

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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**NATEGLİNİDİN FARMASÖTİK PREPARATLARDA
SPEKTROFLUORİMETRİK MİKTAR TAYİNİ**

NEVRUZ ORÇUN ÖZÇELİK

**DANIŞMAN
PROF.DR. SEVGİ TATAR ULU**

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI**

İSTANBUL-2015

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında Nevruz Orçun Özçelik tarafından hazırlanan Nateglinidin Farmasötik Preparatlarda Spektrofluorimetrik Miktar Tayini başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

23 / 07 / 2015

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Prof. Dr. Serap Sağlık Aslan (İstanbul Üni., Eczacılık Fak., Analitik Kimya A.D.)	
2.Prof. Dr. Ufuk Kolak (İstanbul Üni., Eczacılık Fak., Analitik Kimya A.D.)	
3. Prof. Dr. Zeynep Aydoğmuş (İstanbul Üni., Eczacılık Fak., Analitik Kimya A.D.)	
4.Prof. Dr. Durişehvar Ünal (İstanbul Üni., Eczacılık Fak., Analitik Kimya A.D.)	
5.Doç. Dr. Fikriye T. Elmalı (Yıldız Teknik Üni., Fen-Edb. Fak., Anorganik Kimya A.D.)	

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

NEVRUZ ORÇUN ÖZÇELİK

(İmza)



ITHAF

Aileme ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılmasına olanak sağlayan, desteğini hiç esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Serap Sağlık Aslan'a;

Çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, samimiyeti ile yanımda olan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Sevgi Tatar Ulu'ya;

Desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen sevgili aileme, Anabilim Dalımız Öğretim Üyelerine ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	Xİ
ABSTRACT.....	Xİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Nateglinid.....	2
2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	2
2.1.2. Farmakolojisi	4
2.1.3. Analiz Yöntemleri.....	6
2.1.3.1. Farmasötik Preparatlarda Yapılan Analizler	6
2.1.3.2. Biyolojik Sıvılarda Yapılan Analizler.....	7
2.2. Dansil Klorür Hakkında Genel Bilgi ve Bu Belirteç ile Yapılan Çalışmalar	8
2.2.1. Analiz Yöntemleri.....	9
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	14
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler	14
3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler	14
3.1.2. Çözeltiler.....	14
3.2. Aletler ve Diğer Gereçler	16
3.3. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Çalışmalar	17
3.3.1. Türevlendirme için Reaksiyon Koşullarının Belirlenmesi.....	17
3.3.1.1. Ekstraksiyon Çözücüsü	17
3.3.1.2. pH.....	17
3.3.1.3. Sıcaklık ve Reaksiyon Süresi	17

3.3.1.4. Belirteç Miktarı	18
3.3.1.5. Türevin Dayanıklılığı	18
3.3.1.6. Sulu Çözeltilerde Ölçü Eğrisinin Hazırlanması	18
3.4. Tabletlerde Nateglinid Miktar Tayini	19
3.4.1. Spektrofluorimetrik Yöntem ile	19
3.4.2. Kıyas Yöntemi ile	19
3.5. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu	20
3.5.1. Doğrusallık.....	20
3.5.2. Gözlenebilme (LOD) ve Tayini (LOQ) Sınırları	21
3.5.3. Kesinlik ve Doğruluk	21
3.5.4. Robustness (Yöntemin Sağlamlığı)	21
3.5.5. Seçicilik.....	22
4. BULGULAR.....	23
4.1. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Çalışmalar	23
4.1.1. Nateglinidin Dansil Klorür ile Reaksiyon Koşullarının İncelenmesi	23
4.1.1.1. Ekstraksiyon Çözücüsü	23
4.1.1.2. pH.....	25
4.1.1.3. Sıcaklık ve Reaksiyon Süresi	26
4.1.1.4. Belirteç Miktarı	27
4.1.1.5. Türevin Dayanıklılığı	28
4.1.1.6. Sulu Çözeltilerde Hazırlanan Ölçü Eğrisinin Regrasyon Analizi	29
4.1.1.7. Geliştirilen Yöntem ile Tabletlerde Nateglinid Tayini ve Sonuçların Kıyas Yöntemi ile Elde Edilen Sonuçların Karşılaştırılması	31
4.2. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu	32
4.2.1. Doğrusallık.....	32
4.2.2. Tanıma (LOD) ve Tayin (LOQ) Sınırları	32
4.2.3. Kesinlik ve Doğruluk	33
4.2.4. Robustness (Yöntemin Sağlamlığı)	35
4.2.5. Seçicilik.....	38
5. TARTIŞMA	39
6. KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	48

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 4-1: Nateglinid-Dansil türevinin çeşitli organik çözücülerdeki maksimum eksitasyon (λ_{eks}) ve emisyon (λ_{em}) dalga boyları ile floresans şiddeti değerleri	23
Tablo 4-2: Çeşitli pH larda oluşturulan nateglinid-dansil türevine ait floresans şiddeti değerleri	26
Tablo 4-3: Çeşitli sıcaklık ve zamanlarda oluşturulan nateglinid-dansil türevine ait floresans şiddeti değerleri	27
Tablo 4-4: Çeşitli hacimlerdeki dansil klorür miktarına karşı oluşan nateglinid-dansil türevine ait floresans şiddeti değerleri	28
Tablo 4-5: Nateglinid-dansil türevinin diklorometandaki dayanıklılığı	29
Tablo 4-6: Nateglinidin Spektrofluorimetrik tayini için 25-250 ng/mL konsantrasyon aralığında sulu çözeltide hazırlanan ölçü eğrilerine ait floresans şiddeti değerleri ve istatistik verileri	30
Tablo 4-7: Tablo 4-6 daki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler	30
Tablo 4-8: 120 mg Nateglinid içeren tabletlerin analiz sonuçları ve sonuçların istatistiki olarak değerlendirilmesi	32
Tablo 4-9: Tablo 4-7'deki değerlere göre hazırlanan LOD ve LOQ değerleri	33
Tablo 4-10: Aynı Gün İçinde Yapılan Analizlerin Tekrarlanabilirliği	34
Tablo 4-11: Günler arası yapılan analizlerin tekrarlanabilirliği	35
Tablo 4-12: Yöntemin Sağlamlığının incelenmesinde elde edilen sonuçlar 33	36

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Nateglinidin kimyasal formülü	2
Şekil 2-2: Nateglinidin 50 µg/mL konsantrasyonda metanolde (1), asetonitrilde (2) ve suda (3) 200-300 nm aralığında alınmış UV spektrumu.....	3
Şekil 2-3: Nateglinidin FT-IR Spektrumu	3
Şekil 2-4: Dansil Klorürün açık kimyasal formülü.....	9
Şekil 4-1: 100 ng/mL nateglinide eşdeğer nateglinid-dansil türevinin diklorometandaki emisyon spektrumu ($\lambda_{em} = 517$ nm)	24
Şekil 4-2: 100 ng/mL nateglinide eşdeğer nateglinid-dansil türevinin diklorometandaki eksitasyon spektrumu ($\lambda_{eks} = 397$ nm)	24
Şekil 4-3: Boşun emisyon spektrumu	25
Şekil 4-4: Nateglinid-dansil türevinin oluşumu üzerine pH nın etkisi	26
Şekil 4-5: Nateglinid-dansil türevinin oluşması üzerine sıcaklık ve zaman etkisi	27
Şekil 4-6: Nateglinid-dansil türevi oluşumu üzerine belirteç miktarının etkisi.....	28
Şekil 4-7: Nateglinidin 25-250 ng/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi	31

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPTLC	: Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi
UV	: Ultraviyole
LOQ	: Tayin sınırı
LOD	: Gözlenebilme Sınırı
CZE	: Kapiler Bölge Elektroforezi
ICH	: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı
I.D.	: İç yarıçap
GC-MS	: Gaz Kromatografisi/ Kütle Spektrometrisi
SD	: Standart Sapma
RSD	: Bağıl Standart Sapma
FT-IR	: Fourier Dönüşümlü İnfrared
LC-ESI-MS	: Sıvı kromatografisi-Elektrosprey İyonizasyon-Kütle Spektrometrisi
UPLC-ESI-MS/MS	: Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi-Elektrosprey İyonizasyon-Tandem Kütle Spektrometresi
UPLC/QTOF-MS	: Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi/kuadrapol Uçuş zamanlı kütle spektrometresi
LC-ESI-QIT-MS	: Sıvı Kromatografisi-Elektrosprey Kudrapol İyon Trap kütle Spektrometrisi spektrometrisi
DAD	: Fotodiyod array dedektör

ÖZET

Özçelik N. O. (2015) Nateglinidin Farmasötik Preparatlarda Spektrofluorimetrik Miktar Tayini. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Bu çalışmada, nateglinid miktar tayini için duyarlı bir spektrofotometrik yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntem primer ve sekonder aminlerin türevlendirilmesinde spesifik bir belirteç olan 5-dimetilamino-naftalen-1-sülfonil klorür (dansil klorür) ile nateglinidin türevlendirilmesine dayanmaktadır. Bu türevlendirme reaksiyonunun optimum koşulları incelendiğinde reaksiyonun pH 11.0 de, 40 °C de ve 10 dakika içerisinde belirteç/nateglinid mol oranı 16 olduğunda kantitatif olarak yürüdüğü belirlendi. Reaksiyonun tamamlanmasından sonra türev diklorometan ile ekstre edildi ve fluoreans şiddeti 517 nm emiyon ve 397 nm eksitasyon dalga boylarında ölçüldü.

Geliştirilen yöntem tabletlerdeki nateglinid miktar tayinine uygulandı ve sonuçlar farmakope yöntemi (USP XXXIV) ile elde edilen sonuçlarla t- ve F- testleri kullanılarak istatistiksel olarak kıyaslandı. İki yöntem arasında ortalamalar ve standart sapmalar yönünden % 95 olasılık düzeyinde anlamlı bir fark bulunmadı.

Anahtar Kelimeler: Nateglinid, 5-(dimetilamino) naftalen-1-sülfonil klorid (Dansil Klorür), Türevlendirme, Miktar tayini, Spektrofotometri.

