışının dalga boyunun bir fonksiyonu olarak numunenin absorptans veya geçirgenliğini ölçmek için kullanılan bir cihazdır. Spektrofotometrenin bileşenleri ışık kaynağı, monokromatör, örnek kabı ve dedektördür (Şekil 2.6). Ultraviyole-Görünür Bölge spektrofotometrelerinin çalışma aralığı 110 nm'den 1000 nm arasında değişen dalga boylarındadır. Ancak 110 nm ile 200 nm dalga boyu aralığında çalışan spektrofotometreler vakumlu ve fiyatı yüksek cihazlardır. Bu nedenler yüzünden laboratuvarlarda kullanılan spektrofotometreler 200 nm ile 1000 nm dalga boyu aralığında çalışmaktadırlar. Spektrofotometrelerde elektromanyetik ışın kaynağı olarak 180-400 nm aralığında çalışmak üzere döteryum ve 400-2500 nm aralığında çalışmak üzere tungsten olmak üzere iki lamba modeli bulunmaktadır.^{49,50,52} Sıvı analiz örnekleri için 200-320 nm dalga boyu aralığında kuartz, 320-700 nm aralığındaki bölgede ise cam küvetler tercih edilir. Örneğin ışığı geçirgenliği dedektör ile ölçülür. UV ve görünür bölgede kullanılan dedektörler fotovoltajik veya fotoiletken dedektörler, fototüpler ve fotoçoğaltıcı tüplerdir. Spektrofotometrelerde ışığı toplayıp, yansıtıp, bölmek maksadıyla mercekler, aynalar, ışık bölücüleri de kullanılır.



Şekil 2.6. Spektrofotometre cihazının basit bir şematik gösterimi⁵³

2.3.5. UV-Görünür Bölge Spektrofotometre Cihazının Kullanım Amaçları

a) Kalitatif Analiz: Bilinmeyen bir madde saf hale getirildikten sonra UV spektrumu ölçülür. Bu spektrum, her açıdan aynen daha önce ölçülmüş olan spektrumlarla karşılaştırılır. Bilinmeyen maddenin spektrumu daha önceden belirlenmiş madde spektrumlarından hangisi ile aynıysa, bilinmeyen madde o maddedir. Bundan başka bilinen bir maddenin saf olup olmadığı bilinmiyorsa, maddenin spektrumu alınır. Spektrumda beklemediğimiz piklerin var olması maddenin saf olmadığını gösterir. Ayrıca, UV ışınlarla yapılan spektrofotometrik analizlerde benzer kromofor grupların kalitatif tayininde de yararlı olmaktadır. Kompleks yapılı organik moleküllerin bile, fonksiyonel gruplar dışında kalan bölümleri, 180 nm'den daha uzun dalga boylarına karşı geçirgenlik göstermektedir. Onun için, 200-400 nm aralığında bir veya daha fazla sayıda pik izleniyorsa bu, molekülde doymamış grupların veya kükürt, halojen gibi hetero atomların mevcut olduğu hakkında fikir verir. Genellikle analiz yapılan örneğin spektrumu, çok sayıda kromofor grup bulunan ve yapısı daha önce tayin edilen başka bir molekülün spektrumu ile karşılaştırılarak, analitteki fonksiyonel grup hakkında bir fikir sahibi olunabilir. Ama analiz yapılan örneğin kesin yapısını anlamak gerekli olan detaylı bilgileri, ultraviyole spektrumlarında göremeyiz. Bu yüzden, ultraviyole spektrumlarından elde edilen kalitatif bilgiler, NMR, MS gibi diğer yöntemlerle desteklenmeli mümkünse çözünürlük, erime ve donma noktaları gibi verilerle birleştirilmelidir. Genellikle analiz yapılan örneğin seyreltik çözeltileri kullanılarak kalitatif analiz hedefli ultraviyole spektrumlar elde edilir. Uçucu bileşiklerin gaz

halindeki spektrumları alınabilirse, daha detaylı ve faydalı spektrumlar elde edilir. UV-Görünür Bölge spektroskopisinde kullanılacak çözücünün bu bölgedeki ışınlar için geçirgen olması ve örneği, net pikler gösterebilecek konsantrasyonlarda çözmesi gerekmektedir. Çözücü ile absorpsiyon yapan tür arasındaki olabilecek etkileşimleri de düşünmek gerekir. Örneğin, su, alkol, ester ve keton gibi polar çözücüler, spektrumdaki titreşim detaylarını örtme etkisi gösterirler. Polar çözücüler, hem spektrumun titreşimleri yüzünden küçük piklerin yok olmasına, hem de absorpsiyon bandlarının ve piklerin esas yerlerinden kaymasına sebebiyet verirler.⁵⁰

b) Kantitatif Analiz: Ultraviyole ve Görünür Bölge absorpsiyon spektroskopisi, araştırmacıların kantitatif analizlerde en çok kullandıkları tekniklerden bir tanesidir. Kantitatif analizde, ilk önce analizi yapılacak numunenin maksimum absorbans yaptığı dalga boyunda spektrumu alınır. Belirlenen dalga boyu sabit tutularak, artan konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerin absorbansları okunur. Konsantrasyona karşı absorbans grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi oluşturulur. Sonra bilinmeyen maddenin konsantrasyon kalibrasyon eğrisi ile bulunur ve seçilen sabit dalga boyunda absorbtivite katsayısı da belirlenmeye çalışılır.⁵⁰

2.4. Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, kompleks karışımlar içinde olup birbirine benzeyen bileşenlerin ayrılmasında, belirlenmesinde ve tayininde genel olarak kullanılan analitik yöntemler topluluğudur.^{49,50,52-55} Kromatografik yöntemler uygulamada en yaygın kullanılan yöntemlerdendir.

Kromatografik ayrımlarda taşınma işlemi sıvı veya gaz hareketli fazın sabit faz üzerinden geçirilmesiyle gerçekleşir. Taşınma sırasında numuneyi oluşturan maddelerin farklı göç hızlarına bağlı olarak ayırma işlemi yapılır. Kromatografik ayırma işleminde seçilen sabit faz ile hareketli fazın birbiri ile karışmaması gerekir. Genel ifade ile; bir

karışımındaki bileşenlerin belirli bir hareketli faz yardımıyla yüzey adsorpsiyonu, dağılma, iyon değiştirme ve boyut eleme özelliklerine bağlı olarak, sabit faz üzerinden ayrılmasına kromatografi denir.^{50,55}

2.4.1. Kromatografik Yöntemlerinin Sınıflandırılması

Kromatografi; sabit faz, hareketli faz ve ayırma yöntemlerine göre değişik şekillerde sınıflarına ayrılır.^{50,55} Bunlar:

A-Teorik Sınıflandırma

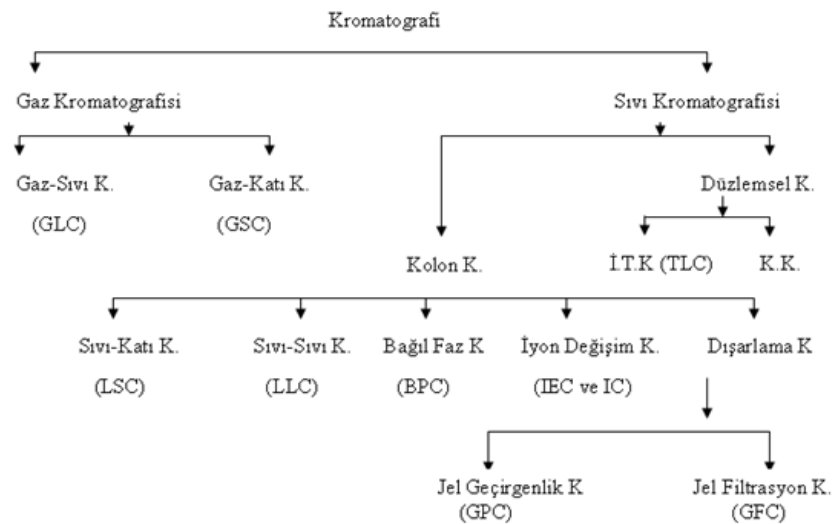
- Dağılma Kromatografisi
- Adsorpsiyon Kromatografisi
- Boyut Eleme Kromatografisi
- İyon Değişim Kromatografisi

B- Pratik Sınıflandırma

- Düzlemsel Kromatografi (Kağıt ve İnce Tabaka Kromatografisi)
- Kolon Kromatografisi (Gaz, Sıvı ve Süper Akışkan Sıvı Kromatografisi)

C- Hareketli ve Sabit Fazlara Göre Sınıflandırma

Kromatografinin hareketli ve sabit fazlara göre sınıflandırması Şekil 2.7’de gösterilmektedir.



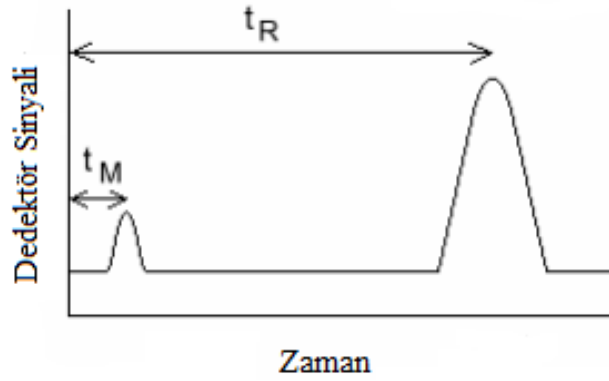
Şekil 2.7. Kromatografinin hareketli ve sabit faza göre sınıflandırılması⁵⁰

2.4.2. Kromatografinin Dayandığı Temel Olaylar

Kromatografide tanımlanan denge, analiz yapılan örneğin hareketli ve sabit faz arasındaki etkileşimi kapsayan aşağıdaki eşitlikle gösterilir.

$$A_{\text{hareketli}} \leftrightarrow A_{\text{sabit}} \quad K = C_{\text{sabit}}/C_{\text{hareketli}}$$

Analiz yapılan örneğin sabit faz içindeki molar konsantrasyonun, hareketli faz içindeki molar konsantrasyon oranına K denge sabiti denir. Partisyon oranı veya dağılma katsayısı olarak da ifade edilir. Analizi yapılan örneğin piki için, numunenin sisteme enjeksiyonundan sonra dedektöre ulaşması için gereken zamana da alıkonma zamanı denir ve t_R ile gösterilir (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Tek bileşenli bir bileşik için kromatogram⁵⁰

Genellikle analit veya hareketli faz tutunmayan bir pik gösterir. Tutunmayan maddenin enjeksiyondan sonra dedektöre ulaşması için geçen zaman ölü zaman olarak ifade edilir ve t_m ile gösterilir. Analiz yapılan örneğin göç etme hızı: (kolon dolgu uzunluğu/ ölü zaman) olarak formülize edilir. Kolon üzerindeki analiz yapılan örneğin göç hızını ifade etmek için kapasite faktörü (k_A) kullanılır.

k_A : [(analitin alıkonma zamanı-ölü zaman)/ ölü zaman] eşitliği ile gösterilir.

İdeal bir ayırım için kapasite faktör değeri 1 ile 5 arasında olmalıdır.

Karışım halindeki maddelerin ayrılmasında etkin olan dört ayrı kromatografi mekanizması vardır.^{49,50,53,55}

2.4.3. Dağılma Kromatografisi

En yaygın kullanılan sıvı kromatografi türüdür. Dağılma, çözünen maddenin hareketli faz ile katı faz üzerinde adsorplanmış sıvı fazdaki çözünürlüğüne veya hareketli faz gaz ise uçuculuğu esasına dayanır. Sıvı-sıvı ve bağlı-sıvı faz kromatografisi olarak iki tipi mevcuttur. Destek katısına sabit fazın tutunmasına bağlı olarak bu iki yöntem ayrılır. Sıvı-sıvı kromatografisinde, sıvı faz dolgu maddesinin yüzeyine fiziksel kuvvetlerle sabitlenmiştir. Bağlı-sıvı faz kromatografisinde ise katı destek yüzeye bağlı organik sıvılar kimyasal olarak tutturulmuştur. Hareketli ve sabit fazların bağl polarlıklarına göre dağılma kromatografisi ikiye ayrılmaktadır. Normal faz kromatografisinde sabit faz oldukça polar ve hareketli fazda apolardır, ters faz kromatografisinde sabit faz apolar (çoğunlukla hidrokarbon) hareketli faz nispeten polardır (su, asetonitril, metanol).^{49,50,55}

2.4.4. Adsorpsiyon Kromatografisi

Karışım halindeki örneklerin katı destek üzerinde farklı kuvvetlerde tutunması esasına göre birbirlerinden ayrılabilirdikleri kromatografi tipidir. Yüzey veya kolon boyunca çözünen maddenin hareketinin hızı çözücü ve katı sabit fazın polarlıklarına göre değişir.^{49,50,55}

2.4.5. İyon Değiştirme Kromatografisi

Bir katının yapısındaki iyonları, içinde bulunduğu çözelti içindeki aynı cinsten yüklü başka iyonlarla bir dengeye göre değiştirmesi özelliğine dayanır. Çözeltide çözünmeyen büyük moleküllü doğal veya sentetik katı maddeler bu maksatla kullanılır. Organik iyon değiştiriciler (diğer adıyla reçineler) suda ve birçok organik çözücüde çözünmeyen, çok sayıda anyon ve katyon ihtiva eden büyük moleküllü maddelerdir. Bunlar anyon ve katyon değiştirmede ve selektif iyon değiştirmede kullanılır. İnorganik

iyon deęiřtiricilerde en çok bilineni zeolitlerdir. Bunlar genel olarak; $\text{Na}_2 \text{Al}_2 \text{Si}_4 \text{O}_{12}$ 'dir.

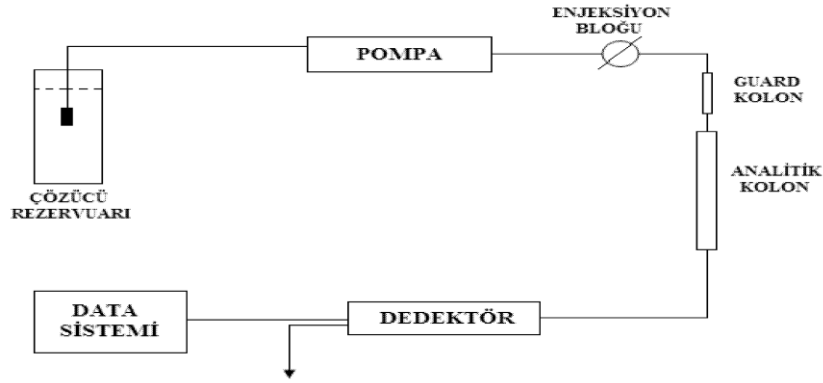
İyon değiştirme kromatografisi, ilaçlar, serumlar, gıda katkı maddeleri, vitamin kompleksleri, tatlandırıcılar ve farmasötik preparatlar gibi birçok farklı organik ve biyolojik sistemlere uygulanabilmektedir.^{49,50,55}

2.4.6. Boyut-Elleme Kromatografisi

Jel-geçirgenlik veya Jel-süzme kromatografisi adı ile de bilinen boyut-eleme kromatografisi, özellikle yüksek molekül ağırlıklı maddelere uygulanabilen bir yöntemdir. Bu kromatografi türü için dolgu maddeleri, çözünen madde ve çözücü moleküllerinin içine difüzlenebileceği düzgün bir gözenek ağı içeren küçük boyutlu silis veya polimer taneciklerinden oluşmuştur. Porlar içerisinde küçük moleküller tutulabilmekte, büyük moleküllerde gözenek dışında kaldığından dolayı hareketli faz sürüklenmesi ile kolondan kolaylıkla ayrılmaktadır. Bundan sonra gözeneklerde tutulan küçük moleküller de hareketli faz ile yüzeyden kolaylıkla ayrılabilir. ^{49,50,55}

2.4.7. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Yüksek basınç altında küçük dolgu maddeleri dolu ile bir kolonda yapılan bir kromatografi türüdür. Sıvı olan hareketli fazın, karışımı sabit faz üzerinden bir kolondan belirli bir basınç uygulanarak sürükleyip ayırdığı kromatografik sistemlerdir. Yüksek performans sıvı kromatografisi, dağılma kromatografisi, adsorbsiyon kromatografisi, iyon kromatografisi, jel kromatografisi olmak üzere dört bölümde incelenir.⁵⁰ Yüksek performans sıvı kromatografisi en çok tercih edilen analitik ayırma yöntemlerindendir. Hassaslık, birçok maddeye uygulanabilme, yüksek doğruluk ve kesinlik bu yöntemin avantajlarındandır. HPLC cihazı pompa, örnek giriş sistemi (enjeksiyon bloğu), kolon, dedektör ve kaydediciden (data sistemi) oluşur (şekil 2.9).



Şekil 2.9. HPLC cihazının şematik gösterimi⁵⁰

a) Pompalar: Pompalar sıkıca doldurulmuş kolon içinden hareketli fazın akışınından sorumlu bölümlerdir. Sabit basınçlı ve sabit akışlı pompalar olmak üzere iki tipi mevcuttur. Sabit basınçlı pompalarda; hareketli faz bir haznede bulunur ve bu hazne azot gibi eylemsiz bir gaz yardımıyla basınç altında tutulur, bu basınç hareketli fazın akışını sağlar. Sabit akışlı pompalar; Herhangi bir nedenle sistemin geçirgenliği bozulursa veya çözücünün viskozitesi değişirse oluşan iç basınç değişikliği, motorla sağlanan basınç değişikliği ile kapatılır.^{49,50,55}

HPLC cihazlarında, hareketli fazın kolon ve dedektör'den geçmesini sağlayan pompa sistemleri aşağıdaki özellikleri taşımalıdır.

- 1-6000 psi kadar basınç üretmek
- 2-Pulse-free çıkış vermek
- 3-0.1-10 mL/dk aralığında akış hızı düzenlemek
- 4-% 0.5 ve daha iyi akış tekrarlanabilirliği sağlamak
- 5-Korozyona dayanıklı parçalara (paslanmaz çelik, teflon) sahip olmak

b) Örnek Giriş Sistemi (Enjeksiyon Bloğu): Valf enjektörler ve şırınga enjektörler olmak üzere iki tip enjeksiyon vardır. Valf enjektörler, paslanmaz çelikten yapılmış boru şeklindeki bir üniteye bağlanan ve açılıp kapanabilen valflardan ibaret olup küçük bir boru ile kolon başına bağlanmıştır. Valf yükleme durumunda iken örnek

loop içine verilir. Aynı anda hareketli faz, valf içindeki ayrı bir bölümden kolona akar. Valf, enjekt durumuna getirildiği zaman loop pompa ve kolon arasındaki akışa bağlanmış olur. Şırınga enjektörler, enjeksiyon aleti doğrudan doğruya kolon başına bağlanmıştır. Kolon başında 5-10 mm derinliğinde bir bölüm bulunmakta ve bu bölüme cam tanecikleri doldurmaktadır. Kolonun dolgu materyali ile bu cam tanecikler arasında paslanmaz çelikten yapılmış bir ağ vardır. Örnek, cam tanecik tabakası içine bir şırınga iğnesi ile verilir. Şırınga enjeksiyon ya pompayı kapatıp akışı durdurduktan sonra örneği vermek ve sonra tekrar pompayı açarak hareketli fazın akışını sağlamak ya da akışı durdurmadan örneği kauçuk bir bölmeden (septum) kolona enjekte etmek suretiyle yürütülür. Valf enjektörlerden daha iyi kolon etkinliği verir.^{49,50,55}

c) Kolonlar: Paslanmaz çelikten ve plastikten yapılabilen kolon, sistemin önemli parçasıdır. Kolonlar 5-150 cm uzunluğunda ve iç çapları 8-11 mm arasında değişmektedir. Dolgu maddesi taneciklerinin çapı ise 5-10 µm ile 35-125 µm arasındadır ve sistemin performansını büyük oranda etkiler. Mikropartiküllü ve tamamen gözenekli dolgulara sahip kolonların en bilinenleri 10-30 cm uzunluktadır. Retensiyon zamanını azaltacağından dolayı kısa kolonlarla çalışmak hızlı analizlerde daha avantajlıdır. Son yıllarda üretilen yüksek performanslı kolonlar 2.1 mm iç çapında ve yaklaşık 100 mm ve üstü uzunluğunda olan dar çaplı kolonlardır. Kolonların çapları preparatif analizlerde genişlik göstermektedir. Ayırabildikleri maksimum madde miktarına göre kolonların sınıflandırılması aşağıdaki gibidir (Tablo.2.1)

Tablo 2.1. Ayırabildikleri maksimum madde miktarına göre kolonlar

Kolon Tipi	Çapı (mm)	Uzunluk (cm)	Örnek miktarı (mg)	AkışHızı (mL/dk)
Mikrobor Analitik	1-2	7-30	0.01	0.1
Standart Analitik	3-5	7-30	0.1	1.0
Preparatif	5-20	25-50	1.0	10.0

Üretici firmanın kolon için belirlediği çalışma prensipleri kolonlar kullanılmadan önce okunmalıdır. Kolonun verimliliği ve ömrü için maksimum basınç, optimum akış hızı ve uygun pH gibi parametreler göz önüne alınmalıdır.