ABSTRACT

Özçelik N. O. (2015). Spectrofluorimetric Assay of Nateglinid in pharmaceutical preparations. Istanbul University, Institute of Health Sciences, Department of Analytical Chemistry. Master Thesis. Istanbul.

In this study, Selective assay methods have been presented for the analysis of nateglinide in tablets. The assay involves derivatization with 5-(dimethylamino) naphthalene-1-sulfonyl chloride (dansyl chloride) which is a specific reagent in the analysis of primary and secondary amines. Optimum conditions of the reaction between nateglinide and dansyl chloride were investigated and it was found that the reaction proceeds quantitatively at pH 11.0, 40 °C in 10 min when the mole ratio of reagent to the drug was 16. After the completion reaction, the derivative was extracted with dichloromethane from the reaction medium and the fluorescence intensity was measured at 517 nm with excitation at 397nm.

The developed method was successfully applied to the assay of gabapentin in tablets and the results were compared statistically with those obtained by pharmacopeia method (USP XXXIV). There is no significant difference between the two methods in the respect of mean values and the standard deviations at 95 % confidence level.

Key Words: Nateglinide, 5-(dimethylamino)naphthalane-1-sulfonyl chloride (Dansyl Chloride), Derivatization, Determination, Spectrofluorimetric method.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nateglinid, kimyasal ve farmakolojik bakımdan diğer antidiyabetiklerden farklı olan bir aminoasit (fenilalanin) türevidir. Erken faz insülin salgılanmasını sağlayarak, yemekten sonraki kan şekeri ve HbA_{1c} yükselmesini azaltır

Erken faz insülin salgılanması, normal glisemi kontrolünün devam ettirilmesi açısından temel bir mekanizmadır.

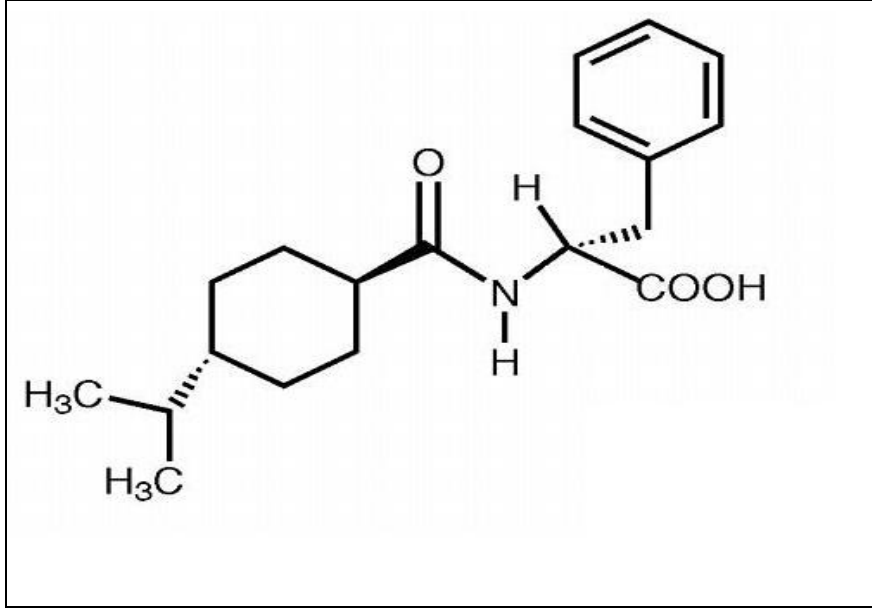
Primer ve sekonder amin grubu içeren ilaç etken maddelerinin analizleri için geliştirilen yöntemler genellikle türevlendirme ile yapılır. Bu amaçla bu tezde türevlendirme ajanı olarak dansil klorür kullanılmıştır (1).

Nateglinid için dansil klorür ile türevlendirerek basit duyarlı ve güvenilir bir analiz yöntemi geliştirilmesi, geliştirilen yöntemlerin validasyonlarının yapılması ve kombinasyon olarak bu ilaç maddesinin farmasötik preparatlardaki analizine uygulanması düşünüldü. Bu doğrultuda spektrofotometrik bir yöntem geliştirildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nateglinid

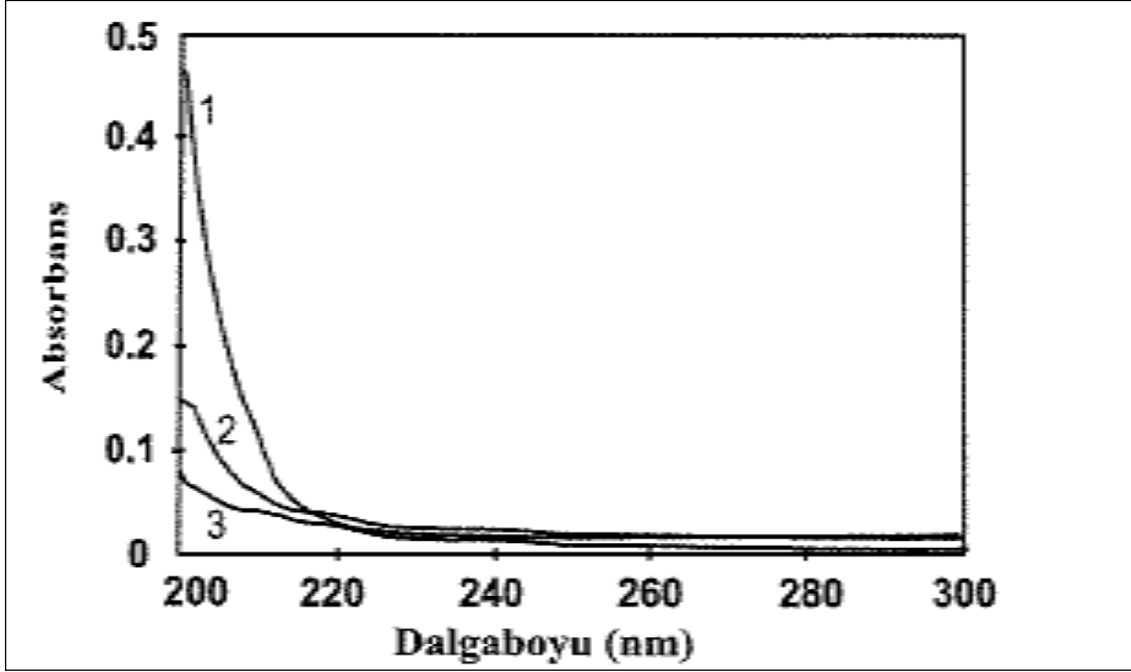
2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



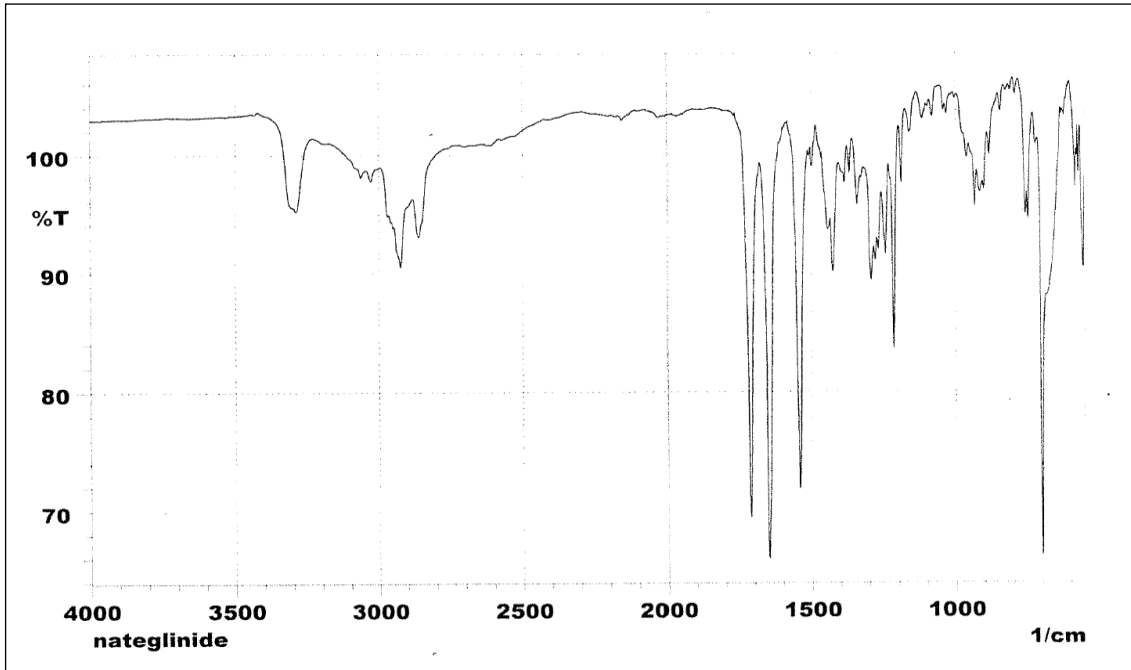
Şekil 2-1: Nateglinidin kimyasal formülü

Nateglinidin kimyasal formülü, N-(trans-4-isopropilsikloheksil-karbonil)-D-fenilalanin kapalı formülü ise $C_{19}H_{27}NO_3$ dir. Nateglinidin molekül ağırlığı, 317.423 g/moldür. Kokusuzdur. pK_{a1} 4,0 ve pK_{a2} -0,38. Nateglinid metanol ve etanolde kolay, asetonitril ve oktanolde az, suda çok az çözünen beyaz toz halinde etken maddedir. Erime noktası 139 °C'dır (2).

Nateglinidin çeşitli çözücülerde alınan UV spektrumu Şekil 2-2 de verilmiştir. Ayrıca nateglinide ait Fourier dönüşümlü İnfrared (FT-IR) Spektrumu Şekil 2-3 de verilmiştir.