Fiyatı yüksek kolonları daha uzun süre kullanmak için iki tane koruyucu kolon tipi vardır. Bunların ilki ön kolondur (precolumn). Silika içerir ve pompa ile enjektör arasında bulunur. Hareketli fazın bu kolondan geçirilir ve silika ile doyurulan hareketli faz analitik kolon içindeki dolgu materyalinin hareketli fazdaki çözünürlüğünü engeller. İkinci kolon enjektör ile analitik kolon arasında bulunan ve 2-10 cm uzunluğundaki analitik kolona eşit iç çap ile koruyucu kolon (guard column) dur. Bu kolon, örnek içindeki kirlilik ve safsızlıkları tutarak bunların analitik kolondaki dolgu materyaline bağlanmasına mani olmaktadır.^{49,50,55}

d) Dedektörler: Dedektörler, kolondan çıkan elüatın içindeki maddeleri tespit etmeye yarayan bölümlerdir. Üniversal ve seçici olmak üzere iki tipe ayrılırlar. Seçici tiplerden floresans dedektörler, ED dedektörler, UV-Görünür Bölge dedektörler, diod array dedektörler, üniversal detektörlerden de reflaktif indeks dedektörleri analizlerde çok kullanılan dedektörlerdir. Üniversal dedektörler, kolondan çıkan elüatların hemen hemen hepsine karşı duyarlı olabilen tiplerdendir. Bu dedektörlerden başka kondüktivite, radyoaktivite, fotokondüktivite, İnfrared (IR) ve kütle dedektörleri gibi dedektör tipleri de vardır.^{49,50,55}

2.4.8. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinin Uygulama Alanları

a) Kimyasal Ayırma: Belirli bir bileşiğin, hareketli faz yardımıyla sabit faz üzerinde sürüklenip ayrılması temeline dayanır. Kiral bazlı ayırımları da yapılabilir.^{49,50,55}

b) Saflaştırma: Hedef bir maddenin, diğer maddelerden ya da kirliliklerden ayrılmasıdır. Yeterli ayırmanın sağlanabilmesi için uygun hareketli ve sabit faz tercihi göz önünde bulundurulmalıdır.^{49,50,55}

c) Kalitatif Analiz: HPLC ile herhangi bir maddenin tespiti için, dedektör seçimi çok önemlidir. Bu amaç için geliştirilmiş birçok çeşit dedektör mevcuttur. Ayırma işlemi yapılırken en çok dikkat edilmesi gereken husus, bilinen bir örneğin verdiği pikin kesin olarak saptanmış olmasıdır. Ancak net bir sonuç almak için, birkaç yöntemin karşılaştırmalı olarak denenmesi gerekir.^{49,50,55}

d) Kantitatif Analiz: HPLC ile miktar analizi, bilinmeyen bir konsantrasyondaki maddenin, bilinen bir çözelti içinde tanımlanması ile olur ve analiz için, bir seri standart çözeltinin, HPLC'ye verilmesi gerekir. Bilinen bu çözeltilerin kromatografileri sonucu elde edilen pikler, istenen bileşiğin konsantrasyonunun bulunmasında fayda sağlayacaktır.^{49,50,55}

2.5. LC-MS/MS

LC-MS/MS, sıvı kromatografisinin fiziksel ayırma özellikleri ile kütle analizine olanak tanıyan MS yönteminin birleştirilmesiyle oluşturulmuştur. LC-MS/MS yüksek seçicilik ve hassasiyete sahip bir analitik tekniktir. İyonlaştırılıp primer parçalanmış moleküller ilk quadrupol hücrede m/z (kütle/yük) oranına göre ayrılır. Sadece analizi istenen iyon filtreden geçer. Filtreden geçen moleküller iyonlar collision gazı adı verilen azot gazı ile parçalanır. İkinci quadrupol filtrede parçalanmış iyonlardan içinden seçilen ikincil iyon detektöre ulaştıktan sonra analizi yapılır.⁵⁶ Genellikle belli bir karışım içerisinde istenen bir kimyasal maddenin miktarını belirlemek için kullanılır. Kütle spektroskopisinde single quadrupole, triple quadrupole, ion trap, TOF ve Q-TOF gibi farklı kütle analizörleri kullanılmaktadır.

İyon optik bölümü: İyonların cam kapilerden sonra odaklanarak Quadrupollere

aktif şekilde girişini sağlar.

Kuadrupoller seçici filtrelerdir. İstenilen iyonların ilerlemesini sağlar. LC-MS/MS de iki adet kuadrupole bulunur⁵⁶.

Parçalama hücresi iki kuadrupolun ortasında bulunur. İlk kuadrupole gelen iyonlar parçalama hücresinde yüksek saflıktaki azot gazına çarptırılarak parçalanıp ikinci kuadrupole girer⁵⁶.

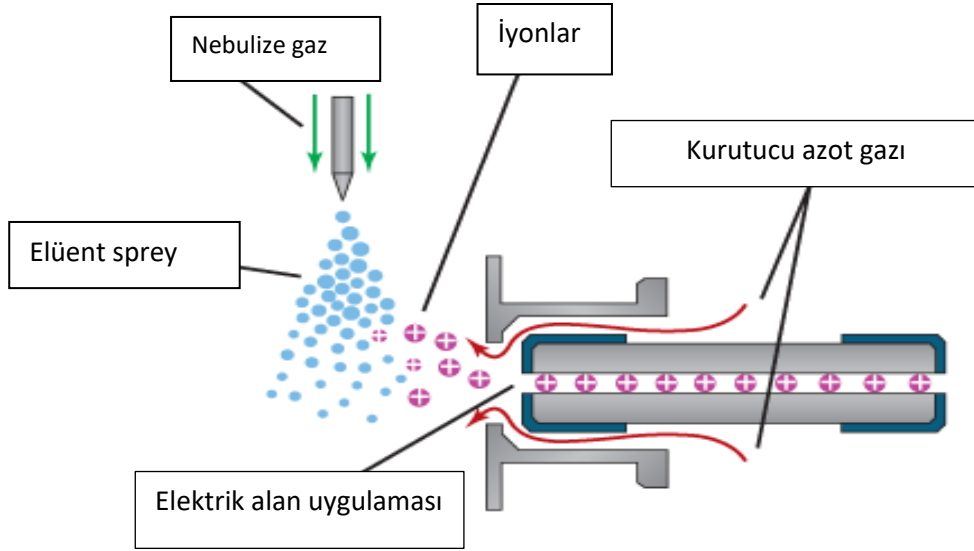
İkinci Kuadrupole gelen iyonlar seçilerek dedektöre gönderilir⁶¹.

Dedektör: Kuadrupollerde seçilen iyonlar elektronlara dönüştürülerek dedektörde okunur. Pozitif modda gelen pozitif iyonlar dedektöre düşürülerek (10 kV) elektronlar fırlatılır. Elektronlar sapıtılarak elektron çoğaltıcıya gönderilir. Ölçülen akım sinyale dönüştürülür. Negatif modda gelen negatif iyonlar dedektöre düşer fırlayan pozitif iyonlar tekrar elektronlara çevrilerek elektron çoğaltıcıya gönderilir.

LC/MS-MS sisteminde 4 farklı iyonizasyon tekniği bulunmaktadır.

1. Doğrudan sıvı girişi (Direct liquid introduction) (DLI)
2. Termosprey (TS)
3. Atmosferik basınç kimyasal iyonlaştırma (APCI)
4. Elektropsrey iyonlaştırma (ESI)

Analizimizde elektropsrey iyonizasyon (ESI) kullanıldı. Analizi yapılan madde, sıvı kromatografiden gelen çözücü ile birlikte püskürtülür, bu esnada ısıtılmış kurutucu gaz ve güçlü bir elektrik alan uygulaması ile kütle dedektörüne girmeden önce iyonlaşır⁵⁷.



Şekil 2.10. ESI LC-MS/MS⁵⁶

Elektrosprey arayüzü (ES) genelde polar yapılı, kolay iyonlaşabilen ve kolay parçalanabilen maddeler için iyi bir tercihtir. Parçalanma tekniği basittir ve parçalanma çok az miktarda olur.⁵⁸

Kütle/iyon (m/z) oranı aynı olan pek çok molekül bulunmaktadır. Ama aynı parçalanma iyonuna sahip molekül 1/10000 oranındadır. Bu sebeple LC-MS/MS analite spesifik bir tekniktir. LC-MS/MS ile çok düşük konsantrasyonlarda miktar tayini yapmak bu tekniğin avantajlarından.⁵⁹

Standart HPLC tekniğinde madde sadece alıkonma süresine (t_R) göre değerlendirilirken LC-MS/MS birincil ve ikincil iyonlarla (moleküler iyon ve ürün iyon) değerlendirilmektedir.⁵⁹

Madde enjeksiyon yapıldıktan sonra guard (koruyucu) kolondan geçerek analitik ayırmanın gerçekleştirileceği kolona, mobil faz ile beraber geçer. Kolonda elüsyon gerçekleştiği sırada maddeler sabit faza olan afinitelere göre ayırım işlemi gerçekleşir. Doğru mobil faz seçimi piklerin birbirinden ayrılmasını sağlar. Polarite, pH ve molekül yapısı ayırımın istenilen seviyede olmasını sağlayan faktörlerdir. Mobil fazlar degaze edilerek kolona hava girişi bloke edilir.⁵⁹

“Örnek, kuadropollerden geçerek parçalanmak üzere MS’e girer. Bir kuadropol, bir kare düzlem boyunca sıralanmış 4 paralel çubuktan oluşur. Analit iyonları kuadropolün oluşturduğu karenin içine yönlenir. Çubukların ortasında elektromanyetik alan üretmek üzere çubuklara voltajlar uygulanır. Bu elektromanyetik alanlar verilen bir zaman aralığında, hangi m/z oranına sahip iyonların filtreden geçeceğini belirler. Kuadropoller, en basit ve en az pahalı kütle analizörleridir.”⁵⁹

“Multiple-stage MS’lerde; kapiler boruya, (Q_0) giren örnek, burada parçalanır, birinci kuadropol (Q_1) öncül iyonu (örn: $[M+H]^+$) seçmek için kullanılır. İkinci parçalanma, CID, çarpışma hücresi denilen (Q_2) de gerçekleşir. Q_2 , argon gazıyla dolu bir odada radyofrekanslı bir çarpışma odacığdır. Q_2 , seçilen öncül iyondan farklı parçalar elde edildiği hücredir. Q_3 sadece tek bir ikincil iyonu filtre eder. Sadece bu iyon detektöre ulaşır ve bu iyondan hem nicel tayin, hem de öncül iyondan oluşan ikincil iyon gözlenerek nitel tayin gerçekleştirilebilir. Birincil parçalanmadan elde edilen öncül iyonun ikinci kez parçalanması ve bu parçalanmadan elde edilen o analite özgü karakteristik iyonun izlenmesi işlemine MRM (Çoklu Reaksiyon İzleme) denir. MRM işleminin duyarlılığı, oluşan ikincil iyonun miktarını belirler. Q_3 ’ten detektöre gelen iyonlar sayılır.”⁵⁹

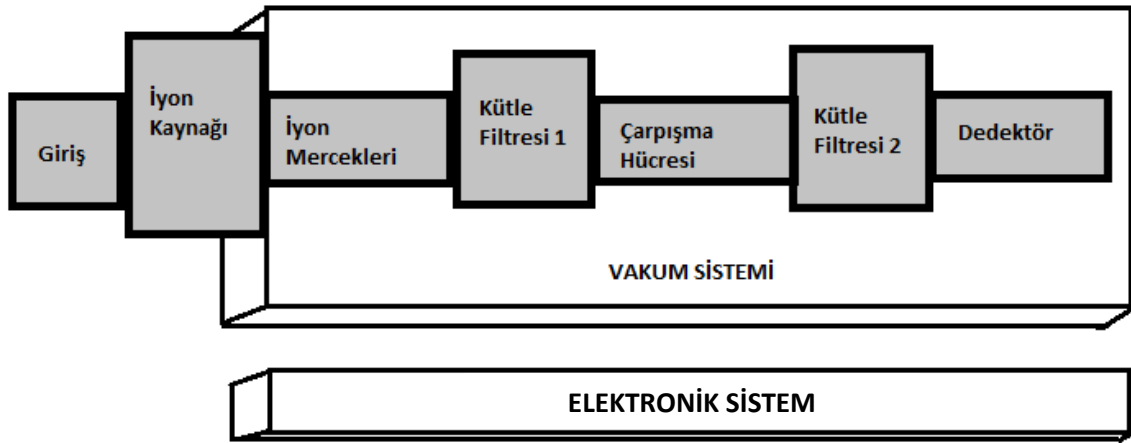
Kütle analizörleri iki modda çalışır: Scan modu ve SIM modu. Scan modunda, kütle analizörü farklı m/z oranlarına sahip iyonları izler. SIM modunda ise, sadece belli m/z oranına sahip olanları izler. Duyarlılığı fazladır fakat daha az iyon hakkında fikir sağlar. SIM tek MS’li sistemlerde tercih edilirken, LC-MS/MS’te daha çok MRM tercih edilir.⁵⁹

2.5.1. LC-MS/MS’in Uygulama Alanları

LC-MS/MS ilaç analizlerinde en çok kullanılan yöntemlerden bir tanesidir. Bundan dolayı farmakokinetik ve biyolojik analiz çalışmalarında kullanım aralığı çok

geniştir. Analizlerde ilacın dolaşımında veya organlarda tayinini kısa zaman zarfında yapmak önemlidir. MS duyarlılık, analiz süresi ve seçicilik bakımından UV'ye göre üstünlük kurmasından ötürü daha fazla tercih edilmektedir. MS'in en büyük artılarından bir tanesi MS-MS'in varlığıdır. Dedektör istenen bir iyonun ölçülmesine odaklanabilir. MS-MS yöntemi ile analiz 60 saniye veya daha kısa süre içinde yapılabilmektedir. Bu analiz süresi HPLC ile kıyaslandığında oldukça kısadır.⁶⁰

LC-MS/MS proteomiks çalışmaları, in vivo ilaç araştırmaları, metabolik stabilite araştırması, metabolit tayini, safsızlık tayini, bozulan ürünlerin tayini, kantitatif araştırmalar ve kalite kontrol çalışmalarında kullanılmaktadır.



Şekil 2.11. LC-MS/MS cihazının şematik gösterimi

2.6. Analitik Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)

Geçerlilik testi (validasyon), bir analiz yönteminin performans özelliklerini istenilen analitik uygulamada, belirlenen gerekli koşullarda sağladığını göstermek için yapılan işlemlerin tümüdür. Analitik yöntemin kabul edilebilirliğini göstermek için kullanılan analitik parametreler şunlardır:

1. Doğruluk; 2. Kesinlik; 3. Doğrusallık; 4. Duyarlılık; 5. Stabilité; 6. Seçicilik/ Belirleyicilik; 7. Sağlamlık; 8. Geri Kazanım.⁶¹

2.6.1. Doğruluk ve Kesinlik

Doğruluk, elde edilen değerin gerçek değere olan yakınlığıdır ve bağıl hata (%BH) ile verilir. Kesinlik, tekrarlanan analiz sonuçlarının birbirine olan yakınlığıdır ve standart sapma (SS), bağıl standart sapma (%BSS), varyans veya varyans katsayısı ile gösterilir. Kesinlik; tekrarlanabilirlik, ara kesinlik ve yenilenebilirlik olarak üç aşamadır. Tekrarlanabilirlik, aynı analiz şartlarında kısa bir süre sonra kesinlik değerinin göstergesidir. Ara kesinlik, laboratuvarlar arasındaki farkları (gün değişikliği, analizi yapan kişi değişikliği, cihaz değişikliği gibi) gösterir. Yenilenebilirlik: laboratuvarlar arasındaki kesinliği gösterir (laboratuvarlar arasında yapılan işbirlikli çalışmalar, yöntem standardizasyonu gibi).^{62,63}

2.6.2. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerin konsantrasyonuna karşı cihaz cevabının (absorbans, pik alanı vb. gibi) grafiğe geçirilmesi ile elde edilen eğriye kalibrasyon eğrisi denir. Kalibrasyon doğrusunun eğimi, doğrusallığın matematiksel bir ölçüsüdür. Kalibrasyon eğrisinde, eğrinin doğrusal olduğu en düşük konsantrasyon ile en yüksek konsantrasyon aralığına yöntemin doğrusallığı olarak ifade edilir.⁶⁴

2.6.3. Duyarlılık

Analitin konsantrasyonundaki değişimlere karşı cihazın verdiği sinyaldeki değişiktir. Bir başka ifadeyle, analitik yöntemin düşük konsantrasyonları saptayabilme özelliğidir.⁶⁴ **Gözlenebilme Sınırı (Limit of Dedection, LOD):** Belirlenen deney koşulları altında, örnek içinde kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikte ölçülebilen en düşük madde konsantrasyonudur.⁶⁴

Miktar Tayin Alt Sınırı (Limit of Quantitation, LOQ): Belirlenen deney koşullarında saptanabilen en düşük konsantrasyondur. Bir sınır değeri olup, madde konsantrasyonunun belirli bir değerin altında veya üstünde olup olmadığı saptanır. Bu

sınır, saptama sınırında hazırlanmış uygun sayıda örneğin analizi ile gerçekleşir.⁶⁴

2.6.4. Stabilité

Stabilité, belirli bir matriks içindeki bir analitin, amaçlanan saklama ısısında, dondurma veya çözme dönemlerinin etkisinde, oda ısısında veya diğer çevresel faktörlerin etkisinde bozunmadan kalma süresi olarak tanımlanır. Ayrıca, normal laboratuvar şartlarında nem, sıcaklık, ışık ve hava gibi etkilere saf analit ve/veya analit çözeltisi maruz bırakılarak hangi sürede bozunmadan kaldığının laboratuvar testleri ile incelenmesidir.⁶⁴

2.6.5. Sağlamlık

Bir analitik yöntemin sağlamlığı, yöntem parametrelerindeki küçük ancak önemli değişikliklerde etkilenmeden kalma kapasitesinin bir ölçüsüdür ve yöntemin normal kullanımı sırasında güvenilirliğinin bir göstergesidir. Yöntem geliştirme sırasında akış, pH, ısı, kolon gibi elde edilen sonuçlar üzerine etki gösteren bu gibi parametrelerin sonuçlar üzerine etki göstermeyen değişikliklerin aralığı da sağlamlık aralığı olarak isimlendirilmektedir.⁶⁴

2.6.6. Geri Kazanım

Analitik geri kazanım bir numune ortamından ekstrakte edilen ve numune ortamına ilave edilen analitin miktarından elde edilen değerin standart çalışma çözeltilerinden elde edilen değerler ile kıyaslanması sonucunda belirlenen değerdir. Biyolojik ortamlarda ise analiz sonucunda bulunan değerin gerçek değere oranı olarak ifade edilir.⁶⁴

2.6.7. Seçicilik-Belirleyicilik

Safsızlıklar, parçalanma ürünleri veya diğer girişimler varlığında incelenenin tam olarak değerlendirilebilmesi ile ilgili parametredir. Yöntemin analiz yapılacak maddeye özgülüğünü gösterir.⁶²

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kimyasal Maddeler ve Cam Malzemeler

Silodosin (Sigma-Aldrich); UROREC (Recordati İlaç)

Asetonitril (HPLC saflık, Merck, Almanya)

Metanol (Merck, Almanya)

Sodyum Karbonat (Merck,Almanya)

TBME(Tersiyer-Butil-Metil-Eter) (Sigma-Aldrich)

Diizopropil eter (Merck, Almanya)

Dietil eter (Merck, Almanya)

Trifloro Asetik Asit (TFA) (Merck, Almanya)

Karbamazepin (Sigma-Aldrich)

Deiyonize Su (Sigma-Aldrich)

Otomatik pipetler (10-100 μ L, 100-1000 μ L ve 1000-5000 μ L), kuvartz küvet (USA), oto örnekleyici vial kitleri (Agilent, 1.8 mL screw cap), erlen, beher, mezür, balon joje, deney tüpü Erzurum Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Laboratuvarlarından, biyolojik matriks olarak kullanılan sağlıklı insan plazması Atatürk Üniversitesi Yakutiye Araştırma Hastanesi Kan Bankasından temin edildi.

3.2. Cihazlar

Santrifüj (Hettich, RPM x 100)

Ultrasonik banyo (Elma LC 30)

Terazi (Metler Toledo)

Karıştırıcı (Vorteks, IKA)

Su banyosu (GFL)

Etüv (Memmert)

Vakum pompası (Phenomenex)

Spektrofotometre sistemi (Thermospectronic, HeaIOS β)

LC-MS/MS Sistemi - Agilent Technologies 6460 Triple Quand ve HP bilgisayar

-Kolon Agilent poroshell 120 EC-C18 (4.6*150mm 2.7 micron)

3.3. Yöntemler

3.3.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri Yöntem Şartları

UV-Görünür Bölge Spektrofotometri çalışmamızda uygulanan yöntem şartları

Tablo 3.1’de gösterildi.

Tablo 3.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yöntem şartları

Yöntem Şartları	Silodosin
Data modu	Absorbans
Start Lambda(λ) (nm)	250 nm
Stop Lambda (λ) (nm)	300 nm
Lambda (λ) Değişimi (nm)	345 nm
Tarama Hızı	2 nm/dk
Bant Genişliği	2 nm
Düzgünlük	Yüksek

3.3.2. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (LC-MS/MS) Yöntem Şartları

LC-MS/MS çalışmasında, uygulanan yöntem şartları Tablo 3.2’de gösterildi.

Tablo 3.2. LC-MS/MS yöntem şartları

Sabit Faz	Agilent C ₁₈ kolon (5 µm, 150 x 4.6 mm)
Hareketli faz	10 mM Amonyum Asetat(ph:4.6)- Asetonitril (60:40, h/h)
Akış hızı	0,4 mL/dk
Kolon sıcaklığı	25 ° C
Enjeksiyon hacmi	2 µL
Analiz süresi	2 dk
İyonizasyon	Elektron sprej pozitif
Moleküler iyon (Silodosin)/Product iyon	496.0/261.0
Moleküler iyon (Karbamazepin)/Product iyon	237.3/193.9
Kurutma gaz akış hızı	10 l/dk
Püskürtme basıncı	45 psi
Kurutma gaz sıcaklığı	300 °C
Parçalama voltajı	200 eV
Kurutma sıcaklığı	250 °C
Kapiler voltaj	3500 V
Şarj voltaj	500 V

3.4. Silodosinin Plazmadan Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon Prosesi

- İstenen konsantrasyondaki çözeltiyi elde etmek için eklenen standart silodosin çözeltisinin metanolü azot gazı altında uçuruldu.
- 0.5 mL boş insan plazması eklendi. 30 saniye vortexde karıştırıldı.
- Üzerine 100µL 0.5M Na₂CO₃ eklendi ve 30 saniye vortexde karıştırıldı.
- 4mL Dietil eter-TBME, (3:1,h/h) eklendi ve 90 saniye vortexde karıştırıldı.
- 3500 rpm de 5 dakika boyunca santrifüjlendi.
- Organik faz alındıktan sonra oda şartlarında azot gazı ile uçuruldu.

Elde ettiğimiz kalıntı

a) LC-MS/MS yöntemi için;

- 1 mL metanolde çözüldü
- 30 saniye karıştırıldı
- 45 µm gözenek büyüklüğüne sahip filtreden süzüldü
- Otomatik pipetle viallere koyuldu
- 2 µL LC-MS/MS sistemine enjekte edildi

b) UV-Görünür Bölge Spektrofotometri Yöntemi için;

- 5 mL metanolde çözüldü
- 30 saniye karıştırıldı
- Kuvartz küvetlere koyuldu ve ölçümler alındı

3.5. Kapsül Çözeltilerinin Hazırlanması

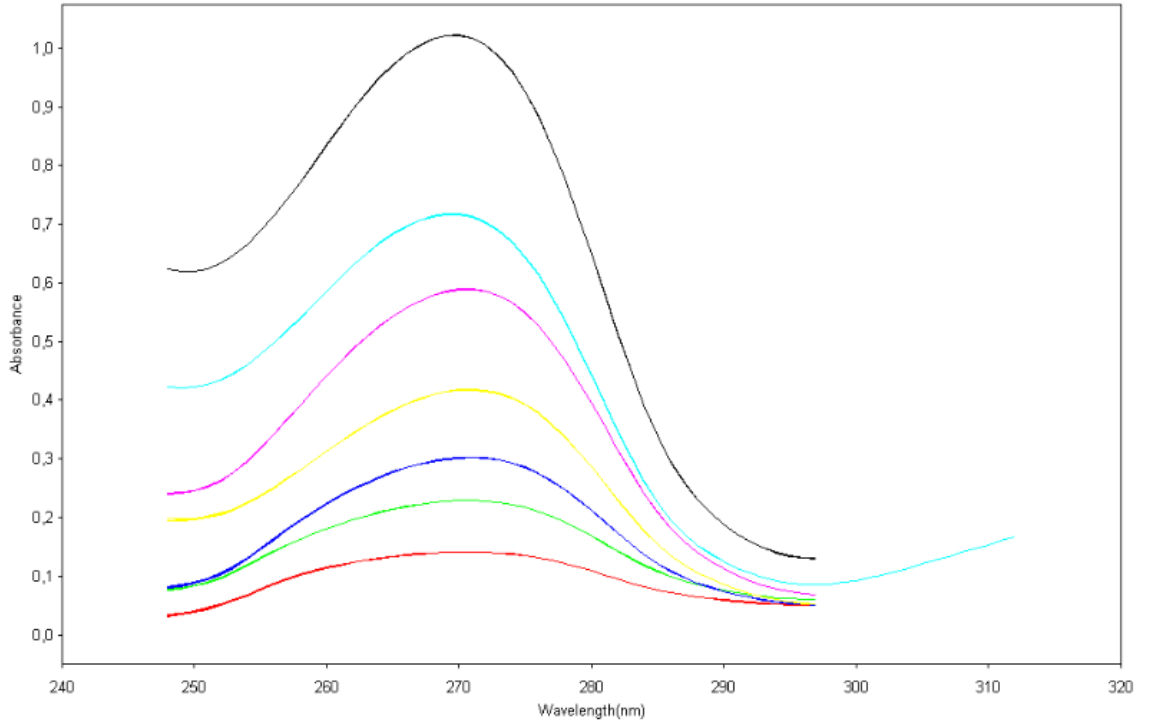
Silodosin etkin maddesini içeren tek farmasötik preparat (silodosin 8mg kapsül) serbest eczaneden temin edildi. 3 adet kapsül içeriği tartılarak kütlesi belirlendi. İyice karıştırılarak homojenize edildi. Balon jojeye konuldu ve metanolde çözülerek 240 µg/mL konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlandı. Stok çözeltiden uygun hacimlerde alınarak çalışma çözeltileri elde edildi.

4. BULGULAR

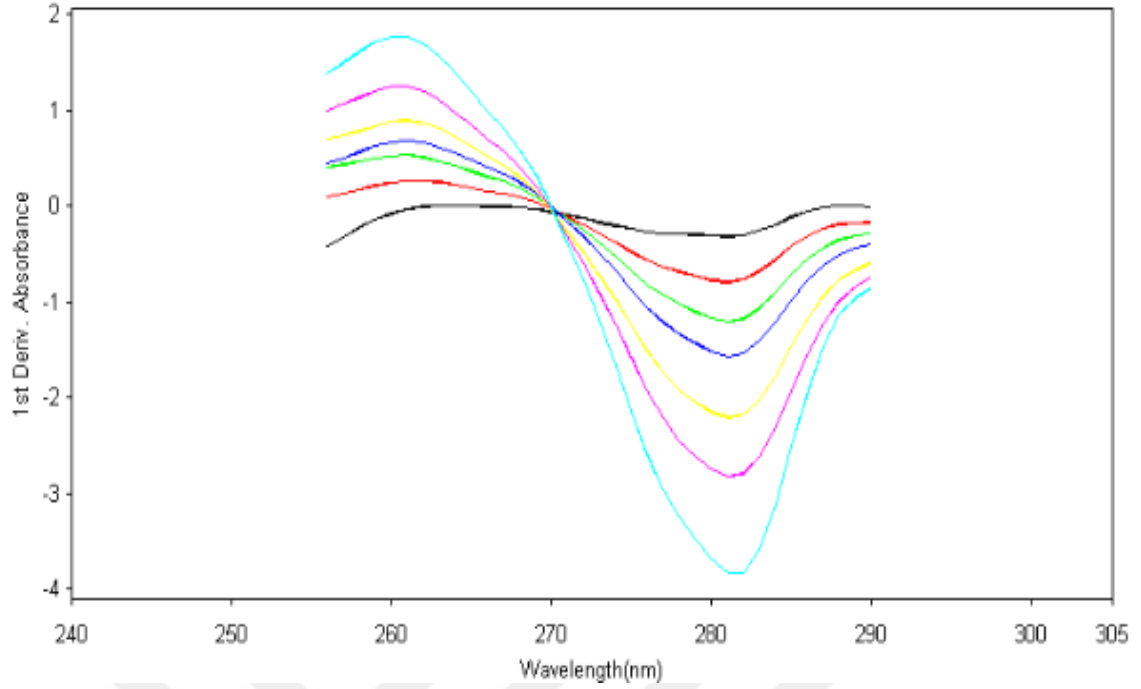
4.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri Yöntemi

4.1.1. Stok, Standart ve Kalite kontrol Çözeltilerin Hazırlanması

100 mg silodosinin hassas terazide tartılma işleminden sonra 100 mL metanolde çözülmesiyle 100 µg/mL'lik stok çözelti elde edildi. Bu stok çözeltiliden 5, 10, 15, 20, 30, 40, ve 50 µg/mL konsantrasyonlarda standart çalışma çözeltileri ve 7.5, 25 ve 45 µg/mL konsantrasyonlarda kalite kontrol çözeltileri hazırlandı. Standart çalışma çözeltilerinin UV-Görünür Bölge spektrofotometrede 272 nm dalga boyunda sıfıncı ve birinci türev absorpsiyonları alındı ve Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de gösterildi.



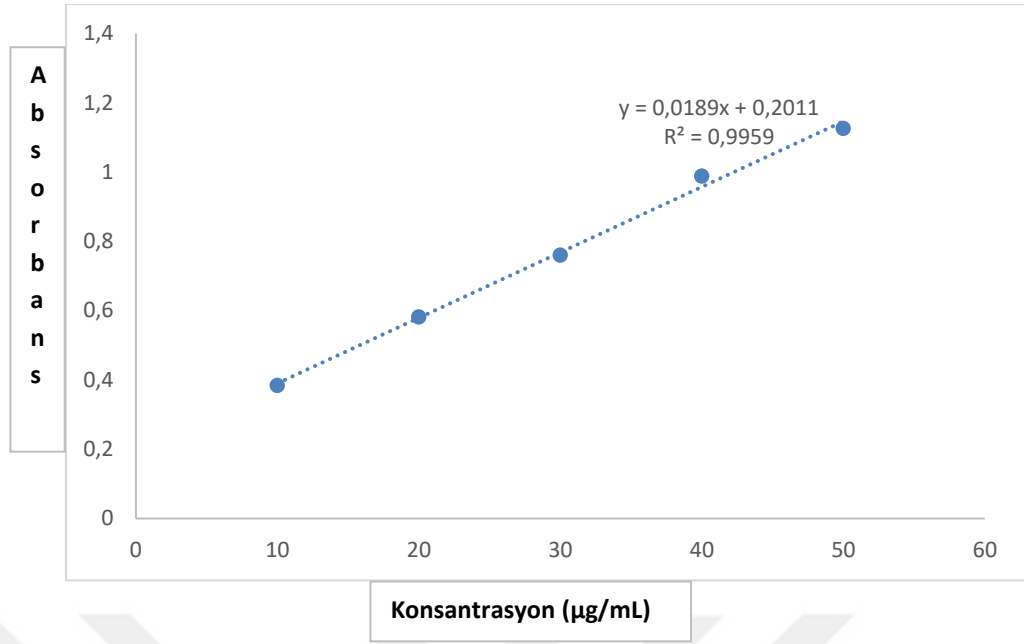
Şekil 4.1. 5, 10, 15, 20, 30, 40 ve 50 µg/mL konsantrasyonlarda silodosin standart çözeltilerinin UV-Görünür Bölge Spektrofotometri sıfıncı türev absorpsiyon spektrumları



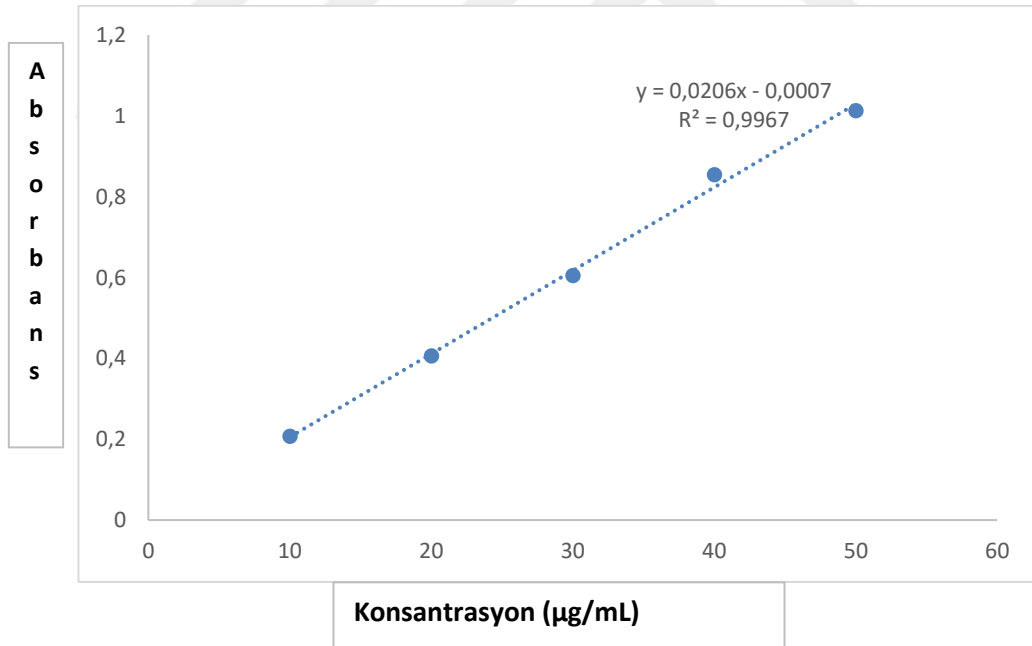
Şekil 4.2. 5, 10, 15, 20, 30, 40 ve 50 µg/mL konsantrasyonlarda standart silodosin çözeltilerinin UV-Görünür Bölge Spektrofotometri birinci türev absorpsiyon spektrumları

4.1.2. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)

a) Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi: UV-Görünür Bölge Spektrofotometride 5-50 µg/mL konsantrasyon aralığında elde edilen silodosin çözeltilerinin spektrumları silodosin çözeltilerinin konsantrasyonlarına karşılık alınan absorbans değerlerinin grafiğe dökülmesi ile sıfırıncı ve birinci türev kalibrasyon eğrileri çizildi ve Şekil 4.3 ve 4.4’de gösterildi. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yöntemiyle oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.1’de gösterildi.