Şekil 2-2: Nateglinidin 50 µg/mL konsantrasyonda metanolde (1), asetonitrilde (2) ve suda (3) 200-300 nm aralığında alınmış UV spektrumu



Şekil 2-3: Nateglinidin FT-IR Spektrumu

2.1.2. Farmakolojisi

Nateglinid, kimyasal ve farmakolojik bakımdan diğer antidiyabetiklerden farklı olan bir aminoasit (fenilalanin) türevidir. Erken faz insülin salgılanmasını sağlayarak, yemekten sonraki kan şekeri ve HbA1c yükselmesini azaltır.

Erken faz insülin salgılanması, normal glisemi kontrolünün devam ettirilmesi açısından temel bir mekanizmadır. Nateglinid, yemekten önce alındığında, tip 2 diyabet hastalarında ortadan kalkmış olan, erken veya ilk faz insülin salgılanmasını yeniden sağlar. Bu etki, pankreastaki beta-hücrelerinde bulunan K⁺atp kanalıyla hızla gerçekleşen, geçici bir etkileşim sayesinde meydana gelir. Elektro fizyoloji çalışmaları nateglinidin pankreas beta-hücrelerindeki K⁺atp kanallarındaki selektivitesinin, kardiyovasküler hücrelerdeki K⁺atp kanallarındaki selektivitesinin 300 katından daha fazla olduğunu göstermiştir. Tip 2 diyabetik hastalarda nateglinidin oral olarak verilmesini takip eden 15 dakika içerisinde yemeğe karşı insülinotropik yanıt meydana gelmektedir. Bu gelişme yemek sonrasındaki kan glukoz düzeyi yükselmelerini engeller. İnsülin düzeyleri 3-4 saat içerisinde başlangıç değerine dönerek gecikmiş hipoglisemiye eşlik ettiği gösterilmiş olan yemek sonrası hiperinsülinemiye azaltır.

Pankreastaki beta-hücrelerinde nateglinid etkisiyle gerçekleşen insülin salgılanması, kandaki glukoz düzeylerine göre ayarlanır ve glukoz düzeyleri düştükçe, salgılanan insülin miktarı da azalır. Aksine yemeklerle birlikte glukoz infüzyonu uygulanması, insülin salgısının açıkça artmasıyla sonuçlanır. Nateglinid'in plazma glukoz düzeyleri düşük olduğunda insülin salgılanmasını daha az uyarması, örneğin bir öğün atlandığı zamanlarda görülebilecek hipoglisemiye karşı, ilave bir korunma sağlar (3).

Klinik çalışmalarda nateglinidin tek başına kullanılması, HbA1c ve yemek sonrası kan şekeri düzeyi ölçümleriyle de gösterildiği gibi, gliseminin daha iyi kontrol altına alınmasıyla sonuçlanmıştır. Öncelikle açlık kan şekeri üzerinde etkili bir ilaç olan metforminle birlikte kullanıldığında HbA1c üzerindeki etkinin, etki mekanizmalarının birbirini tamamlayıcı nitelikte olması nedeniyle, her iki ilacın tek başına kullanılmasına kıyasla daha fazla olduğu (sinerjik etki) gözlemlenmiştir.

Nateglinidin insülin duyarlılığını artıran bir ilaç olan troglitazon ile birlikte kullanılması, her 2 ilacın tek başlarına kullanılmasına kıyasla HbA1c düzeylerinin istatistik anlam taşıyacak şekilde daha fazla düzelmesiyle sonuçlanmıştır.

En az 3 ay boyunca yüksek doz sülfonilürelerle stabilize olmuş durumdaki hastaların doğrudan doğruya nateglinid monoterapisine başlayarak bu ilacı 24 hafta süreyle kullandığı bir çalışmada, FPG ve HbA_{1c} düzeylerinin artmasından da anlaşıldığı gibi glisemi kontrolünde azalma meydana gelmiştir.

Nateglinid, kimyasal ve farmakolojik bakımdan diğer antidiyabetiklerden farklı olan bir aminoasit (fenilalanin) türevidir. Oral uygulamayı takiben hızla emilir, biyoyararlanımı % 72 olarak bulunmuştur. Nateglinidin etki mekanizması; erken faz insülin salgılanmasını sağlamak, yemekten sonraki kan şekeri ve HbA_{1c} yükselmesini azaltmaktır.

Emilim:

Nateglinid içeren tabletlerin yemekten önce alınmasından sonra nateglinid, hızla emilerek 1 saatten daha kısa bir süre içerisinde plazmadaki ortalama maksimum düzeylere (C_{maks}) ulaşır. Oral solüsyon içerisindeki nateglinid, hızla ve neredeyse tamamen (%90) emilir. Mutlak oral biyoyararlanım oranının %72 olduğu hesaplanmıştır. Yemeklerden sonra verilmesi nateglinidin emilme derecesini (EAA değerini) etkilemez. Ancak C_{maks} değerinde azalma ve doruk plazma konsantrasyon süresinde (t_{maks}) gecikme ile karakterize olan emilim hızında gecikme meydana gelir. Bu nedenle nateglinid içeren tabletler yemekten önce alınması önerilmektedir. İlaç genellikle yemekten önceki 1 dakika içerisinde alınır, ama yemekten önceki 30 dakika içerisinde de alınabilir. (1 dakika önce alınması emilim gecikmesini etkilemez. Önce verilmesinin nedeni postprandial glisemiye azaltmak içindir).

Dağılım:

Nateglinidin intravenöz veriler göz önünde tutularak hesaplanan, kararlı plazma düzeylerindeki dağılım hacminin, yaklaşık 10 litre olduğu bulunmuştur. In vitro çalışmalar nateglinidin, öncelikle albümin ve daha az olarak alfa-1 asit glikoprotein olmak üzere serum proteinlerine yüksek oranda (%97-99) bağlandığını göstermiştir. Bu bağlanmanın derecesi, 0.1-10 pg nateglinid /mL arasında değişen test sınırları içerisinde, ilacın plazma konsantrasyonuna bağlı olarak şekillenmemiştir.

Biyotransformasyon:

Nateglinid, vücuttan uzaklaştırılmadan önce, karma fonksiyonlu oksidaz sistemi tarafından geniş kapsamlı olarak metabolize edilir. İnsanlardaki başlıca nateglinid metabolitleri; izopropil yan-zincirinin metil karbonu ya da metil gruplarından birinde hidroksilasyonu sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu ana metabolitlerin aktivitesi, asıl

molekölün aktivitesinin sırasıyla 5-6 da biri ve üçte biri kadardır. Minör metabolitler ise bir diol, bir izopropen ve nateglinidin açıl glukuronidi şeklindedir; bunlardan yalnızca izopropen, aktiviteye sahiptir ve bu aktivite, neredeyse nateglinidin aktivitesi kadar güçlüdür. Gerek in vitro gerekse in vivo deneylerden elde edilen veriler nateglinidin öncelikle (%70 oranında) sitokrom P450 (CYP) 2C9 izoenzimi; daha az olarak da CYP3A4 tarafından metabolize edildiğini göstermektedir.

Eliminasyon:

Nateglinid ve metabolitleri, vücuttan hızla ve tamamen atılır. I4C ile işaretlenmiş nateglinidin dozunun yaklaşık %75'i, dozu izleyen 6 saat içerisinde idrara çıkmış durumdadır. Karbon-14 ile işaretlenmiş nateglinid dozunun büyük bölümü (%83'ü) idrarla, bir diğer %10'u dışkıyla vücuttan atılır. Dozun %6-16 sı, hiç değişmeden idrara çıkar. Gönüllülerin ve tip 2 diyabet hastalarının katıldığı bütün çalışmalarda nateglinidin plazma konsantrasyonları hızla azalmış ve eliminasyon yarı-ömrü ortalama 1.5 saat olmuştur. Günde 3 defa 240 miligrama kadar çıkan dozlar kullanıldığında, eliminasyon yarı-ömrünün kısa olmasına uygun bir şekilde nateglinid birikmemektedir.

Doğrusallık / Doğrusal olmayan durum:

1 hafta boyunca her yemekten önce 60-240 mg arasında nateglinid kullanan tip 2 diyabet vakalarındaki nateglinid farmakokinetiğinin, hem EAA hem C_{maks} değerleri bakımından lineer karakter taşıdığı ve maksimum plazma konsantrasyonlarına ulaşılması için geçen sürenin (t_{maks}). doza bağlı olarak değişmediği görülmüştür (4).

2.1.3. Analiz Yöntemleri

2.1.3.1. Farmasötik Preparatlarda Yapılan Analizler

Lakshmi ve arkadaşları tarafından bildirilen bir çalışmada farmasötik preparatlarda nateglinid HPLC yöntemiyle tayin edilmiştir. Ayrılma Gemini C₁₈ kolonda ve pH 3.0 fosfat tamponu:metanol (60:40) mobil faz sistemi ile yapılmıştır. Doğrusallık 0.06-6.00 µg/mL olarak verilmiştir. Dedeksiyon 235 nm de UV dedektör kullanılarak kullanılarak yapılmıştır (5).

Madhavi ve arkadaşlarının farmasötik preparatlarda nateglinid tayini için HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Ayrılma C₈ kolon ve fosfat tamponu (pH 3.0)-asetonitril (50:50) mobil faz sistemiyle gerçekleştirilmiştir. Dedeksiyon 210 nm de UV dedektör olarak belirtilmiştir (6).

Sagar ve arkadaşları farmasötik preparatlarda nateglinidi görünür bölgede tayin etmişlerdir. Reaksiyon alkali ortamda sitrik asid-asetik anhidrit reaktifi ile gerçekleştirilmiştir. Renkli türev 580 nm de tayin edilmiştir. Doğrusallık 2-28 µg/mL olarak bildirilmiştir (7).

Kale ve arkadaşları tabletlerde nateglinidi HPTLC yöntemi ile tayin etmişlerdir. Yöntemde n-hekzan- metanol -2-propanol (7.5:1.5:1) içeren mobil faz sistemi ve silika jel 60 F(254) HPTLC plakaları kullanılmıştır (8).