Şekil 4.3. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminde standart çözeltilerin sıfırıncı türev kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.4. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminde standart çözeltilerin birinci türev kalibrasyon eğrisi

Tablo 4.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz sonuçları

Yöntem	^a ÇA (µg/mL)	^a LR	Sa	Sb	R ²
Sıfırıncı türev	5-50	$A_{272nm}=0.0189x+0.2011$	0.0021	0.0129	0.9959
Birinci türev	5-50	$A_{272nm}=0.0206x-0.0007$	0.0091	0.0034	0.9967

ÇA: çalışma aralığı, ^a:6 analiz sonucunun ortalaması, LR: lineer regresyon, Sa: regresyon eğrisindeki kaymanın standart sapması, Sb: regresyon eğrisindeki eğimin standart sapması, R: korelasyon katsayısı

b) Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ): Silodosinin

standart çözeltileri ile elde edilen kalibrasyon eğrisinde gösterilen en küçük konsantrasyondan daha küçük konsantrasyonlara inilerek standart çalışma çözeltileri oluşturuldu ve altı kez absorbansları okundu. Okunan değerlerin standart sapma ve bağıl standart sapmaları (%BSS) hesaplandı. LOD değeri yüzde bağıl standart sapma değeri %20'den küçük olan konsantrasyon ve LOQ değeri ise %10'dan küçük olan konsantrasyon olarak belirlendi. Yöntemin LOD ve LOQ değerleri sıfırıncı türev için 2 µg/mL ve 5 µg/mL olarak, birinci türev için 2.5 µg/mL ve 5 µg/mL olarak belirlendi.

c) Doğruluk ve Kesinlik: Yöntemin doğruluğu, kesinliği günüçi ve günler arası

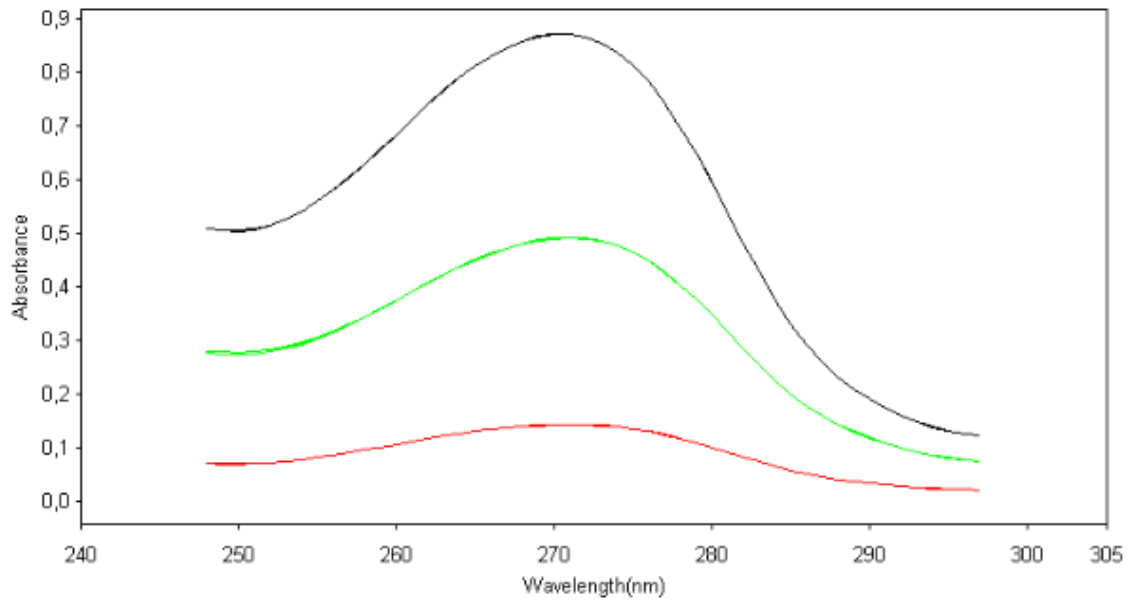
gibi faktörlerle gözlemlendi. Kalibrasyon eğrisi içinde kalan üç farklı konsantrasyonda (7.5, 25 ve 45 µg/mL) elde edilen silodosin kalite kontrol çözeltileri günüçi (aynı yöntem ile aynı laboratuvar koşullarında bir günde 6 defa) ve günler arası (aynı yöntemle 6 farklı günde 6 defa) miktar tayinleri yapıldıktan sonra deney sonuçlarının ortalaması, standart sapması, bağıl standart sapması ve bağıl hatası hesaplandı. Doğruluk bağıl hatayla [%BH= (bulunan değer-eklenen değer)/eklenen değer x100] ve kesinlik bağıl standart sapma ile [%BSS = (SS/bulunan değer) x 100] verildi (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminin doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)

Eklenen (µg/mL)	Günler arası					
	Bulunan±SS	Doğruluk	Kesinlik	Bulunan±SS	Doğruluk	Kesinlik
	(µg/mL)	%BH	%BSS	(µg/mL)	%BH	% BSS
7.5	7.62±0.07	1.6	0.96	7.59±0.07	1.2	0.98
25	25.40±0.36	1.59	1.4	25.97±0.95	3.88	3.67
45	45.92±0.30	2.04	0.67	44.66±0.46	-0.76	2.28
Eklenen (µg/mL)	Günler arası(Birinci Türev)					
	Bulunan±SS	Doğruluk	Kesinlik	Bulunan±SS	Doğruluk	Kesinlik
	(µg/mL)	%BH	%BSS	(µg/mL)	%BH	% BSS
7.5	7.67±0.07	2.27	0.98	7.39±0.11	-1.47	1.51
25	26.18±0.03	4.72	1.91	25.93±0.94	3.72	3.63
45	44.3±0.05	-1.56	2.10	45.63±0.78	1.4	1.71

SS: Standart sapma, BH: Bağlı hata, BSS: Bağlı standart sapma

d) Analitik Geri Kazanım: UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yöntemi ile farmasötik preparatlarda silodosinin geri kazanım çalışması standart ekleme yöntemine göre yapıldı. Silodosin etkin maddesi içeren urorec 8 mg ticari ilacından 10 µg/mL konsantrasyonda 3 farklı ilaç çözeltisi Bölüm 3.4.'de belirtildiği şekilde hazırlandı. Bu ilaç çözeltilerini UV-Görünür Bölge spektrumları alındı. Bu çözeltiler üzerine 5, 40 ve 80 µg/mL konsantrasyonlarda silodosin standart çalışma çözeltileri eklendi ve UV Spektrumları alındı. Elde edilen sonuçların ortalaması, standart sapması ve bağlı standart sapması belirlendi. Analitik geri kazanım [%GK= (toplam çözeltinin bulunan değeri-ilacın çözeltisinin değeri) / eklenen standart çözeltisinin değeri)x 100]. Çalışma sonucunda elde edilen, standart sapma, bağlı standart sapma ve yüzde geri kazanım (%GK) değerleri Tablo 4.3'de ve 7.5, 25 ve 45 µg/mL konsantrasyonda üç farklı ilaç çözeltisine ait UV spektrumları ise Şekil 4.5'de verildi.



Şekil 4.5. İlaç çözeltisine eklenen 3 farklı konsantrasyondaki silodosinin standart çalışma çözeltilerinin spektrumları

Tablo 4.3. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminin analitik geri kazanım değerleri

Farmasötik Preparat	Kapsül çözeltisi (µg/mL)	Eklenen silodosin (µg/mL)	Ortalama±SS (µg/mL)	%GK	%BSS
Silodosin (8 mg/kapsül)	5	2.5	7.2±0.08	96.6	1.1
		20	22.6±0.12	90.3	0.5
		40	46.4±0.20	103	0.4

SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma, GK: Geri kazanım

4.1.3. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

8 mg/kapsül silodosin içeren urorec kapsül çözeltileri Bölüm 3.4.'de belirtildiği şekilde hazırlandı. Kalibrasyon eğrisi sınırlarında tayin edilecek şekilde çözeltiler seyreltili ve UV-Görünür Bölge spektrofotometri yöntemi ile miktar tayinleri yapıldı. Elde edilen absorban değerleri standart silodosin çözelti değerleri ile karşılaştırılarak %GK ve %BSS değerleri Tablo 4.4'de verildi.

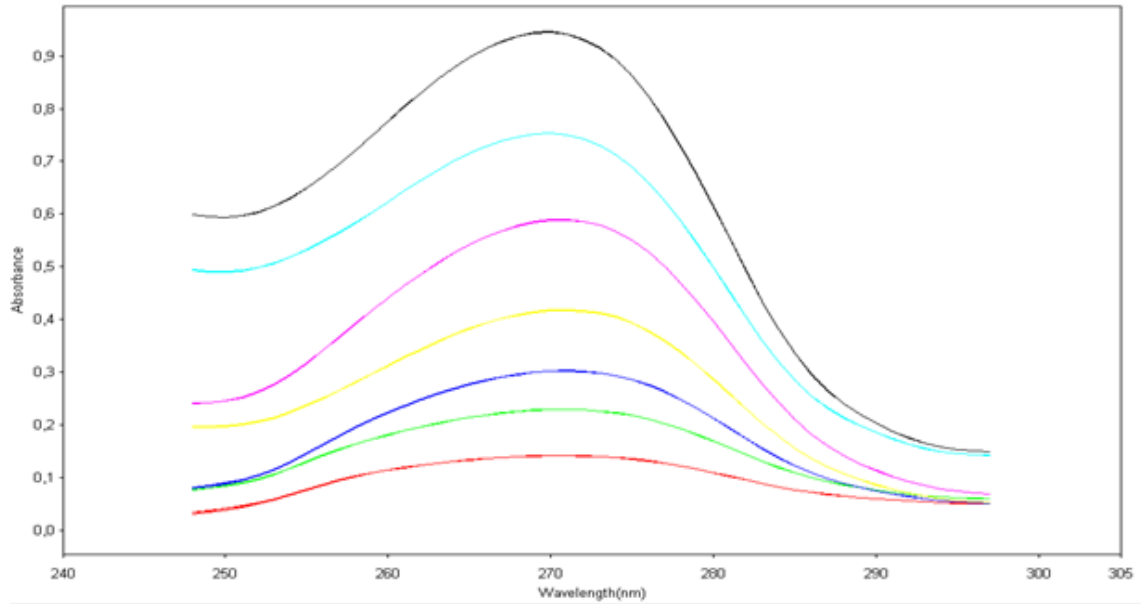
Tablo 4.4. Silodosin urorec kapsülünün miktar tayini (n=6)

Ticari Preparat	Ölçülen (µg)	Bulunan±SS (µg)	%GK	%BSS	Güven Aralığı
Urorec (8 mg/kapsül)	40	39.2±0.35	98	0.89	0.10

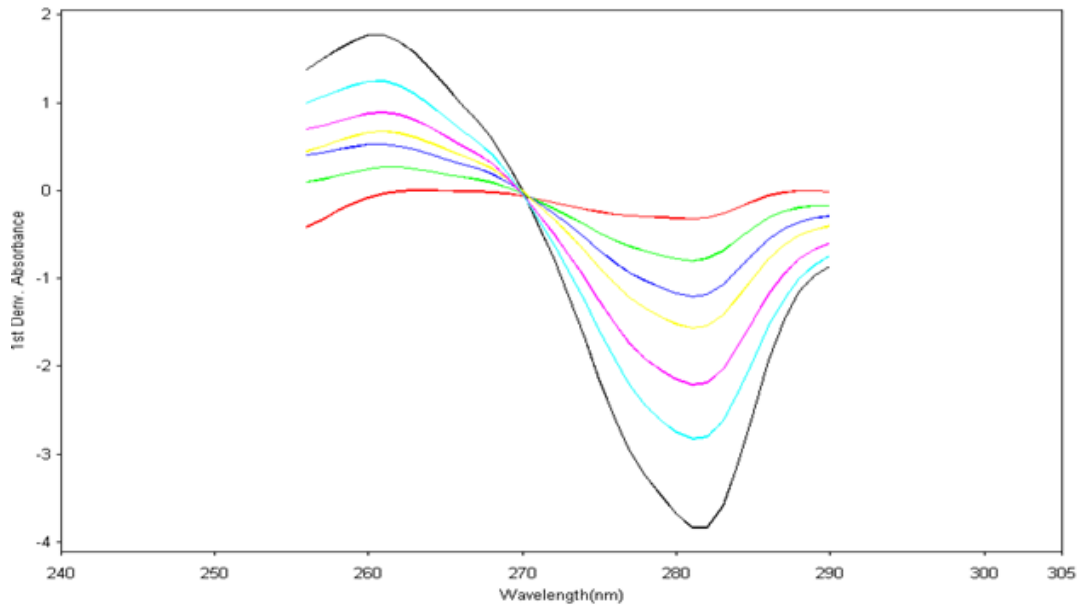
SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma, GK: Geri kazanım

4.1.4. Plazma Çalışması

a) Plazma Çözeltilerinin Hazırlanması: Çalışmada kullanılan plazma Atatürk Üniversitesi Yakutiye Araştırma Hastanesi kan merkezinden temin edildi. Plazma kalibrasyon eğrisini elde edebileceğimiz 5, 10, 15, 20, 30, 40 ve 50 µg/mL'lik konsantrasyonlardaki silodosin standart çalışma çözeltilerinden uygun miktarlarda boş plazmanın 0.5 mL'sine spayk edildi, karıştırıldı ve Bölüm 3.4'de belirtildiği şekilde ekstraksiyonları yapıldı. Her bir çözeltinin sıfırcı ve birinci türev UV-Görünür Bölge spektrumları alındı ve Şekil 4.6 ve 4.7'de verildi.



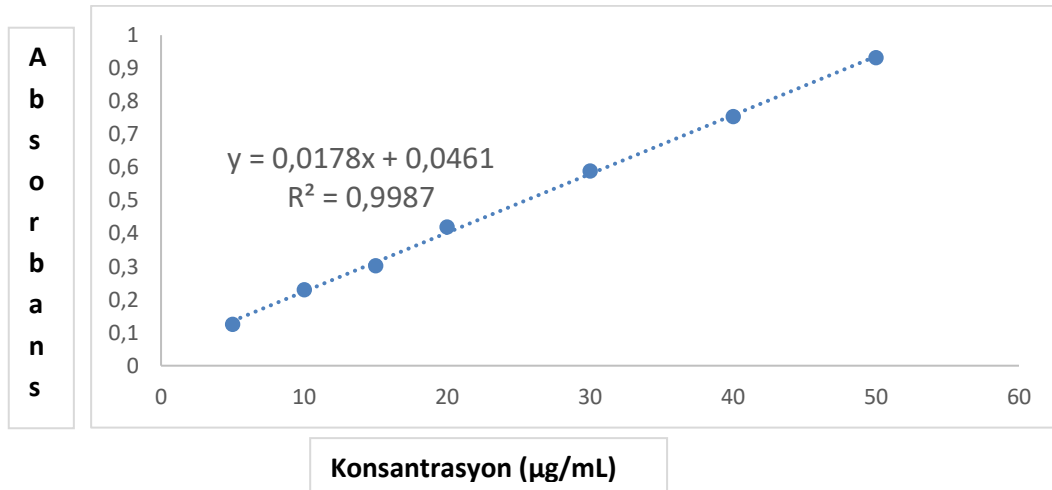
Şekil 4.6. 5, 10, 15, 20, 30, 40 ve 50 µg/mL konsantrasyondaki silodosin plazma çözeltilerinin UV sıfırcı türev spektrumları



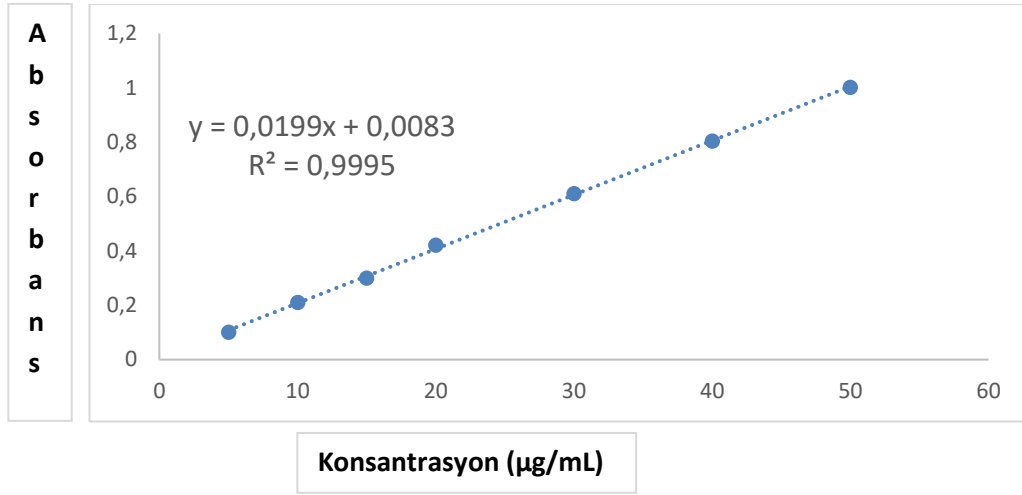
Şekil 4.7. 5, 10, 15, 20, 30, 40 ve 50 µg/mL konsantrasyondaki silodosin plazma çözeltilerinin UV birinci türev spektrumları

4.1.5. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)

a) Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi: 5-50 µg/mL konsantrasyon aralığındaki silodosin plazma çalışma çözeltilerinin konsantrasyonlarına karşı 272 nm'deki UV spektrumlarından elde edilen absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon eğrisi elde edildi ve ortalama kalibrasyon eğrisi Şekil 4.8 ve 4.9'da verildi.



Şekil 4.8. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminde plazma çözeltilerinin sıfırıncı türev kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.9. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminde plazma çözeltilerinin birinci türev kalibrasyon eğrisi

UV-Görünür Bölge spektrofotometri yönteminde plazma çözeltilerinin kalibrasyon eğrisinin regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.5’de verildi.

Tablo 4.5. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yöntemi, plazma çözeltilerinin kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz sonuçları

Yöntem	^a ÇA (µg/mL)	^a LR	Sa	Sb	R ²
Sıfırıncı türev	5-50	$A_{272nm}=0.0178x+0.0461$	0.0001	0.0004	0.9987
Birinci türev	5-50	$A_{272nm}=0.0199x+0.083$	0.0004	0.0013	0.9995

ÇA: çalışma aralığı, ^a:6 analiz sonucunun ortalaması, LR: lineer regresyon, Sa: regresyon eğrisindeki kaymanın standart sapması, Sb: regresyon eğrisindeki eğimin standart sapması, R: korelasyon katsayısı

b) Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ): Silodosin plazma çözeltileri ile elde edilen kalibrasyon eğrisinde okunan en küçük konsantrasyondan da küçük konsantrasyonda bir seri plazma çözeltileri hazırlanarak altı defa absorbansları okundu. LOD ve LOQ değerleri 2 µg/mL ve 5 µg/mL olarak

belirlendi. Birinci türev LOD ve LOQ değerleri de 2.5 µg/mL ve 5 µg/mL olarak belirlendi.

c) Doğruluk ve Kesinlik: Yöntemin doğruluğu, kesinliği günüçi ve günler arası gibi faktörlerle gözlemlendi. Kalibrasyon eğrisi içinde kalan üç farklı konsantrasyonda (7.5, 25 ve 45 µg/mL) elde edilen silodosin plazma kalite kontrol çözeltileri günüçi (aynı yöntem ve aynı laboratuvar koşullarında bir günde 6 defa) ve günler arası (aynı yöntemle 6 farklı günde 6 defa) deneyleri yapıldıktan sonra deney sonuçlarının ortalaması, standart sapması, bağıl standart sapması ve bağıl hatası hesaplandı. Doğruluk bağıl hatayla [%BH= (bulunan değer-eklenen değer)/eklenen değer x100] ve kesinlik bağıl standart sapma ile [%BSS= (SS/bulunan değer) x 100] verildi (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Plazma çalışmasında, UV-Görünür Bölge Spektrofotometri ve birinci türev yöntemlerinin doğruluk, kesinlik değerleri (n=6)

Eklenen (µg/mL)	Günüçi			Günler arası		
	Bulunan±SS (µg/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS	Bulunan±SS (µg/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik % BSS
7.5	7.55±0.01	0.67	0.13	7.62±0.06	1.60	0.79
25	25.06±0.02	0.24	0.08	24.32±0.76	-2.72	3.13
45	46.43±0.03	3.18	0.06	48.41±0.46	7.58	0.95

Eklenen (µg/mL)	Günüçi(Birinci Türev)			Günler arası(Birinci Türev)		
	Bulunan±SS (µg/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS	Bulunan±SS (µg/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik % BSS
7.5	7.63±0.11	1.73	1.44	7.43±0.12	-0.93	1.62
25	24.54±0.03	-1.84	0.12	25.66±0.13	2.64	0.51
45	43,87±0.05	-2.51	0.11	47.80±0.32	6.22	0.67

SS: standart sapma, BH: Bağıl hata, BSS: Bağıl standart sapma

d) Geri Kazanım: Plazmadan geri kazanım çalışmasında, silodosinin farklı konsantrasyonlarda standart çalışma çözeltileri plazmaya eklendi, karıştırıldı ve Bölüm 3.4’de verilen ekstraksiyon yöntemiyle ekstraksiyonları yapıldı. 5, 10, 15, 20, 30, 40 ve 50 µg/mL konsantrasyonlarda plazma çalışma çözeltileri elde edildi ve bu çözeltilerin yapılan analizlerinde okunan UV-Görünür Bölge absorbans değerleri standart çözeltilerden elde edilen absorbans değerleri ile kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak verildi (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminin plazmadan geri kazanım değerleri

Plazmaya Eklenen (µg/mL)	Bulunan±SS (µg/mL)	%GK	%BSS
5	4.99±0.04	99.86	0.81
10	9.85±0.21	98.5	2.21
15	14.91±0.17	99.42	1.15
20	19.81±0.25	99.08	1.29
30	29.61±0,49	98.71	1.65
40	39.48±0,81	98.70	2.05
50	49.46±0,93	98.92	1.88