Sangaraju ve arkadaşları tarafından bildirilen bir çalışmada nateglinid enantiyomerler Chiralpak AD-H kolonda ve hekzan-etanol (90:10) mobil fazı sistemi ile kullanılarak tayin edilmiştir. Dedeksiyon 210 nm de UV dedektör ile yapılmıştır. L-nateglinide gözlenebilme ve tayin sınırı 0.3 ve 1.0 µg/mL olarak belirlenmiştir (9).

Karasakal ve Ulu tarafından bildirilen bir çalışmada farmasötik preparatlarda nateglinid NBD-Cl ile türevlendirilip, spektrofotometrik yöntemle tayin edilmiştir, Doğrusallık 50-500 ng/mL konsantrasyon aralığındadır (10).

2.1.3.2. Biyolojik Sıvılarda Yapılan Analizler

Malli ve arkadaşları tarafından bildirilen çalışmada insan plazmasında nateglinid tayini için kumarin ile türevlendirme yapılmıştır. Türev HPLC yöntemi ile tayin edilmiştir. Ayrılma etil asetat-dietil eter (50:50) mobil faz sistemi ve Hipersil BDS-C₈ kolonu ile gerçekleştirilmiştir. Dedeksiyon 345 nm eksitasyon, 435 nm emisyon dalga boylarında floresans dedektör ile yapılmıştır. Yöntemin doğrusallığı 0.05-16 µg/mL dir(11).

Maddi ve arkadaşları nateglinidin enantiyomerlerinin sıçan bağırsağında tayini için geliştirdikleri HPLC yönteminde kiral kolon ve 100mM KH₂PO₄ (pH 2.5)-asetonitril (32:68) mobil faz sistemini kullanmışlardır. Dedeksiyon 210 nm UV dedektörü ile yapılmıştır. Doğrusallık 0.5 - 50 µg/mL olarak verilmiştir(12).

Sankalia ve arkadaşları tavşan plazmasından nateglinid tayini için geliştirdikleri HPLC yönteminde C₁₈ kolon ve mobil faz sistemi olarak asetonitril-10 mM fosfat tamponu (pH 3.0) (70:30) kullanmışlardır. Çalışma aralığı 10-2500 ng/mL olarak verilmiştir(13).

Bauer ve arkadaşları insan plazmasında nateglinidi tayin etmek için HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Yöntemde ProntoSIL 120-5-C₁₈ AQ kolonu ve 0.1 M potasyum hidrojen fosfat (pH 4.0)-metanol-asetonitril (700:80:300) mobil faz sistemi

kullanılmıştır. Dedeksiyon 210 nmde UV dedektör ile yapılmıştır. Yöntemin gözlenebilme sınırı 0.1 µg/mL olarak saptanmıştır (14).

Qi ve arkadaşları nateglinid etken maddesinin analizi için geliştirdikleri HPLC yönteminde OD-R kolon 0.6 mol/L sodyum perklorat-asetonitril (48: 52, v/v, pH 2.0) mobil faz sistemini kullanmışlardır. Gözlenebilme sınırı 0.3 µg/mL ve tayin sınırı 1.0 µg /mL olarak bildirilmiştir(15).

Han ve arkadaşları insan plazmasında nateglinid tayini için LC-ESI-MS yöntemi geliştirmişler ve bu geliştirdikleri yöntemi biyoeşdeğerlik çalışmalarında uygulamışlardır. Doğrusallık 0.05-16 µg/mL olarak bildirilmiştir (16).

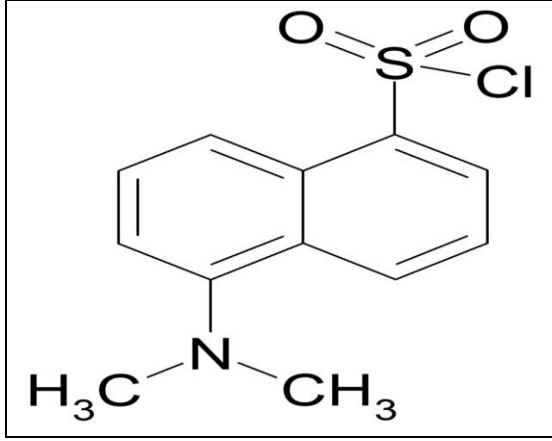
Varanasi ve arkadaşları nateglinid ve silostazolün sıçan plazmasında tayini için LC-MS/MS yöntemini geliştirmişlerdir. Tayin C₁₈ kolon ve asetonitril: 2 mM amonyum asetat tamponu (pH 3.4) (90: 10) içeren mobil faz sistemiyle gerçekleştirilmiştir. Doğrusallık 20-2000 ng/mL olarak verilmiştir(17).

He ve arkadaşları tarafından bildirilen bir çalışmada tavşan serumunda nateglinid tayini için geliştirdikleri LC/MS spektrometrisi yönteminde Zorbax C-18 kolonu kullanılmıştır(18).

Yan ve arkadaşları hayvan plazmasında nateglinidi miseller elektrokinetik kromatografisi yöntemi ile tayin etmişlerdir. Dedeksiyon 214 nm de UV detektör ile yapılmıştır. Yöntemin doğrusallığı 0.2-7 mg/L olarak verilmiştir(19).

2.2. Dansil Klorür Hakkında Genel Bilgi ve Bu Belirteç ile Yapılan Çalışmalar

Dansil klorürün kimyasal adı 5-dimetilamino-naftalen-1-sülfonil klorür olup kapalı formülü C₁₂H₁₂ClNO₂S dır. Molekül ağırlığı, 269,75 g/mol dür. Dansil klorür aseton ve suda kolay çözünen, sarı-oranj renkte kristalize bir tozdur. Dansil klorür primer ve sekonder aminlerle, fenolik hidroksil gruplarıyla kuvvetli fluoresans gösteren türevler oluşturur (20).



Şekil 2-4: Dansil Klorürün açık kimyasal formülü

2.2.1. Analiz Yöntemleri

Aydoğmuş ve arkadaşlarının geliştirdikleri yöntemde tabletlerden ve insan plazmasından aliskiren dansil klorür ile türevlendirilip spektrofotometrik yöntemle tayin edilmiştir. Türevin floresans şiddeti 501 nm emisyon ve 378 nm eksitasyon dalga boylarında ölçülmüştür(21).

Karasakal ve Ulu tarafından geliştirilen spektrofotometrik yöntemde nizatidin dansil klorür ile türevlendirilip farmasötik preparatlarda tayin edilmiştir. Dansil türevi 513 nm emisyon ve 367 nm eksitasyon dalga boylarında ölçülmüştür. Doğrusallık 25-300 ng/mL olarak verilmiştir(22).

Karasakal ve Ulu insan plazması ve idrarda amoksapini dansil klorür ile türevlendirip spektrofotometrik olarak tayin etmişlerdir. Doğrusallık plazma için 250-2500 ve 50-1250 ng/mL olarak bildirilmiştir. Türevin floresans şiddeti 397 nm (eksitasyon)/514 nm (emisyon) dalga boylarında ölçülmüştür(23).

Abd El-Ghaffar ve arkadaşları farmasötik preparatlarda fenoterol ve ritodrin dansil klorür ile türevlendirip spektrofotometrik yöntemle tayin yapmışlardır. Emisyon dalga boyları 517 nm ve 515 nm, eksitasyon dalga boyları 348 nm ve 345 nm olarak verilmiştir. Doğrusallık 0.25-6.0 µg/mL olarak bildirilmiştir(24).

Aksamija ve arkadaşları doğal reçinelerdeki triterpenoidlerin analizi için HPLC yöntemi kullanmışlardır. Dansil türevleri 347 nm eksitasyon dalga boyu ve 530 nm emisyon dalga boyunda floresans dedektör ile analiz edilmiştir(25).

Higashi ve arkadaşları yan yana dört butirofenon tayini için HPLC yöntemini önermişlerdir. Kolon öncesi dansil klorür ile türevlendirilme yapılmıştır. Tayinde C₁₈ kolon ve metanol- su- asetik asit (650:350:4) içeren mobil faz sistemi kullanılmıştır(26).

Wang ve arkadaşları geliştirdikleri HPLC yönteminde insan idrarında sistin dansil klorür ile türevlendirilmiştir. HPLC yönteminde C₁₈ kolonu ve mobil faz olarak 0.05M sodyum asetat-metanol (35:65) sistemi kullanılmıştır. Gözlenebilme sınırı 0.3 mg/L, doğrusallık ise 1-500 mg/L dir(27).

Romero ve arkadaşları biyojenik aminleri dansil klorür ile türevlendirip türevlerin analizinde HPLC yöntemini kullanmışlardır. Dedeksiyon 340 nm eksitasyon ve 520 nm emisyon dalga boylarında floresans dedektör ile yapılmıştır(28).

Higashi ve arkadaşlarının geliştirdikleri HPLC yönteminde antidepresanlar dansil klorür ile türevlendirilmiştir. Dedeksiyon 370 nm eksitasyon dalga boyu ve 506 emisyon dalga boylarında floresans dedektör ile yapılmıştır(29).

Dugo ve arkadaşları kırmızı şarapta biyojenik aminlerin analizi için dansil klorür ile türevlendirme yapmışlardır. Geliştirilen HPLC yönteminde 254 nm de DAD dedektör kullanılmıştır. Konsantrasyon aralığı 0.10 to 0.80 µg/mL olarak verilmiştir(30).

Lamshoeft ve arkadaşları insan idrarında morfini dansil klorür ile türevlendirmişlerdir. Analiz için LC/MS kullanmışlardır. Gözlenebilme sınırı 35 fmol/mL ve tayin sınırı 87.5 fmol/mL olarak verilmiştir(31).

Gong ve arkadaşları insan serumunda icariini dansil klorür ile türevlendirip LC-MS/MS yöntemiyle tayin etmişlerdir. Doğrusallık 10pg/ml-4ng/mL dir(32).

Beach ve arkadaşları domoik asidin dansil klorürle türevlendirme işlemini gerçekleştirmiş ve türevleri LC-MS/MS yöntemi ile tayin etmişlerdir. Geri kazanım aralığı (83-107%) ve RSD ≤ 5% olarak verilmiştir(33).