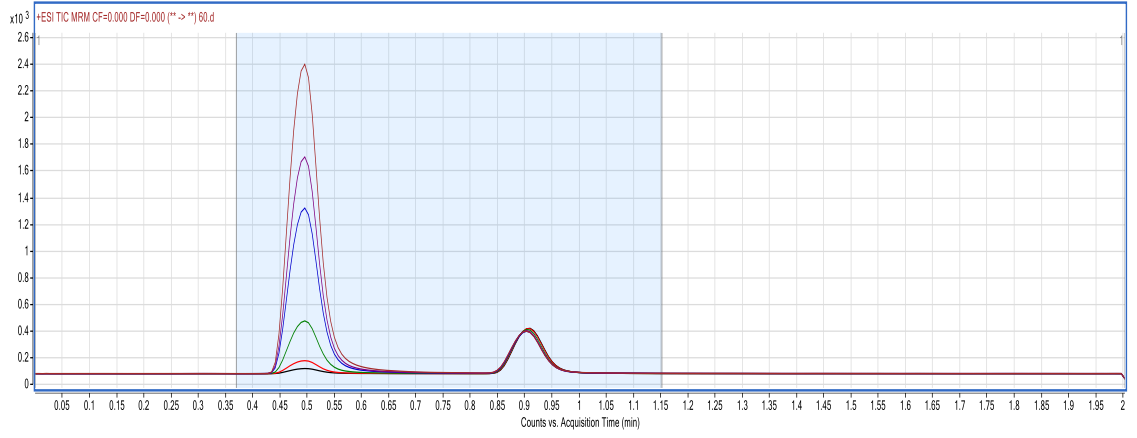
GK: Geri kazanım; BSS: Bağıl standart sapma, SS: Standart sapma

4.3. LC-MS/MS Yöntemi

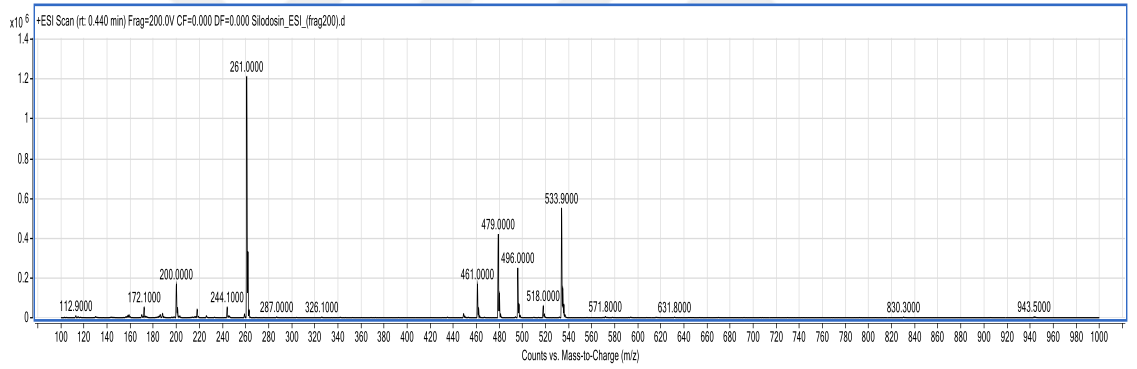
4.3.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

LC-MS/MS ile yapılan çalışmalarda, 100 µg/mL’lik silodosin stok çözeltisinden 0.3, 1, 10, 30, 40 ve 60 ng/mL konsantrasyonlarda standart çalışma çözeltilerine 400 ng/mL IS çözeltisi eklenerek hazırlandı. LC-MS/MS sistemine enjekte edilerek kromatogramları ve MS spektrumları alındı. Kromatogramlar Şekil 4.10’da; MS/MS spektrumu Şekil 4.11’de verildi. Bu çalışmada karbamazepin internal standart olarak kullanıldı. Karbamazepinin de MS spektrumu alındı ve Şekil 4.12’de verildi. Bu

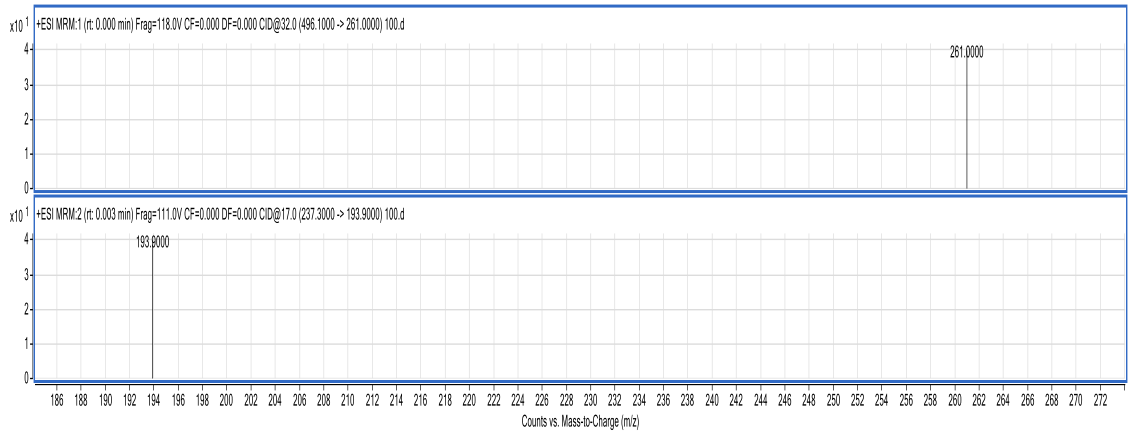
spektrumlara göre silodosin ve karbamazepin için moleküler iyon değerleri sırasıyla 496 ve 237.3 olarak belirlendi.



Şekil 4.10. LC-MS/MS sisteminde, 400 ng/mL IS içeren farklı silodosin çözeltilerinin kromatogramları



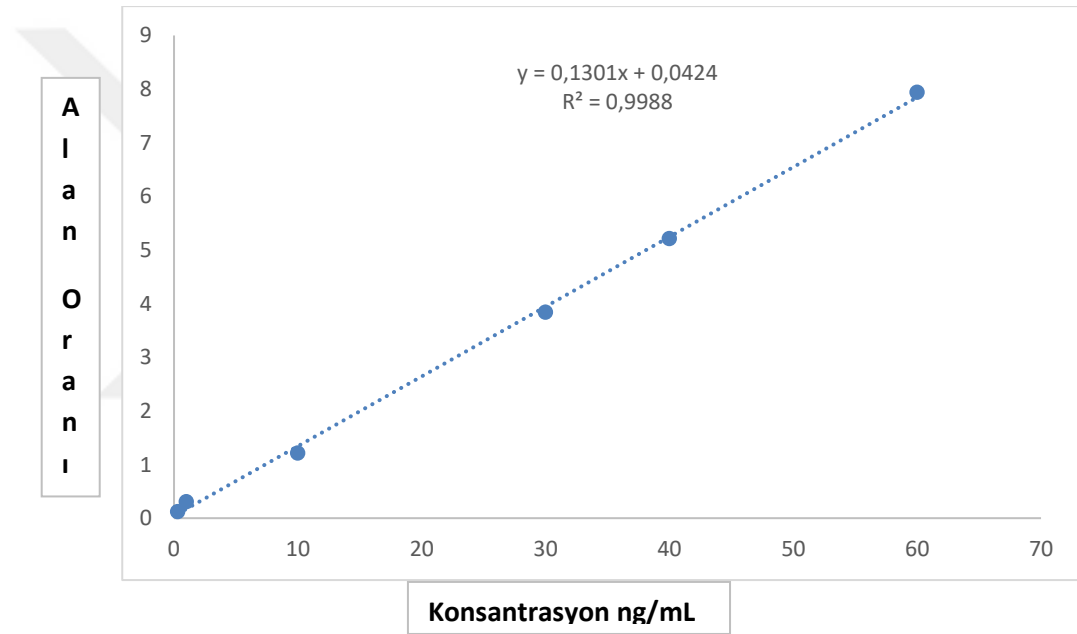
Şekil 4.11. Silodosine ait 200 V fragmentör voltaj altında elde edilen MS/MS spektrumu



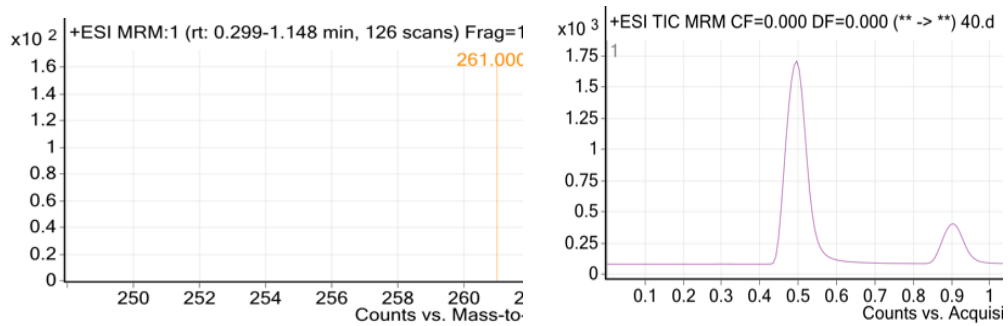
Şekil 4.12. Silodosin ve Karbamazepine ait MRM-MS/MS spektrumları

4.3.2. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)

a) Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi: 400 ng/mL IS olan 0.3-60 ng/mL konsantrasyon aralığında altı farklı konsantrasyonda (0.3, 1, 10, 30, 40, 60 ng/mL) hazırlanan silodosin standart çalışma çözeltilerinin LC-MS/MS sisteminde kromatogramları alınarak pik alan oranları belirlendi. Silodosin konsantrasyonuna karşı, IS (karbamazepin) ve silodosin pik alan oranlarının grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon eğrisi elde edildi (Şekil 4.13). Ayrıca Şekil 4.14’de 40 ng/mL standart silodosin çözeltilisine ait MRM spektrumu ve kromatogramı verildi.



Şekil 4.13. Silodosin standart çalışma çözeltilerinin LC-MS/MS yöntemiyle elde edilen kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.14. 40 ng/mL standart silodosin çözeltilisinin MRM spektrum ve kromatogramı

LC-MS/MS yöntemiyle oluşturulan kalibrasyon eğrisinin regresyon eşitliğinin

Tablo 4.8’de gösterildi.

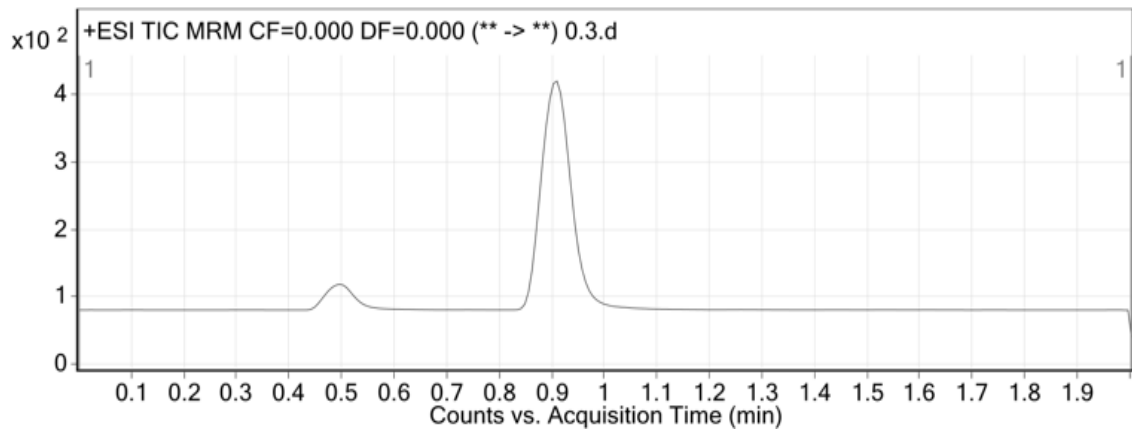
Tablo 4.8. LC-MS/MS yönteminin kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz sonuçları

^a ÇA (ng/mL)	^a LR	Sa	Sb	R
0.3-60	$y=0.1301x+0.0424$	0.0027	0.0016	0.9988

ÇA: çalışma aralığı, ^a:6 analiz sonucunun ortalaması, LR: lineer regresyon, Sa: regresyon eğrisindeki kaymanın standart sapması, Sb: regresyon eğrisindeki eğimin standart sapması, R: korelasyon katsayısı

b) Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ): LC-MS/MS yönteminin LOD ve LOQ değerleri ICH klavuzlarında verildiği şekilde tayin edildi. Kalibrasyon eğrisinde okunan en küçük değerden de düşük konsantrasyonlarda silodosin çözeltileri hazırlandı ve LC-MS/MS kromatogramları elde edildi. Bu kromatogramlardan sinyal/gürültü (S/G) oranları tespit edildi. S/G oranı 3 olan değer gözlenebilme sınırı (LOD) ve S/G oranı 10 olan değerde miktar tayin alt sınırı (LOQ) olarak elde edildi. LC-MS/MS yönteminin LOD ve LOQ değerleri sırası ile 0,1 ng/mL ve 0,3 ng/mL olarak belirlendi.

0,3 ng/mL konsantrasyondaki silodosin çözeltisinin kromatografisi Şekil 4.15’de verildi.



Şekil 4.15. 0,3 ng/mL konsantrasyondaki silodosin çözeltisinin kromatogramı

c) Doğruluk ve Kesinlik: Yöntemin doğruluğu, kesinliği günüçi ve günler arası gibi faktörlerle gözlemlendi. Hazırlanan üç farklı konsantrasyondaki (0.5, 25 ve 50 ng/mL) kalite kontrol çözeltilerinin günüçi (aynı yöntem ve aynı laboratuvar koşullarında 1 günde 6 defa) ve günler arası (aynı yöntemle 6 farklı günde 6 defa) miktar analizleri gerçekleştirildikten sonra analiz sonuçlarının ortalaması, standart sapması, bağıl standart sapması ve bağıl hata değerleri elde edildi. Doğruluk bağıl hatayla [%BH= (bulunan değer-eklenen değer)/eklenen değer) x100] ve kesinlik bağıl standart sapma ile [%BSS = (SS/bulunan değer) x 100] verildi (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. LC-MS/MS yönteminin doğruluk ve kesinlik değerleri

Eklenen (ng/mL)	Günüçi			Günler arası		
	Bulunan±SS (ng/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS	Bulunan±SS (ng/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS
0.5	0.51±0.01	2	2.03	0.52±0.01	4	2.84
25	25.52±0.38	2.08	1.47	25.4±0.26	1.6	1.03
50	50.72±0.34	1.44	0.68	50.85±0.35	1.7	0.69

SS: Standart sapma; BH: Bağıl hata; BSS: Bağıl standart sapma

d) Analitik Geri Kazanım: LC-MS/MS yöntemi ile farmasötik preparatlarda silodosinin analitik geri kazanım çalışması standart ekleme yöntemine göre yapıldı. Silodosin etkin maddesi içeren urorec 8 mg kapsül adlı ticari ilaçtan 10 ng/mL konsantrasyonda Bölüm 3.4.'de belirtildiği şekilde hazırlandı. Hazırlanan ilaç çözeltilerine 400 ng/mL IS eklendi. Bu çözeltiler LC-MS/MS sistemine enjekte edildi, kromatogramları alınarak pik alan oranları belirlendi. Kapsül çözeltilerine 5, 20 ve 50 ng/mL konsantrasyonlarda silodosin standart çalışma çözeltileri eklendi. Bu çözeltiler LC-MS/MS sistemine enjekte edilerek kromatogramları alındı ve pik alan oranları belirlendi. Elde edilen sonuçların ortalaması, standart sapması ve bağıl standart sapması

belirlendi. Analitik geri kazanım [% GK= (toplam çözeltide bulunan değeri-ilaç çözeltisinin bulunan değeri) / (eklenen standart çözeltisinin değeri)x 100] (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. LC-MS/MS yönteminin farmasötik preparatlarda analitik geri kazanım değerleri

Kapsül	Eklenen Standart Çözelti (ng/mL)	Kapsül Çözeltisi (ng/mL)	Bulunan±SS (ng/mL)	% GK	%BSS
Urorec (8 mg/kapsül)	5	5	4.7 ± 0.3	94	6.38
	20		20.8 ± 0.2	104	0.96
	50		48.6 ± 1.2	97.2	2.46

SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma, GK: Geri Kazanım

4.3.3. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

8 mg/kapsül silodosin içeren urorec çözeltileri Bölüm 3.4.'de belirtildiği şekilde hazırlandı. Kalibrasyon eğrisi sınırlarında tayin edilecek şekilde çözeltiler seyreltildi, çözeltilere 400 ng/mL IS eklendi ve LS-MS/MS sistemine enjekte edilerek kromatogramları alındı. Kalibrasyon eğrisi kullanılarak miktar tayinleri yapıldı. Elde edilen değerler standart silodosin çözelti değerleri ile karşılaştırılarak %GK ve %BSS değerleri Tablo 4.11'de verildi.

Tablo 4.11. LC-MS/MS yöntemi ile kapsül başına 8 mg silodosin içeren urorec kapsül miktar analizi (n=3)

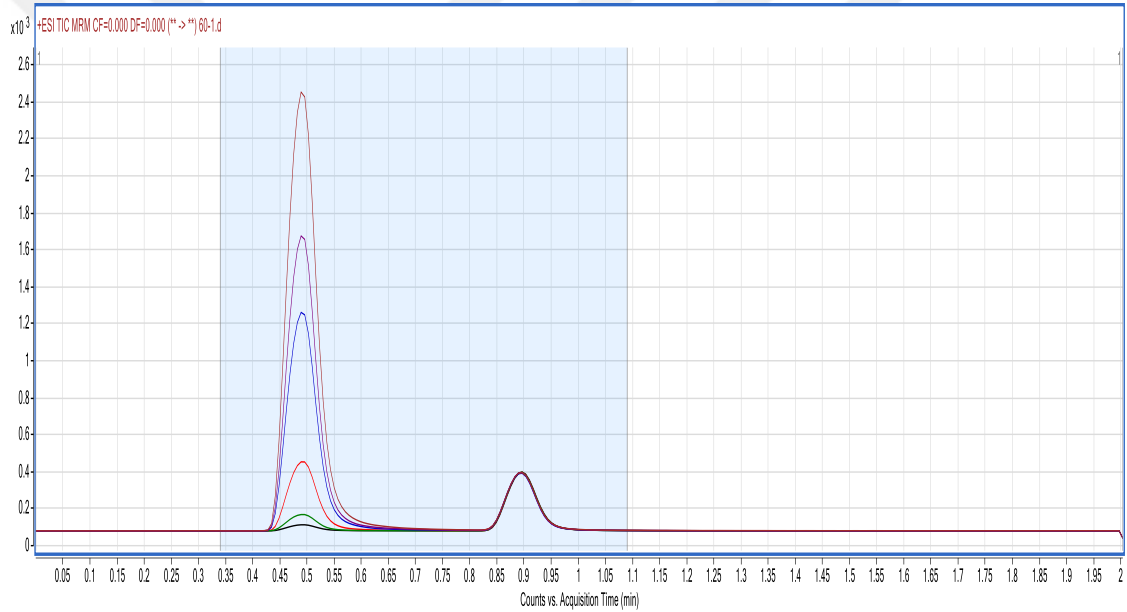
Ticari Preparat	Ölçülen (µg)	Bulunan±SS (µg)	%GK	%BSS	Güven Aralığı
Urorec (8 mg/kapsül)	40	39.37±0.38	98	0.96	-1.57

BSS: Bağlı standart sapma, GK: Geri Kazanım, SS: Standart sapma

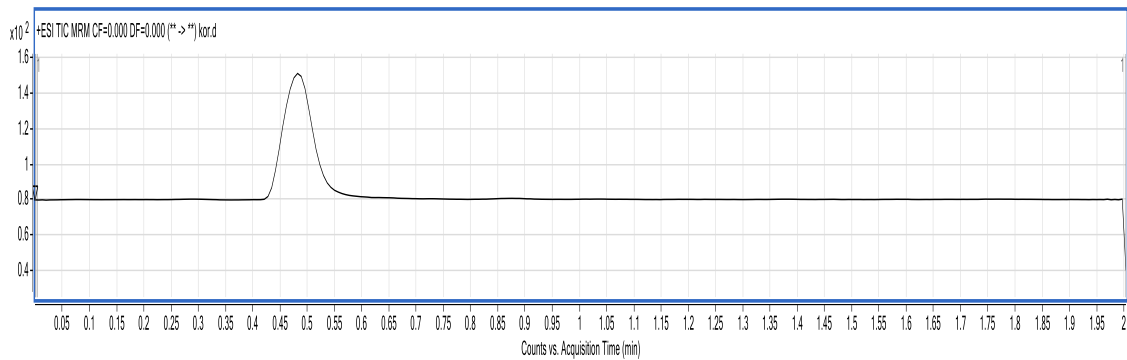
4.4. LC-MS/MS Plazma Çalışması

4.4.1. Plazma Çözeltilerinin Hazırlanması

Atatürk Üniversitesi, Yakutiye Araştırma Hastanesi Kan Alma Merkezinden temin edilen boş plazmanın 0.5 mL'sine 0.3, 1, 10, 30, 40 ve 60 ng/mL konsantrasyonlarda standart silodosin çözeltileri ve 400 ng/mL IS çözeltisi eklendi, karıştırıldı, Bölüm 3.4'de belirtildiği şekilde ekstraksiyonları yapıldı, LC-MS/MS sistemine enjekte edildi ve kromatogramları alındı (Şekil 4.16). Aynı şekilde boş plazmanında da ekstraksiyonu yapılarak kromatogramı alındı (Şekil 4.17).