Yao ve arkadaşları idrarda benzo[a]piren ve 3-hidroksibenzo[a]piren dansil klorür ile türevlendirilip, tayin LC-MS/MS yöntemiyle yapılmıştır. Doğrusallık 0.25-40.0 pg/mL olarak bildirilmiştir(34).

Nirogi ve arkadaşları katekolaminleri tayin etmek için kolon öncesi türevlendirmede dansil klorür kullanmışlardır. Tayin LC-MS/MS ile yapılmıştır. Kolon olarak C₁₈ kolon kullanmışlardır. Tayin sınırları 0.068 pmol/mL and 0.059 pmol/mL olarak bildirilmiştir(35).

Dillen ve arkadaşları bakteri ve memeli hücre sistemlerinde azid ve azidoalanin dansil klorürle türevlendirip LC-MS/MS yöntemiyle tayin etmişlerdir. Yöntemin tayin sınırı 10.0 ng/mL olarak bildirilmiştir(36).

Salomonsson ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada midyede β -N-metilamin-L-alanin dansil klorür ile türevlendirilmiştir. Dansil türevi UPLC-ESI-MS/MS ile analiz edilmiştir(37).

Wang ve arkadaşları süt ve süt tozundaki endokrin bozucu kimyasalları (progesteron, androjen, östrojenler ve fenoller) dansil ile türevlendirip oluşan türevleri UPLC/QTOF-MS yöntemiyle tayin etmişlerdir(38).

Lin ve arkadaşlarının geliştirdikleri LC-ESI/MS/MS yönteminde insan plazmasında piperazini tayin etmek için dansil klorür ile kolon öncesi türevlendirme yapmışlardır. Yöntemde C18 kolonu ve 10mM amonyum asetat tamponu (pH 3.0)-metanol (50:50) içeren mobil faz sistemi kullanılmıştır. Doğrusallık 0.1-15 μ g/mL olarak bildirilmiştir(39).

Beaudry ve arkadaşları vanillin tayini için LC-ESI/MS/MS yöntemi önermişlerdir. Türevlendirme dansil klorür ile yapılmıştır. Tayin C18 kolonda ve asetonitril: %0.5 lik formik asit (75:25) içeren çözeltisi mobil faz sistemiyle yapılmıştır(40).

Beaudry ve arkadaşları propofolü dansil klorürle türevlendirmiş ve bu analiz için LC-ESI/MS/MS yöntemini kullanmışlardır. Analiz C18 kolonda ve asetonitril- 0.5% formik asit (80:20) içeren mobil faz sistemiyle yapılmıştır. Doğrusallık 20-20,000 ng/mL olarak verilmiştir(41).

Yine Beaudry ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada fare plazmasında eugenol tayini için LC-ESI-QIT yöntemi geliştirmişlerdir. Ayrılma C8 kolonda ve mobil faz sistemi olarak asetonitril-%0.1 formik asit (75:25) kullanılmıştır. Yöntemin doğrusallığı 100-20,000 ng/mL olarak verilmiştir(42).

Maraschiello ve arkadaşları köpek plazmasında antitümör ajanları dansil klorür ile türevlendirmişlerdir. Türevler HPLC yöntemi ile C18 kolonda ve asetonitril:su (95:5) içeren mobil faz sistemiyle yapılmıştır(43).

Kwakman ve arkadaşları serumda oestradiol tayini için dansil klorür ile türevlendirme yapmışlardır. HPLC ile analiz yapılmıştır. LOD 5×10^{-10} M olarak bildirilmiştir (44).

Wang ve arkadaşları bazı nitroaminleri dansil klorürle türevlendirip oluşan türevleri HPLC ile tayin etmişlerdir. Ayrılma C18 kolon ve asetonitril:su (73:27) içeren mobil faz sistemi ile yapılmıştır. Dedeksiyon 530 nm emisyon ve 350 nm eksitasyon dalga boylarında floresans dedektör ile yapılmıştır (45).

Nirogi ve arkadaşları dopamin ve norepinefrin tayini için dansil klorürle geliştirdikleri türevlendirme reaksiyonundan sonra türevleri LC-MS ile analiz etmişlerdir. Ayrılma C18 kolon ile yapılmıştır. Doğrusallık dopamin için 0.068–13.614 pmol/mL ve norepinefrin için 0.059–11.893 pmol/mL dir (46).

Wang ve arkadaşları insan idrarında amfetamin analizi için geliştirdikleri HPLC yönteminde dansil klorür ile türevlendirme yapmışlardır ve ayırmayı ODS kolonda asetonitril/su (70:30) mobil faz sistemi ile gerçekleştirmişlerdir (47).

Clausing ve arkadaşları plazma, beyin dokusu ve beyinde D-fenfluramin, D-norfenfluramin and fluoksetin tayininde dansil klorür kullanmışlardır. Ayrılma HPLC ile C18 kolonda yapılmıştır. Dedeksiyon eksitasyon dalga boyu 375 nm emisyon dalga boyu 470 nm de floresans dedektör ile yapılmıştır (48).

Saaida ve arkadaşları yiyeceklerdeki biyojen aminlerin tayininde dansil klorür ile türevlendirme yapmışlardır. Türevler HPLC ile analiz edilmiştir. Doğrusallık 0.1-5 µg/mL olarak verilmiştir (49).

Lin Cai ve arkadaşları insan idrarında monoamidlerin ve amino asitlerin tayini için UPLC–MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir (50).

Kang ve arkadaşları biyolojik numunelerden nöroaktif proteinlerin tayini için geliştirdikleri dansil klorür ile türevlendirme yönteminde ayırmayı C18 kolonda HPLC ile gerçekleştirmişlerdir (51).

Maraschiello ve arkadaşları köpek plazmasında antitumor ajanların tayininde dansil klorür kullanmışlardır. Ayırmayı HPLC de C18 kolonda gerçekleştirmişlerdir. Mobil faz olarak asetonitril-su (95:5) kullanılmıştır. Dedeksiyon 254 nm dalga boyunda yapılmıştır (52).

Lamshöft ve arkadaşları idrardan morfin tayini için dansil klorürle türevlendirmeden sonra LC–MS/MS ile analiz etmişlerdir. LOQ 87.5 fmol/ml (25 pg/ml) ve LOD 35 fmol/ml (10 pg/ml) olarak tespit edilmiştir (53).

Cohen ve arkadaşları robenidinin türevlendirme ile analizi için dansil klorürü kullanmışlardır. Dedeksiyon eksitasyon dalga boyu 320 nm ve emisyon dalga boyu 485 nm de floresans dedektör ile yapılmıştır. LOD 0.4 µg/mL olarak verilmiştir (54).

Omar ve arkadaşları insan plazmasından antidepresan ilaçların tayini için geliştirdikleri spektrofotometrik yöntemde eksitasyon dalga boyu 347 nm ve emisyon dalga boyu 450 nm verilmiştir. Doğrusallık 0.02–0.14 µg/mL dir (55).

Ding ve arkadaşları 2-hidroksipiridin N-oksit tayini için dansil klorür ile türevlendirme yöntemini kullanmışlardır. Ayrılma LC–MS/MS ile C₁₈ kolonda yapılmıştır. Doğrusallık 0.1–25 ng/mL olarak bildirilmiştir (56).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda 2014-2015 yılında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler

3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler:

- ✓ Nateglinid (Deva İlaç, İstanbul, Türkiye)
- ✓ Dansil Klorür (Sigma Aldrich, Missouri, USA)
- ✓ Starliks Tablet ® (120 mg Nateglinid, Basel, İsviçre)
- ✓ Metanol (HPLC saflığında) (Merck, Darmstadt, Almanya)
- ✓ Diklorometan (Sigma Aldrich, Missouri, USA)
- ✓ Aseton (Sigma Aldrich, Missouri, USA)
- ✓ Susuz sodyum sülfat (Merck, Darmstadt, Almanya)
- ✓ Ultra saf su (HPLC saflığında)
- ✓ Sodyum bikarbonat (Merck)
- ✓ Sodyum hidroksit (Merck)

3.1.2. Çözeltiler

1. Nateglinid Çözeltisi

Stok Çözeltisi: 100 mg nateglinid 100 mL lik balonjojeye aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı (1 mg/mL). Hazırlanan bu çözeltinin 10 mL si 100 mL lik balon jojeye aktarıldı ve su ile hacmine tamamlandı (100 µg/mL). Çalışmalarda su ile seyreltilen 10 µg/mL konsantrasyonunda nateglinid içeren çözelti kullanıldı.

2. Dansil Klorür Çözeltisi

Reaksiyon koşullarının belirlenmesinde dansil klorürün 0,2 mg/mL konsantrasyonda asetonda hazırlanmış çözeltisi kullanıldı.

3. Tampon Çözeltiler

50 mL 0,1 M sodyum bikarbonat çözeltisine gerekli miktarlarda 0,1 M NaOH ilave edilerek pH sı 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 12,0 olan tampon çözeltileri hazırlandı.

3.2. Aletler ve Diğer Gereçler

1. Spektrofluorimetre (Shimadzu RF-1501)
2. Spektrofotometre (Shimadzu UV-160A)
3. 1 cm'lik kuartz küvetler (QS 1000) (10x10x45 mm)
4. 1 cm'lik cam küvetler (OS 1000) (10x10x45 mm)
5. pH metre (WTW pH 526)
6. HPLC aleti
 - CBM 10A sistem kontrol ünitesi
 - LC 10 AT pompa
 - SPD- 10 A UV- Visible absorbans dedektör
 - LC Solution Software
 - DGU- 2A Helyumlu gaz giderme ünitesi
7. C₁₈ Analitik kolon (Hypersil BDS 4,6 x 150 mm 5 µm parçacık büyüklüğü)
8. Teraziler (Denver Instrument TB 2150)
9. Vorteks Mikser (Elektro-mag)
10. Ultrasonik banyo (Bransonic 221)
11. Termostatlı su banyosu (Memmert WB 10)
12. Ultra saf su cihazı (Younglin instrument)
13. Santrifüj (Janetzki T 5)
14. Otomatik pipetler (Eppendorf 100 µL ve 1000 µL lik)
15. Reaksiyon tüpleri (Vidalı, kapaklı 12mL lik)
16. Balonjojeler (5, 10, 25, 50 ve 100 mL lik)
17. Dereceli ve transfer pipetler
18. Süzgeç kağıtları (mavi bantlı)
19. Hesap makinesi (Casio fx-3600P)

3.3. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Çalışmalar

3.3.1. Türevlendirme için Reaksiyon Koşulların Belirlenmesi

Yapılan literatür incelemelerinde dansil klorür ile primer ve sekonder amin grubu içeren maddeler arasındaki reaksiyonun alkali pH larda, sıcakta ya da oda sıcaklığında yürüdüğü ve oluşan türevin organik bir çözücü ile ekstre edildikten sonra floresans şiddetinin ölçümünün yapıldığı görülmüştür. Literatürdeki bilgiler doğrultusunda, nateglinid ile dansil klorür arasındaki reaksiyonun en iyi hangi koşullarda yürüdüğünü saptamak amacıyla aşağıda yer alan denemeler yapıldı.

3.3.1.1. Ekstraksiyon Çözücüsü

10 µg/mL konsantrasyondaki nateglinid stok çözeltisinden 100 µL reaksiyon tüplerine alındı üzerine 100 µL pH 11.0 sodyum bikarbonat tamponu ve 100 µL dansil klorür çözeltilerinden ilave edildikten sonra 10 dakika 40 °C de su banyosunda ısıtıldı. Oluşan türev metanol, aseton, asetonitril, diklorometan ve kloroform gibi 5 farklı organik çözücüde ekstre edildi (3x2mL). 10 mL lik balonjojede birleştirilen organik fazlara susuz Na₂SO₄ ilave edildikten sonra hacmine ekstre edildiği organik çözücü ile tamamlandı. Aynı koşullarda hazırlanmış boş denemeye karşı spektrofotometre yardımıyla spektrumları alındı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.1.1 de verilmiştir. (C_{Nateglinid} = 100ng/ml)

3.3.1.2. pH

10 µg/mL konsantrasyondaki nateglinid çözeltisinden 100 µL reaksiyon tüplerine alındı. Daha sonra üzerine 100 µL çeşitli pH larda ki (8,5-12,0) sodyum bikarbonat tamponundan eklenip üzerine 100 µL dansil klorür ilave edildi. 10 dakika 40 °C de su banyosunda ısıtıldı. Soğutulan bu çözelti 3x2 mL diklorometan ile ekstre edildi. 10 mL lik balon jojeye alındı. Balon jojede birleştirilen organik fazlara susuz Na₂SO₄ ilave edildikten sonra hacmine diklorometan ile tamamlandı. Aynı koşullarda hazırlanmış boş denemeye karşı spektrofotometre yardımıyla spektrumları alındı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.1.2 de verilmiştir. (C_{Nateglinid} = 100ng/ml)

3.3.1.3. Sıcaklık ve Reaksiyon Süresi

10 µg/mL konsantrasyondaki nateglinid çözeltisinden 100 µL reaksiyon tüplerine alındı üzerine pH 11.0 sodyum bikarbonat tamponundan ilave edildi. Daha sonra üzerine 100 µL dansil klorür eklendi. Tüpler oda sıcaklığında, 40, 50, 60 °C

sıcaklıklarında 10, 20, 30, 40, 50, 60 dakika süreyle bekletildi. Soğutulan bu çözelti 3x2 mL diklorometan ile ekstre edildi. 10 mL lik balon jojeye alındı. Balon jojede birleştirilen organik fazlara susuz Na₂SO₄ ilave edildikten sonra hacmine diklorometan ile tamamlandı. Aynı koşullarda hazırlanmış boş denemeye karşı spektrofotometre yardımıyla spektrumları alındı. Elde edilen sonuçlar bölüm 4.1.1.3 de verilmiştir. (C_{Nateglinid} = 100ng/ml)

3.3.1.4. Belirteç Miktarı

10 µg/mL konsantrasyondaki nateglinid çözeltisinden 100 µL reaksiyon tüplerine alındı üzerine 100 µL pH 11.0 sodyum bikarbonat tamponundan eklendi. Üzerine 0,2 mg/mL konsantrasyondaki dansil klorür çözeltisinden 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 450, 500, 550 µL ilave edilip 10 dakika 40 °C de su banyosunda ısıtıldı. Soğutulan bu çözelti 3x2 mL diklorometan ile ekstre edildi. 10 mL lik balon jojeye alındı. Balon jojede birleştirilen organik fazlara susuz Na₂SO₄ ilave edildikten sonra hacmine diklorometan ile tamamlandı. Aynı koşullarda hazırlanmış boş denemeye karşı spektrofotometre yardımıyla spektrumları alındı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.1.4 de verilmiştir. (C_{Nateglinid} = 100ng/ml)

3.3.1.5. Türevin Dayanıklılığı

10 µg/mL konsantrasyondaki nateglinid stok çözeltisinden 100 µL reaksiyon tüplerine alındı üzerine 100 µL pH 11.0 sodyum bikarbonat tamponu ve 100 µL dansil klorür ilave edildi. 10 dakika 40 °C de su banyosunda ısıtıldı. Soğutulan bu çözelti 3x2 mL diklorometan ile ekstre edildi. 10 mL lik balon jojeye alındı. Balon jojede birleştirilen organik fazlara susuz Na₂SO₄ ilave edildikten sonra hacmine diklorometan ile tamamlandı. Aynı koşullarda hazırlanmış boş denemeye karşı spektrofotometre yardımıyla spektrumları alındı. 4 adet hazırlanan paralel numunelerin diklorometandaki çözeltilerinin şiddeti boş denemeye karşı ölçüldü. Sonra bu çözeltiler oda sıcaklığında gün ışığında, oda sıcaklığında karanlıkta ve karanlıkta +4 °C de 6, 24, 48, 72 saat bekletildikten sonra floresans şiddetleri ölçüldü. Elde edilen sonuçlar bölüm 4.1.1.5 de verilmiştir. (C_{Nateglinid} = 100ng/ml)

3.3.1.6. Sulu Çözeltide Ölçü Eğrisinin Hazırlanması

10 µg/mL konsantrasyondaki nateglinid stok çözeltisinden 25, 50, 100, 150 ve 250 µL reaksiyon tüplerine alındı üzerine 100 µL pH 11.0 sodyum bikarbonat tamponu

ve 400 µL dansil klorür ilave edildi. 10 dakika 40 °C de su banyosunda ısıtıldı. Soğutulan bu çözelti 3x2 mL diklorometan ile ekstre edildi. 10 mL lik balon jojeye alındı. Balon jodede birleştirilen organik fazlara susuz Na₂SO₄ ilave edildikten sonra hacmine diklorometan ile tamamlandı. Aynı koşullarda hazırlanmış boş denemeye karşı spektrofloreometre yardımıyla spektrumları alındı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.1.6 de verilmiştir.

3.4. Tabletlerde Nateglinid Miktar Tayini

3.4.1. Spektrofloreometrik Yöntem ile

10 adet tablet tek tek tartılıp, ortalama ağırlığı saptandı ve tabletler porselen havanda ince toz haline getirildi. 100 mg nateglinide eşdeğer tablet tozu hassas olarak tartılıp 100 mL lik balon jojeye aktarıldı, 50 mL metanol ile 45 dakika ultrasonik banyoda karıştırıldı metanol ile hacmine tamamlandı ($C_{\text{Nateglinid}} = 1 \text{ mg/mL}$). Bu çözeltiden 10 mL alınıp 100 mL lik balonjodede metanol ile hacmine tamamlandı ($C_{\text{Nateglinid}} = 100 \text{ µg/mL}$). Bu çözeltiden 10 mL alınıp, su ile 100 mL ye seyreltilti. ($C_{\text{Nateglinid}} = 10 \text{ µg/mL}$). 25-250 ng/mL konsantrasyon aralığına ait ölçü eğrisinin çalışma koşullarında gerekli miktarda nateglinid çözeltisinden 100 µL reaksiyon tüplerine alındı. Daha sonra üzerlerine 100 µL pH 11 sodyum bikarbonat tamponundan eklenip üzerlerine 100 µL dansil klorür ilave edildi. 10 dakika 40 °C de su banyosunda ısıtıldı. Soğutulan bu çözelti 3x2 mL diklorometan ile ekstre edildi. 10 mL lik balon jojeye alındı. Balon jodede birleştirilen organik fazlara susuz Na₂SO₄ ilave edildikten sonra hacmine diklorometan ile tamamlandı. Aynı koşullarda hazırlanmış boş denemelere karşı spektrofloreometre yardımıyla spektrumları alındı. Analiz işlemi 6 kez tekrarlandı. Nateglinid miktarı daha önce bu konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisinin denklemi yardımıyla hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.1.6 da verilmiştir.

3.4.2. Kıyas Yöntemi ile

Tabletlerde nateglinid miktar tayini için kıyas yöntemi olarak USP XXXIV de bulunan HPLC yöntemi esas alındı (Clit no: 3) (57)

Standart Çözelti: 72 mg nateglinid 100 mL lik balon jojeye aktarıldı ve üzerine 40 mL asetoniril ilave edildi. Üzerine 30 mL su ilave edilip iyice çalkalandı. Daha sonra da asetonitril ile hacmine tamamlandı (0,72 mg/mL)

Örnek çözelti: Bölüm 3.4.1 de anlatıldığı gibi ince toz haline getirilen tablet tozu tartılarak, konsantrasyonu 0,72 mg/mL olan örnek çözelti hazırlandı.

Kromatografik Sistem:

Dedektör: UV- Absorbans dedektör 210 nm

Akış Hızı: 1,5 mL/dak.