Şekil 4.16. 400 ng/mL IS içeren farklı konsantrasyonlardaki silodosin plazma çözeltilerinin LC-MS/MS kromatogramları

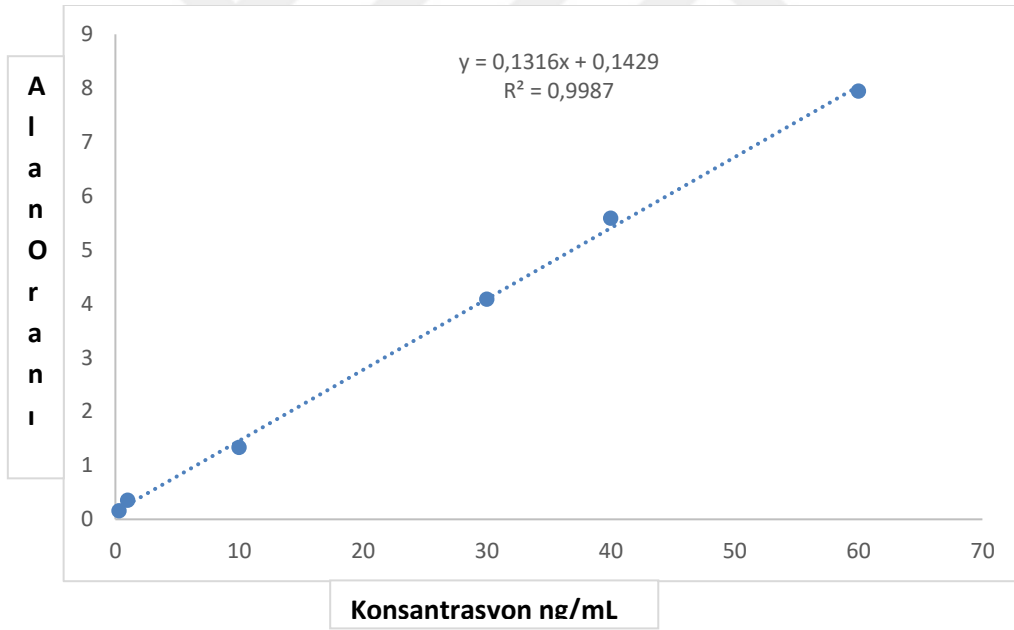


Şekil 4.17. Boş insan plazmasına ait kromatogram

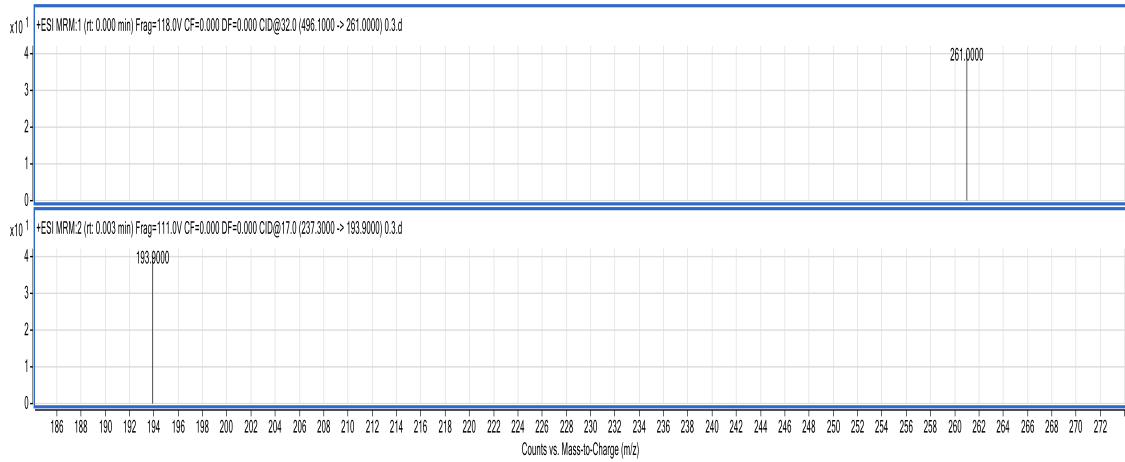
4.4.2. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)

a) **Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi:** 400 ng/mL konsantrasyonda IS içeren ve 0.3-60 ng/mL konsantrasyon aralığında elde edilen silodosin standart çalışma çözeltileri boş plazmaya eklenip karıştırıldıktan sonra Bölüm 3.4’de verilen ekstraksiyon prosesiyle plazmadan ekstrakte edildi ve bu çözeltiler LC-MS/MS sistemine enjekte edildi, kromatogramları alındı ve pik alanları belirlendi. Silodosin plazma çözelti konsantrasyonuna karşı, IS (karbamazepin) ve silodosin pik alan oranlarının grafiğe dahil edilmesiyle kalibrasyon eğrisi oluşturuldu (Şekil 4.18). LC-MS/MS ile oluşturulan kalibrasyon eğrisinin sonuçları ise Tablo 4.12’de gösterildi.

Ayrıca Şekil 4.19’da 0.3 ng/mL silodosin plazma çözeltisine ait MRM spektrumu verildi.



Şekil 4.18. Plazma çalışmasında, LC-MS/MS yöntemiyle elde edilen plazma çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.19. 0.3 ng/mL insan plazması çözeltisinde Silodosinin MRM spektrumları

Tablo 4.12. Plazma çalışmasında, LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz sonuçları

^a ÇA (ng/mL)	^a LR	Sa	Sb	R
0.3-60	$y=0.1316x + 0.1429$	0.0025	0.0036	0.9987

ÇA: çalışma aralığı, ^a:6 analiz sonucunun ortalaması, LR: lineer regresyon, Sa: regresyon eğrisindeki kaymanın standart sapması, Sb: regresyon eğrisindeki eğimin standart sapması, R: korelasyon katsayısı

b) Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ): Plazma çalışmasında, LC-MS/MS yönteminin LOD ve LOQ değerleri ICH kılavuzlarında verildiği şekilde tayin edildi. Kalibrasyon eğrisinin en küçük konsantrasyonundan daha düşük konsantrasyonlarda bir seri plazma çözeltileri hazırlandı ve kromatogramları alındı. Bu kromatogramlardan sinyal/gürültü (S/G) oranı 3 olan değer gözlenebilme sınırı (LOD) ve S/G oranı 10 olan değerde miktar tayin alt limiti (LOQ) olarak hesaplandı.

c) Doğruluk ve Kesinlik: Plazma çalışmasında, yöntemin doğruluğu, kesinliği ve tekrarlanabilirliği günüçi ve günler arası gibi faktörlerle gözlemlendi. Kalibrasyon eğrisi içinde kalan üç farklı konsantrasyonda (0.5, 25 ve 50 ng/mL) plazma kalite kontrol çözeltileri hazırlandı ve bu çözeltilerin günüçi günler arası analizleri yapılarak yöntemin doğruluk ve kesinlik değerleri belirlendi. Analiz sonuçlarını ortalaması,

standart sapması, bağıl standart sapması ve bağıl hatası belirlendi. Kesinlik %BSS ve doğruluk da %BH ile verildi (Tablo 4.13).

Tablo 4.13. Plazma çalışmasında LC-MS/MS yönteminin doğruluk ve kesinlik değerleri (n=3)

Eklenen (ng/mL)	Güniçi			Günler arası		
	Bulunan±SS (ng/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS	Bulunan±SS (ng/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS
0.5	0.5 ± 0.1	-4.3	5.3	0.5 ± 0.1	0.4	-1.5
25	26.9 ± 0.7	7.4	2.7	25.3 ± 0.7	2.7	1.4
50	52.0 ± 0.8	4.0	1.5	48.8 ± 0.5	1.0	-2.5

SS: Standart sapma; BH: Bağıl hata; BSS: Bağıl Standart sapma

d) Geri Kazanım: Plazmadan geri kazanım çalışmasında, 400 ng/mL IS ile silodosinin farklı standart çalışma çözeltileri plazmaya eklendi, karıştırıldı ve Bölüm 3.4’de verilen ekstraksiyon yöntemiyle ekstraksiyonları yapıldı. 0.3, 1, 10, 30, 40 ve 60 ng/mL konsantrasyonlarda plazma çözeltileri elde edildi ve bu çözeltiler LC-MS/MS sistemine enjekte edilerek kromatogramları alındı pik alan oranları belirlendi. Elde edilen pik alan oranları standart çözeltilerin pik alan oranlarıyla kıyaslanarak plazmadan geri kazanım değerleri tespit edildi (Tablo 4.14).

Tablo 4.14. LC-MS/MS yönteminin plazmadan geri kazanım değerleri

Plazmaya Eklenen (ng/mL)	Bulunan±SS (ng/mL)	%GK	%BSS
0.3	0.29±0.01	97	3.44
1	0.98±0.02	98.3	2.12
10	9.95±0.22	99.45	2.24
30	29.46±0.51	98.2	1.74
40	39.6±0.45	99	1.15
60	59.43±0.35	99.05	0.59

GK: Geri kazanım; BSS: Bağıl standart sapma, SS: Standart sapma

e) Stabilité (Kararlılık): Stabilité çalışması, silodosinin plazma çözeltisinde analiz boyunca hangi ortamlarda ne kadar süre ile bozunmadan stabil kaldığını belirlemek amacıyla yapıldı ve FDA rehberinde belirtilen kurallara göre (ortalamanın $\pm$ %10) analitlerin stabilite şartları belirlenerek analiz sonuçları değerlendirildi.

Silodosinin düşük, orta ve yüksek (0.5, 25 ve 50 ng/mL) konsantrasyonlarda hazırlanan standart kalite kontrol çözeltileri 0.5 mL boş plazma çözeltilerine eklenerek elde edilen çözeltiler 24, 48 ve 60 saat boyunca oda sıcaklığında (24 °C) , + 4 °C’de (buzdolabında) ve -20 °C’de (derin dondurucuda) bekletildi. Ekstraksiyon prosesine göre ekstraksiyonları yapıldı. LC-MS/MS yöntemi kullanılarak analizleri gerçekleştirildi ve bulunan değerler yeni hazırlanıp analiz edilen standart çözeltilerin analiz sonuçları ile kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.15’de verildi.

Ayrıca silodosin plazma çözeltilerine donma-çözme stabilitesi yapıldı. Yapılan donma-çözme stabilitesinde; silodosinin düşük, orta ve yüksek (0.5, 25 ve 50 ng/mL) konsantrasyonlarda hazırlanan kalite kontrol çözeltileri 0.5 mL boş plazma çözeltilerine eklendi. -20 °C depolama sıcaklığında 24 saat bekletilerek oda sıcaklığında yardımsız eritildi ve ekstraksiyon prosesine göre ekstraksiyonları yapıldı. Donma-çözme turları 3 kez tekrarlandı ve her donma-çözme turundan sonra LC-MS/MS yöntemi kullanılarak analizleri yapıldı. Bulunan değerler, yeni hazırlanıp analiz edilen standart çözeltilerinin analiz sonuçları ile kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım halinde Tablo 4.15’de gösterildi.

Tablo 4.15. Silodosinin LC-MS/MS yöntemi ile belirlenen stabilite değerleri

Stabilite	Eklenen (ng/ml)	6 saat (%GK $\pm$ SS)	24 saat (%GK $\pm$ SS)	48 saat (%GK $\pm$ SS)	60 saat (%GK $\pm$ SS)
Oda sıcaklığı (%GK $\pm$ SS)	0.5	98.33 $\pm$ 0.06	104.33 $\pm$ 0.01	90.7 $\pm$ 0.03	82.33 $\pm$ 0.02
	25	99.13 $\pm$ 0.17	101.46 $\pm$ 0.25	91.4 $\pm$ 0.71	84.02 $\pm$ 0.95
	50	100.26 $\pm$ 0.45	102.13 $\pm$ 0.35	89.93 $\pm$ 0.51	79.78 $\pm$ 0.63

Tablo 4.15. (Devamı)

+4°C	0.5	-	102.33±0.01	100.6±0.03	103.6±0.04
(%GK±SS)	25	-	98.53±0.49	98.13±0.58	97.46±0.81
	50	-	98.8±1.11	98.66±1.22	97.93±1.83
-20°C	0.5	-	92.73±0.04	93.33±0.05	94.66±0.06
(%GK±SS)	25	-	96.81±1.58	96.93±1.53	95.33±1.46
	50	-	96.80±1.80	97.13±1.55	97.6±1.21

SS: standart sapma (n=3), %GK: yüzde geri kazanım, (-): analiz yapılmadı

f) Matriks Etkisi: Matriks etkisi çalışmasında, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Alma merkezinden (1. plazma), Erzurum Kızılay Kan Alma Merkezinden (2. plazma) ve Erzurum Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kan Alma Merkezinden (3. plazma) sağlanan üç farklı plazmayla gerçekleştirildi. Bu plazmaların her birine silodosinin üç farklı konsantrasyondaki (0.5, 25 ve 50 ng/mL) kalite kontrol çözeltileri ayrı ayrı eklendi ve karıştırıldı. Daha sonra Bölüm 3.4’de verilen ekstraksiyon yöntemiyle ekstraksiyonları yapıldı. Ekstraksiyon sonrasında elde edilen çözeltilerin analizlerinde bulunan değerlerinin standart çözeltilerden elde edilen değerlerle kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım halinde Tablo 4.16’da gösterildi.

Tablo 4.16. LC-MS/MS yöntemi ile matriks etkisi

Eklenen (ng/mL)	1. Plazma		2. Plazma		3. Plazma	
	%GK	%BSS	%GK	%BSS	%GK	%BSS
0.5	102.2	4.762	101.1	3.896	97.52	5.470
25	102.0	5.647	99.30	5.678	96.44	4.044
50	99.20	4.054	98.60	6.573	94.66	5.140

GK: Geri kazanım; BSS: Bağlı standart sapma

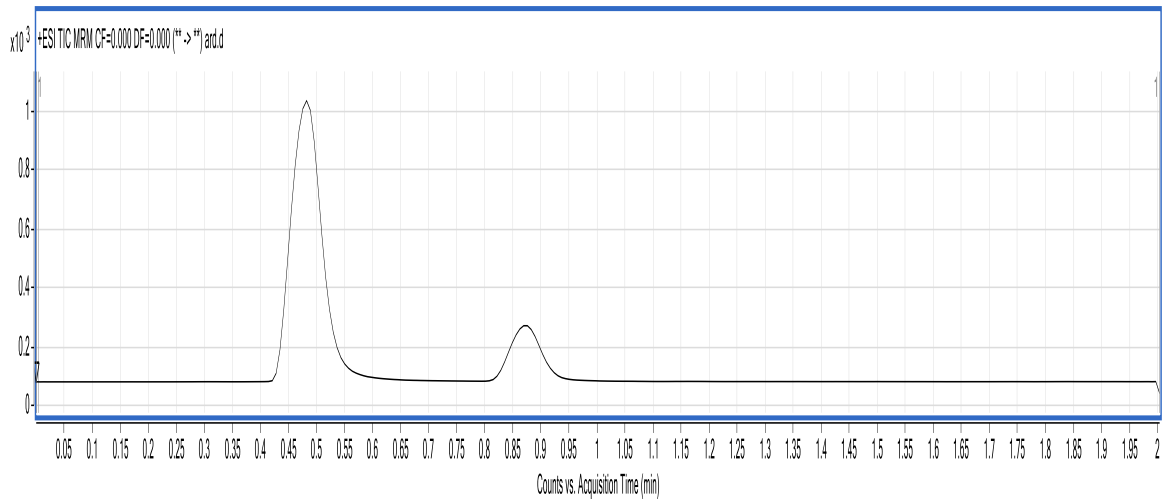
4.4.3. Geliştirilen Yöntemin Gerçek Numunelere Uygulanması

Geliştirilmiş ve geçerlilik testleri yapılmış LC-MS/MS yöntemi, BPH tanısı almış hastaların plazmalarından silodosin seviyesini belirlemek için kullanıldı. Hasta plazmaları Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Kliniği’nden alındı. Kliniğe

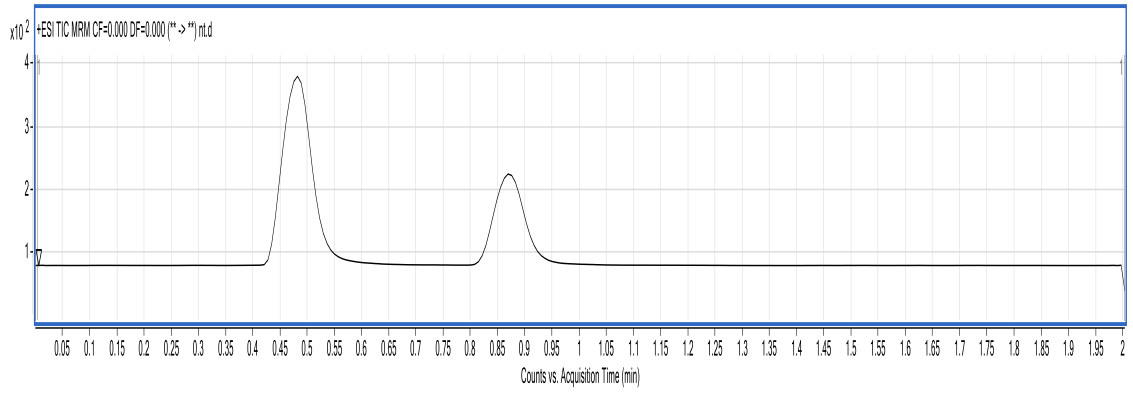
BPH tanıları ile yatan ve tedavisini 8 mg silodosin içeren (Urorec, Recordati) kapsül ile devam ettiren hastalardan kan numuneleri alındı. Hastalardan toplam 4 kan alındı. Alınan kan numuneleri 3500 rpm de 5 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen plazmadan 0.5 mL alındı ve Bölüm 3.4’de verilen ekstraksiyon prosesi uygulanıp silodosin ekstrakte edildi ve LC-MS/MS yöntemi ile silodosin miktar tayinleri yapıldı. Hasta özellikleri ve plazmada bulunan silodosin miktarları Tablo 4.17’de, hasta kanlarındaki silodosin düzeyini gösteren kromatogramlar Şekil 4.20, 4.21, 4.22, 4.23’de verildi.