Kolon: Hypersil BDS C₁₈ kolon (4.6-mm x 15-cm; 5µm)

Mobil Faz: Asetonitril - % 0,05 lik Trifloroasetik Asit (23:27)

Enjeksiyon hacmi: 10 µL

Yöntem: Örnek ve standart çözeltilerinden ayrı ayrı 10 µL enjekte edildi. Mobil fazda elüsyon yapıldı. Majör piklerin alanı bulundu. Tabletteki nateglinid miktarı aşağıdaki formülle hesaplandı (mg cinsinden).

$$\% \text{Nateglinid} = (r_u/r_s) \times (C_s/C_u) \times 100$$

r_u = Örnek çözeltisinin pik alanı

r_s = Standart çözeltisinin pik alanı

C_s = Standart çözeltisinin konsantrasyonu (mg/mL)

C_u = Örnek çözeltisinin konsantrasyonu (mg/mL)

Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.1.7 de verilmiştir.

3.5. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

İlaç uygulamaları için Uluslararası Harmonizasyon Konferansında (ICH, *Internatinol Conference Harmonazation* Q2(R1); Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology) belirlenen parametreler incelendi(58).

3.5.1. Doğrusallık

Nateglinid çözeltilerine karşı floresans şiddetinin belli konsantrasyon aralığındaki doğrusallığını belirlemek için 5 farklı konsantrasyonda beşer adet çözeltiler hazırlandı. 10 µg/mL konsantrasyondaki nateglinid stok çözeltisinden 25, 50, 100, 150 ve 250 µL reaksiyon tüplerine alındı üzerine 100 µL pH 11.0 sodyum bikarbonat tamponu ve 400 µL dansil klorür ilave edildi. Doğrusallık sonuçlarının floresans şiddetleri, standart sapma, % RSD hesaplanarak grafiksel değerlendirilmesi yapıldı. Sonuçlar 4.2.1 de verilmiştir.

3.5.2. Gözlenebilme (LOD) ve Tayini (LOQ) Sınırları

Geliştirilen yöntemin hassasiyetini belirlemek için LOD ve LOQ değerleri aşağıdaki formüllerle hesaplandı. Hesaplanan değerler bölüm 4.2.2 de verilmiştir.

$$\text{LOD} = 3,3 \times \text{SD}/m$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \text{SD}/m$$

SD: Kalibrasyon doğrusunun y kesişiminin standart sapması

m: Kalibrasyon doğrusunun eğimi

3.5.3. Kesinlik ve Doğruluk

Gün içi Tekrarlanabilirlik

Üç farklı konsantrasyonda (25, 100 ve 250 ng/mL) nateglinid içeren çözeltilerden altışar adet hazırlamak için 10 µg/mL konsantrasyondaki nateglinid stok çözeltisinden 25, 100, 250 µL reaksiyon tüplerine alındı. 10 dakika 40 °C de su banyosunda ısıtıldı. Soğutulan bu çözeltiler 3x2 mL diklorometan ile ekstre edildi. 10 mL lik balon jojeye alındı. Balon jojede birleştirilen organik fazlara susuz Na₂SO₄ ilave edildikten sonra hacmine diklorometan ile tamamlandı. Aynı koşullarda hazırlanmış boş denemeye karşı spektrofotometre yardımıyla spektrumları alındı. Gün içinde herbirinin üçer kez floresans şiddeti değerleri ölçüldü. Bulunan sonuçlar 4.2.3 de verilmiştir.

Günler arası Tekrarlanabilirlik

Üç farklı konsantrasyonda (25, 100 ve 250 ng/mL) nateglinid içeren çözeltilerden altışar adet hazırlamak için 10 µg/mL konsantrasyondaki nateglinid stok çözeltisinden 25, 100, 250 µL reaksiyon tüplerine alındı. 10 dakika 40 °C de su banyosunda ısıtıldı. Soğutulan bu çözeltiler 3x2 mL diklorometan ile ekstre edildi. 10 mL lik balon jojeye alındı. Balon jojede birleştirilen organik fazlara susuz Na₂SO₄ ilave edildikten sonra hacmine diklorometan ile tamamlandı. Aynı koşullarda hazırlanmış boş denemeye karşı spektrofotometre yardımıyla spektrumları alındı. Analizler aynı hafta içinde birbirini takip eden 5 günde ve her defasında yeni çözeltilerle çalışılmak koşuluyla tekrarlandı. Bulunan sonuçlar sonuçlar 4.2.3 de verilmiştir.

3.5.4. Robustness (Yöntemin Sağlamlığı)

100 ng/mL konsantrasyondaki nateglinid çözeltisine 400±5 µL dansil klorür çözeltisi ilave edilerek, reaksiyon süresi 10±1 dakika değiştirilerek ve eksitasyon 397±1 ve

emisyona 517 ±1 dalga boylarında çözeltilerin floresans şiddeti ölçüldü. Elde edilen sonuçlar bölüm 4.2.4 de verilmiştir.

3.5.5. Seçicilik

120 mg nateglinid içeren tabletlerde bulunan Laktoz monohidrat, Kroskarmeloz sodyum, Mikrokristalin selüloz, Povidon, Hidroksipropil metil selüloz, Kolloidal silikon dioksit, Magnezyum stearat, Talk, Polietilen glikol 4000, Sarı demir oksit (E 172), Titanyum dioksit (E 171) gibi yardımcı maddelerin 10 µg.mL⁻¹ konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanıp 100 µL reaksiyon tüplerine alındı. Daha sonra üzerlerine 100 µL pH 11 sodyum bikarbonat tamponundan eklenip üzerlerine 100 µL dansil klorür ilave edildi. 10 dakika 40 °C de su banyosunda ısıtıldı. Soğutulan bu çözeltiler 3x2 mL diklorometan ile ekstre edildi. 10 mL lik balon jojeye alındı. Balon jojede birleştirilen organik fazlara susuz Na₂SO₄ ilave edildikten sonra hacmine diklorometan ile tamamlandı. Aynı koşullarda hazırlanmış boş denemelere karşı spektrofotometre yardımıyla spektrumları alındı. Sonuçlar bölüm 4.2.5 de verilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Çalışmalar

4.1.1. Nateglinidin Dansil Klorür ile Reaksiyon Koşullarının İncelenmesi

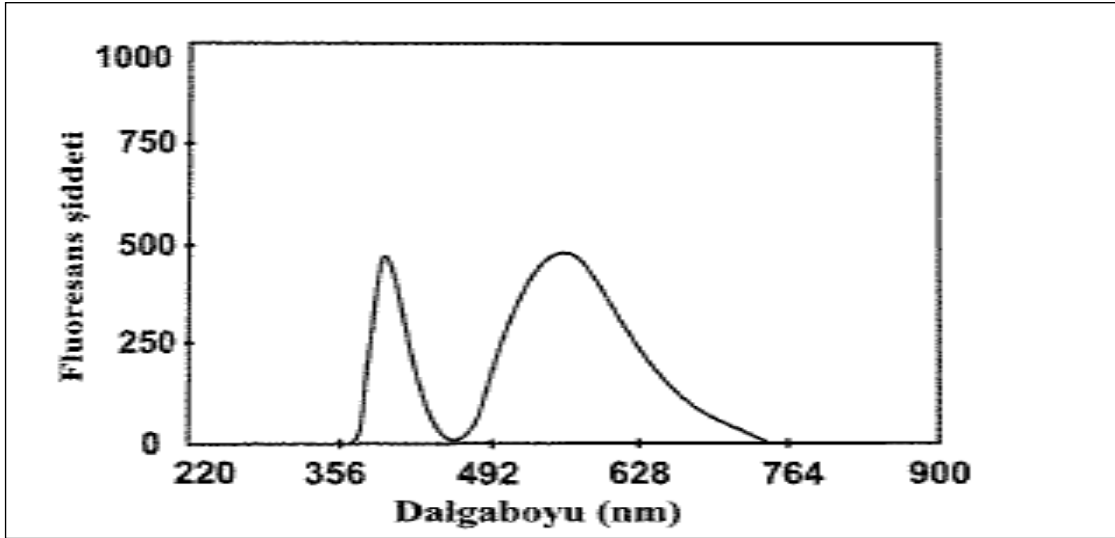
Nateglinid ile Dansil klorür arasındaki reaksiyon sonucu meydana gelen ve açık sarı renkli floresans gösteren nateglinid-dansil türevinin sulu ortamdan ekstre edilebilmesi için en uygun organik çözücü araştırıldı ve türevin oluşumu üzerine pH, sıcaklık, reaksiyon süresi, belirteç miktarı gibi parametrelerin etkisi incelendi.