Tablo 4.17. BPH tanısı alan hastaların özellikleri

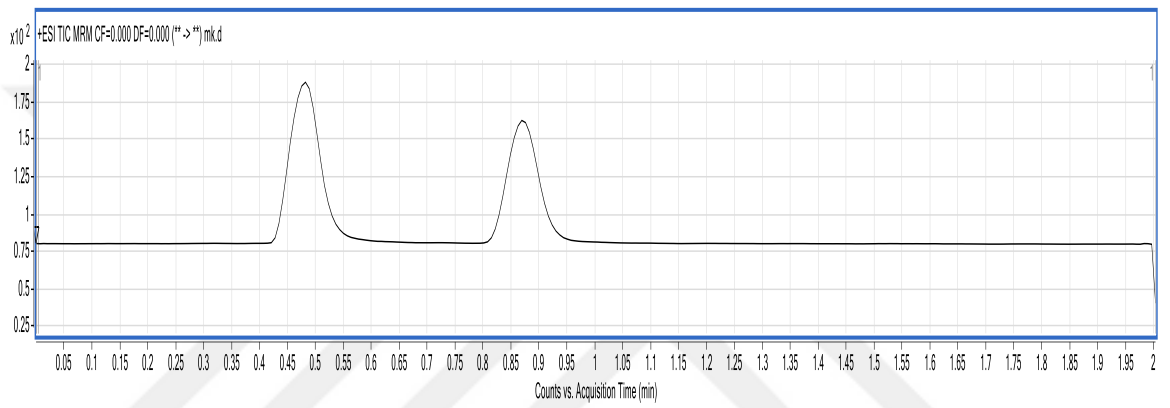
Hasta Adı	Yaşı	İlacı Kullandığı Süre	Sigara Alışkanlığı	Plazmada bulunan silodosin miktarı (ng/mL)
A.R.D.	54	1 Ay	YOK	32.3
M.U.K.	65	2 Ay	YOK	25.1
N.T.	66	8 Ay	YOK	28.6
M.K.	70	2 Yıl	YOK	25.7



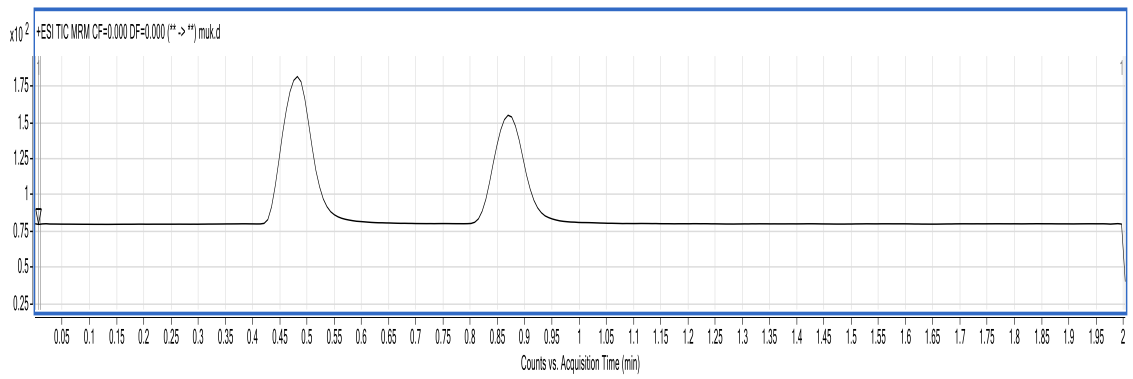
Şekil 4.20. A.R.D isimli hastanın LC-MS/MS kromatogramı



Şekil 4.21 N.T. isimli hastanın LC-MS/MS kromatogramı



Şekil 4.22. M.K. isimli hastanın LC-MS/MS kromatogramı



Şekil 4.23. M.U.K. isimli hastanın LC-MS/MS kromatogramı

5. TARTIŞMA

Validasyon, bir analitik uygulamada, bir analiz yönteminin performans özelliklerinin, tasarlanmış amaçlara uygun olduğunu göstermek için yapılan işlemlerin tümüdür. Yöntem geliştirme ve validasyonda ilk adım, yöntem için kabul edilebilir şartlar olan minimum kriterleri belirlemektir. Minimum kriterler yöntem geliştiriciler tarafından yöntemin tasarlanmış amaçlarını karşılayana kadar geliştirilmelidir. Geliştirilen yöntemin problemlerini minimize etmenin yolu ise tam bir validasyon deneylerini (geçerlilik testleri) yapmaktır. Deneylerden elde edilen analitiksel verilerin niteliği, yöntem geliştirme ve validasyon deneylerinin kalitesi üzerinde direk bir etkiye sahiptir. Bu yüzden analitik kimyacılar, uygun zamanda, doğru ve güvenilir veri sağlayabilmek için çalışılacak konu ile ilgili iyi bir literatür taraması yapmalı ve kullanılacak analitik yöntemlerin üstünlükleri ve sınırlamaları hakkında yeteri kadar bir bilgi donanımına ve iyi bir karar verme yetisine sahip olması gerekmektedir. Analitik yöntem seçimi yapıldıktan sonra da bu yöntemin uygulanabilir olduğunu göstermek için yöntemin geçerlilik testlerinin yapılması ve seçilen yöntemin bir değer ifade edebilmesi için de, yöntemin doğruluk, kesinlik, tekrarlanabilirlik, seçicilik, spesifiklik, hassaslık ve analiz süresinin kısa olması gibi geçerlilik test parametrelerinin incelenmesi gerekmektedir. Bu parametreler çalışılırken de bileşimi güvenilir bir şekilde bilinen bir veya daha fazla standart numune kullanılır. Kullanılan standart numunelerin hem bileşim bakımından hem de analit konsantrasyonu bakımından analizi yapılacak numune ile benzer olması gerekir.

İlaç analizlerinde, analizin yapılacağı ortama (farmasötik preparat veya biyolojik sıvılar) göre literatür bilgilerine de dayanarak analitik yöntem seçiminin yapılması gerekmektedir. Bu bilgiler ışığında yöntem seçimini gerçekleştirmeden önce iyi bir literatür taraması yapılmalıdır. Literatür taramasında silodosinin farmasötik

preparatlarda ve biyolojik sıvılarda miktar analizine yönelik çalışmalara rastlanmıştır olup, literatür çalışmaları ışığı altında atipik BPH tedavisi için kullanılan silodosinin hem farmasötik preparatlarda hem de plazmada miktar analizi için UV-Görünür Bölge Spektrofotometri ve LC-MS/MS yöntemleri geliştirilip validasyonları yapıldı.

Çalışmada kullanılan silodosin standart etkin maddesi Recordati İlaç'tan alındı ve kapsül başına 8 mg silodosin içeren Urorec (Recordati İlaç) adlı farmasötik preparat da serbest eczaneden sağlandı.

Ultraviyole-Görünür Bölge Spektrofotometresi, yüksek duyarlık, orta ve yüksek seçicilik, yüksek doğruluk, kesinlik, kolaylık ve rahatlık bakımından ilaç endüstrisinde farmasötik preparatlarda ilaç etkin maddelerinin miktar analizinde tercih edilen tekniklerden biri olarak söylenebilir. Bu teknikte, UV-Görünür Bölge spektrumu, madde üzerine gönderilen ışığın dalga boylarına karşı absorban değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile elde edilir. Yani $A=f(\lambda)$ fonksiyonudur. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri çalışmasında, silodosinin 272 nm dalga boyunda maksimum absorban verdiği tespit edildikten sonra çalışmanın optimum koşulları belirlendi. Yöntemin doğrusal olduğu 5-50 µg/mL konsantrasyon aralığında yedi farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 µg/mL) silodosin standart çalışma çözeltileri hazırlandı ve 272 nm dalga boyunda absorbanları belirlendi. Silodosin çözeltilerinin konsantrasyonuna karşı okunan absorban değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edildi. Kalibrasyon eğrisinin regresyon analizinden, regresyon doğrusunun denklemi sıfırıncı türev için $A_{272nm}=0.0189x+0.2011$ (A: Absorban, x: silodosin konsantrasyonu) ve korelasyon katsayısı (r) 0.9959, LOD değeri 2 µg/mL ve LOQ değeri 5 µg/mL olarak, birinci türev için $A_{272nm}=0.0206x-0.0007$, korelasyon katsayısı (r) 0.9967, LOD değeri 2.5 µg/mL ve LOQ değeri 5 µg/mL olarak belirlendi. Güniçi ve günler arası %BSS ve %BH değerlerinin sırasıyla sıfırıncı türev için %1.4 ve

%2.04'den küçük ve %3.67 ve %3.88'den küçük ve birinci türev için %2.1 ve %4.72 ve %3.63 ve %3.72 'den küçük olduğu tespit edildi. Yöntemin analitik geri kazanım değeri de ortalama %96.6 olarak tespit edildi. Geliştirilip valide edilen yöntem ile 8 mg silodosin etkin maddesi içeren Urorec ticari isimli farmasötik preparattan silodosin miktar tayinleri yapılarak, yöntemin farmasötik preparatlara başarıyla uygulanabileceği gösterildi.

Silodosin etkin maddesinin plazmalarda miktar tayini için UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yöntemi geliştirilip geçerlilik testleri yapıldı. Plazma çalışmasında, 5, 10, 15, 20, 30, 40 ve 50 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan silodosin standart çalışma çözeltileri 0.5 mL plazma üzerine eklenip (spike edilip) karıştırıldı ve Bölüm 3.4'de belirtildiği şekilde sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemiyle silodosin plazmadan ekstraksiyonu yapıldı. Ekstraksiyon işlemi sonucunda elde edilen çözeltilerin UV-Görünür Bölge Spektrofotometre de 272 nm dalga boyunda sıfırcı ve birinci türev spektrumları alındı ve absorpsanları tespit edildi. Her bir çözeltinin konsantrasyonuna karşı okunan absorpsan değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edildi. Kalibrasyon eğrisinin regresyon analizinden, regresyon doğrusunun denklemi sıfırcı türev için $A_{272nm}=0.0178x+0.0461$ ve korelasyon katsayısı (r) 0.9987, LOD değeri 2 µg/mL ve LOQ değeri 5.0 µg/mL olarak, birinci türev için $A_{272nm}=0.0199x+0.083$, korelasyon katsayısı (r) 0.9995, LOD değeri 2.5 µg/mL ve LOQ değeri 5.0 µg/mL olarak belirlendi. Güniçi ve günler arası %BSS ve %BH değerlerinin sırasıyla sıfırcı türev için %0.13 ve %3.18 ve %3.13 ve %7.58'den küçük ve birinci türev için %1.44 %1.73 ve %1.62 ve %6.22 'den küçük olduğu tespit edildi. Yapılan literatür taramasında standart ve farmasötik preparatlarda silodosinin belirlenmesine yönelik, UV-Görünür Bölge Spektrofotometri^{40,42,46,47} yöntemlerine ulaşılmıştır.

Bu çalışmalarda 5-50 µg/mL⁴⁰, üç yöntem için 10-50 µg/mL ve 300-500

$\mu\text{g/mL}$ ⁴², üç yöntem için 10-50 $\mu\text{g/mL}$, 2-10 $\mu\text{g/mL}$ ve 4-20 $\mu\text{g/mL}$ ⁴⁶, 10-60 $\mu\text{g/mL}$ ⁴⁷ konsantrasyon aralığında UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminin doğrusal olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmanın 272 nm dalga boyunda 5-50 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu belirlendi. Çalışmada kullandığımız dalga boyu literatürde yapılanlardan farklı olmuştur. Çalışma aralığı ise yapılan çalışmalara yakın değerdedir.

LC-MS/MS yöntemi biyolojik ortamlarda yüksek seçiciliği ve hassaslığı gibi pozitif yönlerinden dolayı daha fazla kullanılan bir tekniktir. LC-MS/MS yönteminde karışım içerisinde bulunan maddeler yüksek basınçlı sıvı kromatografisi bölümünde yapısal özelliklerine göre ayrılır ve kütle detektörü ile analiz edilir. İyonlaşma odasında maddeler iyonlaştırılıp parçalandıktan sonra birinci kuadrupol filtrede m/z (kütle/yük) oranına göre ayrılmaktadır. Tayin yapılacak iyonlar filtreden geçtikten sonra iyon moleküller collision gaz adı verilen yüksek saflıkta argon gazı ile parçalanmaya tabi tutulmaktadır. İkinci kuadrupol filtrede parçalanma sonucu oluşan iyonlar arasından seçilen ikincil iyon detektöre ulaşır ve bu iyon üzerinden teşhis ve miktar tayini yapılmaktadır. Sıvı kromatografi kısmında örnek tipine uygun kolon ve MS'e zarar vermeyecek çözücüler kullanılmaktadır. Kullanılan kolonlar ve çözücüler kontaminasyona karşı kararlı olduklarından dolayı değişik örneklerle çalışabilme avantajına sahiptir⁵⁶.

Kütle/iyon (m/z) oranları aynı olan birçok molekül olmasına rağmen doğada aynı parçalanma iyonuna sahip molekül oranı çok düşüktür. LC-MS/MS analite özgü özel teknik olup çok düşük konsantrasyonlarda çalışma avantajına sahiptir. Standart HPLC yöntemiyle karşılaştıracak olursak HPLC yönteminde maddeler alıkonma süresine (tR) göre teşhis edilirken LC-MS/MS yönteminde alıkonma süresine (tR) ek olarak moleküler iyon ve ürün iyonu gibi "1.cil ve 2.cil" iyonlarla teşhis edilmektedir. Bu işlemde yöntemin spesifikliğini güçlendirmektedir⁵⁹.

Bu avantajlarından ötürü çalışmamızda insan plazmasında ve kapsülde silodosin miktar tayini için LC-MS/MS yöntemi geliştirilip geçerlilik testleri valide edildi. Yöntemin uygulanabilir olduğunu göstermek için silodosin etkin maddesine sahip ticari olarak satılan urorec kapsülde silodosin miktar tayini yapıldı. Ayrıca silodosin ilacını kullanan hastaların plazmalarında silodosin miktar analizleri gerçekleştirildi

LC-MS/MS yönteminde ilk önce standart çalışma çözeltilerinde silodosinin miktar tayini için yöntem parametreleri belirlendi (Bölüm 3.2.2). Standart çözeltilerin kromatogramları alındı (Şekil 4.21). Silodosin piklerinin geldiği alıkonma zamanlarında çözücünden kaynaklanan herhangi bir girişimin olup olmadığı tespit edildi. İnsan plazma çözeltileri içinde aynı tür çalışmalar yapıldı. Kromatogramlarda silodosin için belirlenen alıkonma zamanlarında matriksten ve ekstraksiyon işlemlerinden kaynaklanan herhangi bir girişim olmadığı gözlemlendi.

Hem standart çözeltiler hem de plazma çözeltileri için silodosinin 0.3-60 ng/mL konsantrasyon aralığında doğrusal ve korelasyon katsayısının standart çözeltiler için 0.9988 ve plazma için 0.9987 olduğu tespit edildi. Korelasyon katsayısının bire çok yakın olması yöntemin doğrusallığının yüksek olduğunu gösterir. Silodosinin hem standart çözeltilerde hem de plazma çözeltilerinde LOD değeri 0.1 ng/mL, LOQ değeri ise 0.3 ng/mL olarak belirlendi. Bu değerler yöntemin hassasiyetinin yüksek olduğunu gösterir. Yöntemin doğruluğu bağıl hatayla kesinliği bağıl standart sapma ile verildi. Yöntemin hem standart çözeltiler hem de plazma çözeltileri için bağıl hatanın %7'den ve bağıl standart sapmanın ise %5.3'den küçük olduğu tespit edildi. Plazmadan geri kazanım değerinin ise ortalama olarak %98 olduğu belirlendi.

0.5, 25 ve 50 ng/mL konsantrasyonlarda hazırlanan silodosinin standart çözeltilerinin analiz boyunca hangi ortamlarda ne kadar süre ile bozulmadan kaldığını belirlemek amacı ile hem standart çözeltiler hem de plazma çözeltileri için stabilite

deneyleri yapıldı. Standart çözeltiler ve plazma ortamındaki maddelerin 48 saat stabil olduğu bulundu.

LC/MS-MS yönteminde, 0.5, 25 ve 50 ng/mL’lik konsantrasyondaki standart çalışma çözeltileri farklı insan plazmalarına eklenerek matriks etkisi incelendi ve matriks etkisinin olmadığı gözlemlendi. Plazmadaki % matriks etkisi çalışmasında üç farklı plazma örneğinde üç farklı konsantrasyonda yapılan ekstraksiyon işlem verimleri sırasıyla (%101.13), (%99.67) ve (%96.21) olarak belirlendi. Buna göre farklı insan plazması örneklerinin belirgin bir matriks etkisine sahip olmadığı ve farklı plazma örnekleri üzerinde yöntemin geçerli olduğu sonucuna varılmıştır.

Yapılan literatür taramasında, silodosin analizine yönelik, LC-MS/MS³⁵, HPLC^{36-39,41,43,44,48}, spektrofotometre^{40,42,46,47} ve spektrofotometri⁴⁵ yöntemleri ile ilgili yapılan çalışmalara ulaşıldı.

Literatürde mevcut tek LC-MS/MS yöntemi ile farmasötik preparatlarda silodosini, Zhao ve ark³⁵. Zorbax C₈ kolonda, asetonitril (%40, A) ve 10 mM amonyum asetat (%60, B) mobil faz karışımı kullanılarak analiz etmişlerdir. Yöntemin silodosin için 0.5-50 ng/mL aralığında doğrusal olduğu LOQ değerinin ise 0.5 ng/mL olduğu belirlenmiştir. Metil Tersiyer-Butil Eter kullanarak sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi ile 1 ng/mL için %85.9, 10 ng/ml için %84.6, 50 ng/mL için %86.1 geri kazanım sağlamışlardır. Gün içi ve günler arası kesinlik değerlerinin ise %2 ile %7.3 arasında olduğunu belirlemişlerdir.

Bu çalışmada ise C₈ kolon, su-amonyum asetat ve asetonitrilden oluşan mobil faza, 0.4 mL/dk akış hızı, 2 µL enjeksiyon hacmi kullanıldı. Bizim geliştirdiğimiz yöntemin 0.3-60 ng/mL konsantrasyon aralığında doğrusal ve LOQ değerinin silodosin için 0.3 ng/mL olduğu tespit edildi. Bu değerlere göre yorum yapıldığında geliştirilen yöntemin hassasiyetinin yüksek olduğu söylenebilir. Literatürde silodosinin

farmakokinetik verilerinin incelendiği çalışmalarda kanda nanogram seviyesinde ölçüldüğü gözlenmiştir³⁵. Bu nedenle farmakokinetik çalışmaların yapılabilmesi için tayin ve teşhis limitlerinin hassasiyeti son derece önemlidir.

Yöntemin uygulanabilirliğinin araştırılması hedefiyle de kapsül formundaki ticari farmasötik preparat Bölüm 3.4' de anlatıldığı gibi kapsül çözeltileri hazırlandı ve LC-MS/MS yöntemiyle miktar analizleri yapıldı. Analiz bulguları etiketli miktarlarla uyumlu olarak bulundu. Sonuç olarak, geliştirilen LC-MS/MS yönteminin ilaç analiz kalite kontrol çalışmalarında başarıyla uygulanabilir.

Plazmadan silodosin ekstraksiyon prosesinin araştırılması sırasında gereksiz zaman almayan, silodosinin plazmadan gelen kirliliklerden arınmış bir şekilde tayinine imkân veren hassas, seçici ve tekrarlanabilir bir yöntem seçilmesi amaçlandı. Bu amaçla Bölüm 3.4'de verilen ekstraksiyon yöntemi kullanılarak silodosin plazmasından ekstrakte edildi. Zhao ve ark³⁵ ekstraksiyon işleminde 0.5 µL plazma örnekleri için 3 µL TBME kullanarak ekstraksiyon yapmışlardır. 1ng/mL için %85.9, 10 ng/ml için %84.6, 50 ng/mL için %86.1 geri kazanım sağlamışlardır. Bizim çalışmamızda TBME maliyeti yüksek bir kimyasal ajan olduğu için hem maliyeti düşürüp hem de ekstraksiyon prosedüründe geri kazanımı artırmak suretiyle 3mL dietil eter ve 1 mL TBME karışımını 0.5 mL plazma örneğine tatbik ettik. 1ng/mL için %98.3, 10ng/mL için %99.45, 50 ng/mL için %99.1 geri kazanım sağlayarak literatürdeki mevcut tek yöntemden daha yüksek geri kazanım değerlerine ulaştık. Çalışmamızda silodosini plazmadan ekstrakte etmek için kullandığımız dietil eter, TBME (3:1,h/h) taranan literatürlere göre ilk defa bizim çalışmamızda kullanılmış olup yüksek geri kazanım sağladığından dolayı silodosinin plazmadan ekstraksiyonlarında kullanılabilir olduğu gösterilmiştir. Ayrıca IS olarak kullandığımız karbamazepin de taranan literatürlere göre yine ilk defa bizim çalışmamızda kullanılmış olup plazmadan ve farmasötik

preparattan silodosin tayininde LC-MS/MS yöntemi literatürlerde kullanılan internal standartlara ek olarak kullanılabileceği gösterilmiştir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

BPH genellikle 50 yaşından fazla erkeklerde karşılaşılan bir hastalıktır. Yaşamına uzun süreden beri devam eden hemen her erkekte ortaya çıkabilecek bir rahatsızlıktır. Nüfus yaşlandıkça bu hastaların sayısı da orantılı bir şekilde artmaktadır. BPH, yaşlı erkekler için en yoğun görülen hastalıklardan biri olması ile beraber, etki mekanizması hakkında soru işaretleri bulunmaktadır. Yapılan sık araştırmalara rağmen, neden sonuç ilişkisi belirsizliğini korumaktadır. Silodosin prostat bezi için yüksek doku seçiciliğine sahip $\alpha 1$ adrenerjik reseptör antagonistidir. Silodosin düz prostat kasındaki konsantrasyonu inhibe eder ve BPH ile ilişkili düşük üriner yol semptomlarını hafifletir. Diğer $\alpha 1$ adrenerjik reseptör antagonistlerinin aksine ortostatik hipotansiyon gibi yan etkisi olmadığından hastalardaki kullanımı son yıllarda artış göstermektedir.

Çalışmamızda BPH’de çok geniş bir kullanım alanına sahip olan silodosinin piyasadaki mevcut tek farmasötik preparattan (Urorec 8mg) ve insan plazmasından miktar tayininde UV-Görünür Bölge Spektrofotometri ve LC-MS/MS yöntemleri geliştirildi ve yöntem geçerlilik testleri yapıldı. Bu yöntemler ile silodosin etkin maddesini içeren kapsülde miktar analizleri gerçekleştirildi. Daha sonra da LC-MS/MS yöntemi ile BPH tanısı almış hastaların plazmalarından silodosinin miktar tayinleri gerçekleştirildi ve sonuç olarak geliştirilip geçerlilik testleri yapılan yöntemlerin hassas, basit ve hızlı olduğu, kalite kontrol ve klinik çalışmalarda uygulanabilir olduğu gösterildi. Ayrıca, elde edilen verilerin silodosinin BPH’lı hastalarda sistemik dolaşımındaki davranışlarının belirlenmesine yönelik yapılacak incelemelere yol göstereceği düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Yüksel N. *Psikofarmakoloji*, 2. Baskı. Ankara, Çizgi Tıp Yayınevi, 2003:1-154.
2. M. Ishiguro, Y. Futabayashi, T. Ohnuki, M. Ahmed, I. Muramatsu, T. Nagatomo, Identification of binding sites of prazosin, tamsulosin and KMD-3213 with alpha(1)-adrenergic receptor subtypes by molecular modeling. *J. Life Sci.* 2002,71(21):2531-41
3. S. Murata, T. Taniguchi, M. Takahashi, K. Okada, K. Akiyama, I. Muramatsu, Tissue selectivity of KMD-3213, an alpha(1)-adrenoreceptor antagonist, in human prostate and vasculature. *J. Urol.* 2000,164:578-83
4. Silodosin kimyasal yapı <https://www.drugbank.ca/drugs/DB06207> 23.05.2017
5. Urorec Kapsül <http://www.recordati.com.tr/Urunler/83-urorec%C2%AE-4-mg-kapsul-ila%C3%A7-prospekt%C3%BCs/72/>.23.05.2017
6. Berry SJ, Coffey DS, Walsh PC, Ewing LL. The Development of human benign prostatic hyperplasia with age. *J Urol*, 1984. 132: 474-479.
7. Chute CG, Panser LA, Girman CJ, Oesterling JE, Guess HA, Jacobsen SJ, Lieber MM. The prevalence of prostatism: A Population-Based survey of urinary symptoms. *J.Urol.*, 1993, 150: 85-89.
8. Bartsch G, McConnell JD, Mahler C, Calais Da Silva F, Klocker H, Richard F. Committee 11. Endocrine Treatment of Benign Prostatic Hyperplasia. Paris 2000: 423-57.
9. Norman RW, Coakes KE, Wright AS, Rittmaster RS. Androgen metabolism in men receiving finasteride before prostatectomy. *J Urol* 1993,150(5 Pt 2):1736-9.
10. Roehrborn CG, Andriole G, Schalken JA. Dutasteride a novel dual 5-alpha reductase inhibitor, reduces serum DHT to a greater extent versus finasteride and

- achieves finasteride maximal reduction in a larger proportion of patients. *Eur Urol* 2003; 2(Suppl): 635.
11. McConnell JD, Roehrborn CG, Bautista OM, Andriole GL, Dixon CM, Kusek JW, et al. The long-term effect of doxazosin, finasteride, and combination therapy on the clinical progression of benign prostatic hyperplasia. *N Engl J Med* 2003; 349: 2387-98.
 12. Roehrborn CG, Boyle P, Nickel JC, Hoefner K, Andriole G. Efficacy and safety of a dual inhibitor of 5-alpha-reductase types 1 and 2 (dutasteride) in men with benign prostatic hyperplasia. *Urology* 2002, 60: 434-41.
 13. Andersen JT, Ekman P, Wolf H, Beisland HO, Johansson JE, Kontturi M, et al. Can finasteride reverse the progress of benign prostatic hyperplasia? A two-year placebo-controlled study. The Scandinavian BPH Study Group. *Urology* 1995, 46: 631-7.
 14. Gormley GJ, Stoner E, Bruskewitz R, Imperato-McGinley J, Walsh PC, McConnell JD. et al. The effect of finasteride in men with benign prostatic hyperplasia. The Finasteride Study Group. *N Engl J Med* 1992, 327: 1185-91.
 15. Lowe FC, McConnell JD, Hudson PB, Romas NA, Boake R, Lieber M, et al. Long-term 6-year experience with finasteride in patients with benign prostatic hyperplasia. *Urology* 2003, 61: 791-6.
 16. Bartsch G, Rittmaster RS, Klocker H. Dihydrotestosterone and the concept of 5alpha-reductase inhibition in human benign prostatic hyperplasia. *World J Urol* 2002, 19: 413-25.
 17. Djavan B, Milani S, Fong YK. Dutasteride: a novel dual inhibitor of 5alpha-reductase for benign prostatic hyperplasia. *Expert Opin Pharmacother* 2005; 6: 311-7.

18. Andriole GL, Kirby R. Safety and tolerability of the dual 5alpha- reductase inhibitor dutasteride in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Eur Urol* 2003, 44: 82-8.
19. Atan A, Tuncel A. Benign prostat hiperplazisi ile ilişkili alt üriner sistem semptomlarında tedavi seçenekleri. *Turkish Journal of Urology* 2012,38(4): 228-32.
20. Mc Vary KT, Roehrborn CG, Avins AL, Barry MJ, Bruskewitz RC, Donnell RF, et al. Management of Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) American Urological Association Guideline 2010. [http:// www.auanet.org/content/clinical-practice-guidelines/clinical-guidelines.cfm?sub=bph](http://www.auanet.org/content/clinical-practice-guidelines/clinical-guidelines.cfm?sub=bph).23.05.2017
21. The management of lower urinary tract symptoms in men. NICE Guideline 2010.
22. Oelke M, Bachmann A, Descaseaud A, Emberton M, Gravas S, Michel MC, et al. Guidelines on the management of male lower urinary tract symptoms (LUTS) incl. Benign prostatic obstruction (BPO). EAU Guidelines 2012, European Association of Urology 2012. European Association of Urology 2012. http://www.uroweb.org/gls/pdf/12_Male_LUTS_LR%20 23.05.2017
23. Tunçkıran A, Özkardeş H. Benign Prostat Hiperplazisinde Alfa Bloker Tedavisi ve Alfa Blokerlerin Geleceği. *Turk Urol Sem* 2010, 1: 1-4.
24. Caine M, Perlberg S, Meretyk S. A placebo-controlled, double- blind study of the effect of phenoxybenzamine in benign prostatic obstruction. *Br J Urol* 1978,50: 551-4.
25. Lepor H, Baumann M, Shapiro E. The alpha adrenoreceptor binding properties of terazosin in the human prostate and canine brain. *J Urol* 1988, 140: 664-7.
26. Ishizuka O, Nishizawa O, Hirao Y, Ohshima S. Evidence- based meta-analysis of pharmacotherapy for benign prostatic hypertrophy. *Int J Urol* 2002,9: 607-12.

27. Lepor H, Auerbach S, Pures-Baez A, Narayan P, Soloway M, Lowe F, et al. A randomized multicenter placebo-controlled study of efficacy and safety of terazosin in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 1992, 148: 1467-74.
28. Kohn IJ, Kaplan SA. Medical management of benign prostatic hyperplasia. *Atlas of Clinical Urology: The Prostate*; 1999: 1-16.
29. Kirby RS. Doxazosin in the treatment of obstruction of the lower urinary tract. *Textbook of Benign Prostatic Hyperplasia*; 1996:287-93.
30. Andersson KE, Lepor H, Wyllie MG. Prostatic alpha-1 adrenoceptors and uroselectivity. *Prostate* 1997, 30: 202-15.
31. Hofner K, Jonas U. Alfuzosin: a clinically uroselective alpha-1 blocker. *World J Urol* 2002, 19: 405-12.
32. Jardin A. Alfuzosin. *Textbook of Benign Prostatic Hyperplasia*; 1996: 429-41.
33. Taguchi K, Saitoh M, Sato S, Asano M, Michel MC. Effects of tamsulosin metabolites at alpha-1 adrenoceptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 1997,280:1-5.
34. Miyazawa Y, Blum RA, Schentag JJ, Kamimura H, Matsushima H, Swartz H, et al. Pharmacokinetics and safety of tamsulosin in subjects with normal and impaired renal and hepatic function. *Curr Ther Res Clin Exp* 2001, 62: 603-21.
35. Zhao X, Liu Y, Xu J, Zhang D, Zhou Y, Gu J, Cui Y. Determination of silodosin in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*.2009 877(29): 3724-3728.
36. Harischandran S, Iyer RS, Raju R, Shibi A, Sayana PS. Validated stability indicating RP-HPLC method for the determination of Silodosin in pharmaceutical dosage form. *Inter. J. Pharma. Res. Sch.*2012, 1: 141-145.

37. Aneesh T P, Rajasekaran A. Development and validation of HPLC method for the estimation of silodosin in bulk and pharmaceutical dosage form. *Inter. J. Biol. Pharma. Res.* 2012, 3: 693-696.
38. Chinnalalaiah R, Ravikumar P. Development and validation of RP-HPLC method for estimation of silodosin in bulk and pharmaceutical dosage forms. *Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2012, 16: 52-55.
39. Sayana P S, Iyer RS, Shibi A, Harischandran S. Development and validation of HPTLC method for quantification of Silodosin in bulk and pharmaceutical dosage form. *The Pharma Innovation*, 2012, 1: 10.
40. RAJASEKARAN, A. Method development and validation for the estimation of sildosin in bulk and pharmaceutical dosage forms using UV-VIS spectrophotometry. *Asian Journal Of Pharmaceutical and Clinical Research*, 2012, 5(4): 150-152.
41. Goud VM, Rao AS, Ranjan SP, Shalini SD, Sowmya S, Bhoga B. Method development and validation of RP-HPLC method for assay of Sildosin in pharmaceutical dosage form. *Inter. J. Pharma. Sci.* 2013, 3: 194-196.
42. Mounika CH, Umadevi N, Sudheerbabu I. New visible spectrophotometric methods for the estimation of silodosin in pharmaceutical formulations. *Inter. J. Res. Pharmacy. Chem.* 2013, 3: 595-597.
43. Jahan KK, Malipatil SM. Development and validation of new HPLC method for the quantitative estimation of silodosin in bulk and pharmaceutical formulation: 2013, 3(3): 960-969
44. Shah HP, Khandar A, Deshpande S, Bagad S. (2014). Novel RP-HPLC method for simultaneous estimation of Silodosin and Dutasteride in multiunit solid dosage form. *Res. J. Pharma. Biol. Chem. Sci.* 2013, 5: 801-810.

45. PrachiBhamre, Sadhana J. Rajput. "Spectrofluorimetric method for the determination of silodosin in bulk and pharmaceutical dosage form." *Indo American Journal of Pharmaceutical Research* Hacettepe Üniversitesi, **2014**,4.10 : 5106-5110.
46. Jahan KK, Malipatil SM. Development and validation of new spectrophotometric methods for the quantitative estimation of silodosin in bulk drug and pharmaceutical formulations. *Int J of Pharm Res & Analy*2014,1(4):65-69.
47. Quantitative Analysis Of Silodosin İn Capsule Using Uv Spectrofotometry And Rp-HPLC METHOD : Application To Dissolution Testing.*Int.J. of Advances İn Pharmaceutical Science*2013, 4(6):1479-1491
48. Shaik JV, Saladi S, Sait, SS. Development of stability-indicating UHPLC method for the quantitative determination of silodosin and its related substances. *Journal of chromatographic science*,2013:1-8
49. Skoog DA, Leary JJ. *Principles of Instrumental Analysis*, 4th Edition. New York. Harcourt Brace College Publishers, 1998: 116-706.
50. Gündüz T. İnstrümental Analiz, 6. Baskı. Ankara, Gazi Kitapevi, 2002:101- 1273.
51. Atila A. Bazı non steroidal antiinflamatuvar ilaçların ratlarda oral uygulama sonrası kan adrenalin düzeyleri üzerine etkisi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Doktora tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2011
52. Wiberg K. Multivariate spectroscopic methods for the analysis of solutions. Department of Analytical Chemistry, Arrhenius Laboratory, Stockholm University,2004.<http://www.divaportal.org/smash/get/diva2:189424/FULLTEXT01.pdf>.04.06.2017
53. Demirkaya F. A, E ve K vitaminlerinin farmasötik preparatlarda, insan plazmasında ve tavşan plazmasında farklı analitik yöntemlerle miktar analizi. Sağlık Bilimleri

- Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Doktora tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2009.
54. Analitik Kimya II Laboratuvar Aletli Analiz Deneyleri, Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Ankara, 2005.
55. Skoog DA, Holler FJ, Timothy AN. Principles of Instrumental Analysis. Tercüme: Kılıç E, Köseoğlu F, Yılmaz H. Enstrümental Analiz İlkeleri, Ankara. Bilim Yayıncılık, 1998, 299-777.
56. <http://www.agilent.com/en-us/products/liquid-chromatography/analytical-lc-systems>.23.05.2017.
57. Skoog, DA, Holler JF, Nieman TA. *In Principles Of Instrumental Analysis, Molecular Mass Spectrometry*, Philadelphia, Saunders College Publishing, 1998:498-534.
58. Öztürk YE. JWH-018 ve Metabolitlerinin LC-MS/MS ile Kan ve İdrarda Tayinleri. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul:İstanbul Üniversitesi, 2014.
59. Şener H. Topraktan Nitramin, Nitroaromatik ve Nitrat Ester Grubu Patlayıcıların LC-MS/MS İle Tayini. Adli Tıp Enstitüsü, Fen Bilimleri Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul:İstanbul Üniversitesi, 2013.
60. Atila, A. HPLC'nin Biyoanalitik Yöntem Validasyonu. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi ,2006.
61. Validation of Analytical Procedures. Proceedings of the International Conference on Harmonisation (ICH), Commission of the European Communities, 1996.

62. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation .Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center, 2001.
63. Yıldız A, Genç O, Bektaş S. *Enstrümental Analiz Yöntemleri*, 2. Baskı. Ankara, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 1997: 417-419.
64. Albayrak M, Atipik Antipsikotik Bir İlaç Olan Olanzapin'in Farmasötik Preparatlarda Ve Biyolojik Ortamlarda Biyoanalitik Yöntem Validasyonu. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Erzurum,2014



EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Sinan YERLİ
Doğum Tarihi: 11.02.1986
Doğum Yeri: Erzurum
Medeni Hali: Evli
Uyruğu: T.C.
Adres: Şükrüpaşa Mahallesi Çaykur Caddesi Erzurum Eczanesi
Tel: 0532 738 9810
Faks:
E-mail: sinanyerli@hotmail.com
Eğitim
Lise: Erzurum Anadolu Lisesi (2004)
Lisans: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (2005-2010)
Yüksek Lisans:
Doktora: Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim dalı (2011-2018)
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce: İngilizce
Almanca:
Rusça:
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
TEB(TÜRK ECZACILAR BİRLİĞİ)
İlgi Alanları ve Hobiler

EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU



**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP
FAKÜLTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**



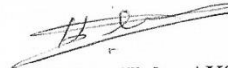
Bölümü : Dekanlık
Servisi : Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
Sayı : B.30.2.ATA.0.01.00/186
Konu : Etik Kurul Kararı

09.04.2015

Sayın:Sinan YERLİ
Eczacılık Fakültesi
Analitik Kimya Anabilim Dalı
Doktora Öğrencisi

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 08.04.2015 tarih ve 3 nolu toplantısında, hazırlamış olduğunuz **“Silodosin Etkin Maddesinin Farklı Ortamlarda Miktar Tayini için Yeni Analitik Yöntemlerin Geliştirilmesi ve Validasyonlarının Yapılması”** isimli bilimsel tez çalışması protokolü ve ekli belgeleri gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler ile gönüllü bilgilendirme metni dikkate alınarak incelenmiş ve çalışmanın Etik Kurallara uygun olduğuna mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.


Prof.Dr.Hülya AKSOY
Etik Kurul Başkanı

Eki :
1 Adet Etik Kurul Kararı