4.1.1.1. Ekstraksiyon Çözücüsü

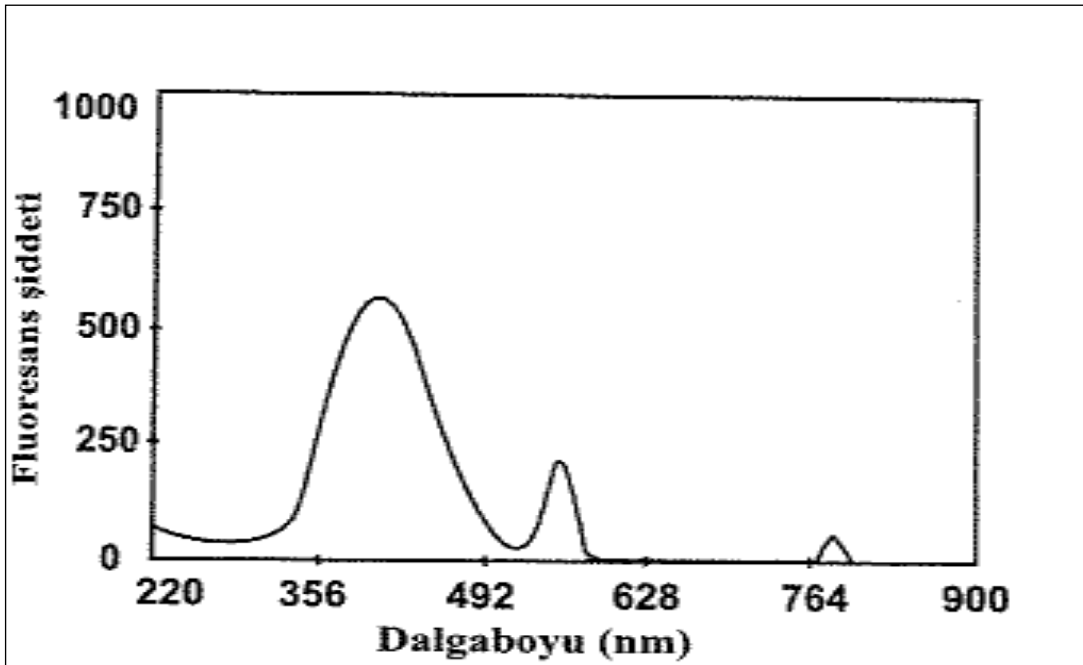
Nateglinidin dansil klorür ile oluşturduğu türevin sulu ortamdan ekstraksiyonu için en uygun organik çözücüyü saptamak için 100 ng/ml nateglinid çözeltisinden 100 µL reaksiyon tüplerine alındı. Daha sonra üzerlerine 100 µL pH 11 sodyum bikarbonat tamponundan eklenip üzerlerine 100 µL dansil klorür ilave edildi. 10 dakika 40 °C de su banyosunda ısıtıldı. Soğutulan bu çözeltiler 3x2 mL diklorometan ile ekstre edildi. 10 mL lik balon jojeye alındı. Balon jodede birleştirilen organik fazlara susuz Na₂SO₄ ilave edildikten sonra hacmine diklorometan ile tamamlandı. Aynı koşullarda hazırlanmış boş denemelere karşı spektrofotometre yardımıyla spektrumları alındı. Elde edilen türevin çeşitli çözücülerde floresans spektrumları alındı. Bu spektrumlarda nateglinid-dansil türevinin denenen organik çözücülerde gösterdiği maksimum eksitasyon ve emisyon dalga boyları ve floresans şiddeti değerleri elde edilmiştir. Tablo 4-1 de yer alan bu değerler incelendiğinde türevin ekstraksiyonu için en uygun çözücünün diklorometan olduğu saptanmıştır. Şekil 4.1 ve 4.2 de nateglinid-dansil türevinin diklorometandaki eksitasyon, emisyon ve Şekil 4.3 de boşun emisyon spektrumları görülmektedir.

Tablo 4-1: Nateglinid-Dansil türevinin çeşitli organik çözücülerdeki maksimum eksitasyon (λ_{eks}) ve emisyon (λ_{em}) dalga boyları ile floresans şiddeti değerleri

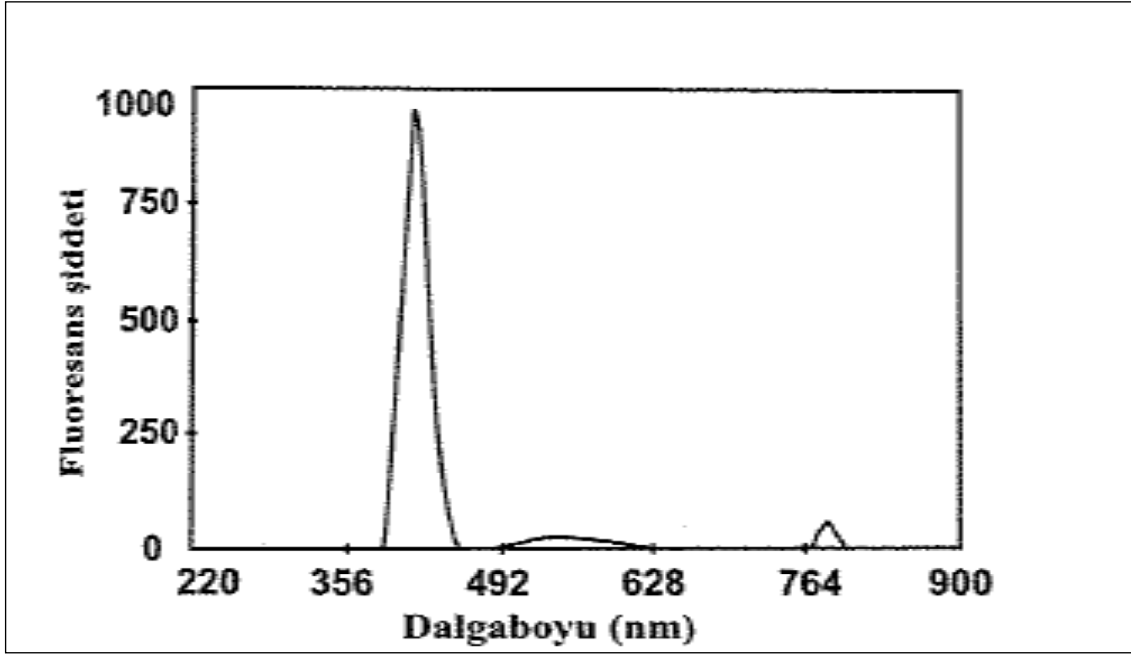
	$\lambda_{eks}/\lambda_{em}$ (nm)	Floresans Şiddeti
Metanol	401/532	193
Aseton	419/527	315
Asetonitril	419/531	385
Diklorometan	397/517	1007
Kloroform	404/502	953



Şekil 4-1: 100 ng/mL nateglinide eşdeğer nateglinid-dansil türevinin diklorometandaki emisyon spektrumu ($\lambda_{em} = 517$ nm)



Şekil 4-2: 100 ng/mL nateglinide eşdeğer nateglinid-dansil türevinin diklorometandaki eksitasyon spektrumu ($\lambda_{eks} = 397$ nm)

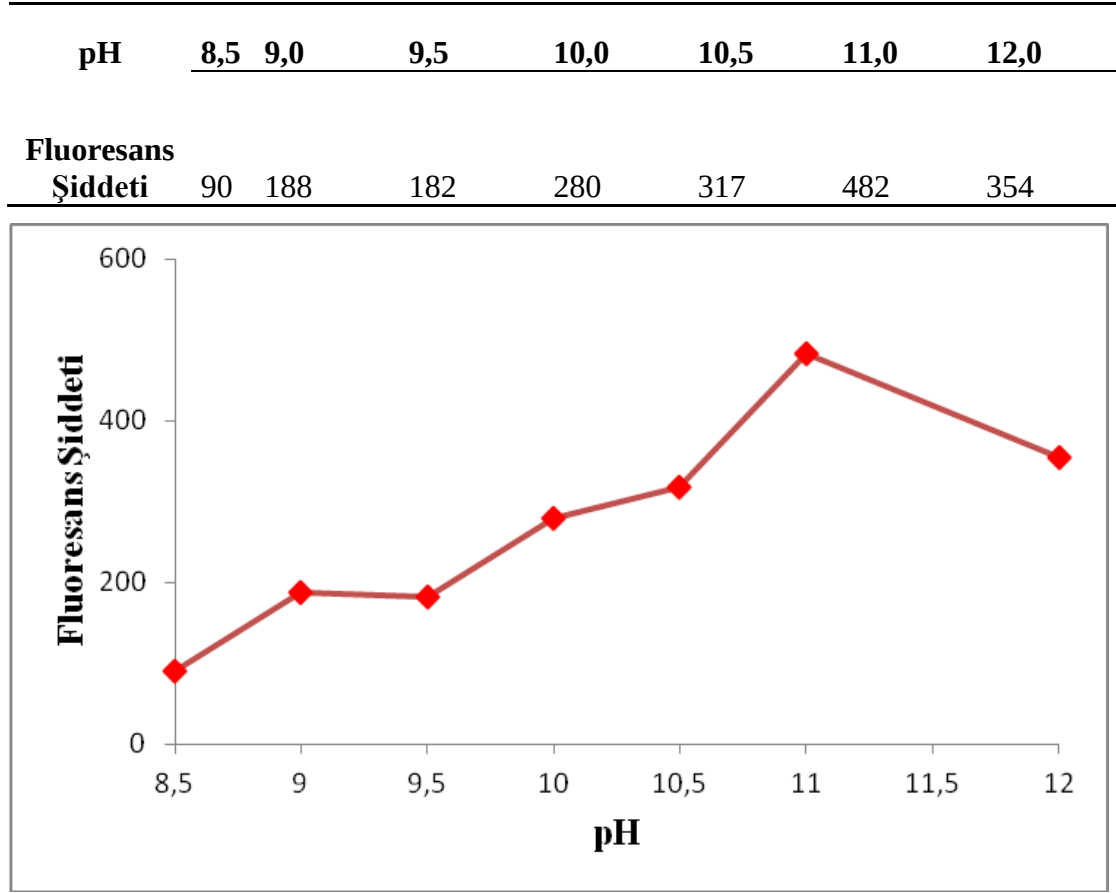


Şekil 4-3: Boşun emisyon spektrumu

4.1.1.2. pH

Nateglinid ile dansil klorür arasındaki reaksiyonun en iyi hangi pH da yürüdüğünü saptamak için 8,5-12,0 arasında hazırlanmış bir seri tampon çözeltiyle 100 ng/ml nateglinid çözeltisinden 100 μ L reaksiyon tüplerine alındı. Daha sonra üzerlerine 100 μ L 8,5-12,0 pH aralığında hazırlanmış sodyum bikarbonat tamponundan eklenip üzerlerine 100 μ L dansil klorür ilave edildi. 10 dakika 40 °C de su banyosunda ısıtıldı. Soğutulan bu çözeltiler 3x2 mL diklorometan ile ekstre edildi. 10 mL lik balon jojeye alındı. Balon jodede birleştirilen organik fazlara susuz Na_2SO_4 ilave edildikten sonra hacmine diklorometan ile tamamlandı. Aynı koşullarda hazırlanmış boş denemelere karşı spektrofotometre yardımıyla spektrumları alındı. Elde edilen veriler incelendiğinde nateglinid-dansil türevinin pH 11 de kantitatif olarak oluştuğu belirlenmiştir.

Tablo 4-2: Çeşitli pH larda oluşturulan nateglinid-dansil türevine ait floresans şiddeti değerleri



Şekil 4-4: Nateglidin-dansil türevinin oluşumu üzerine pH'nın etkisi

4.1.1.3. Sıcaklık ve Reaksiyon Süresi

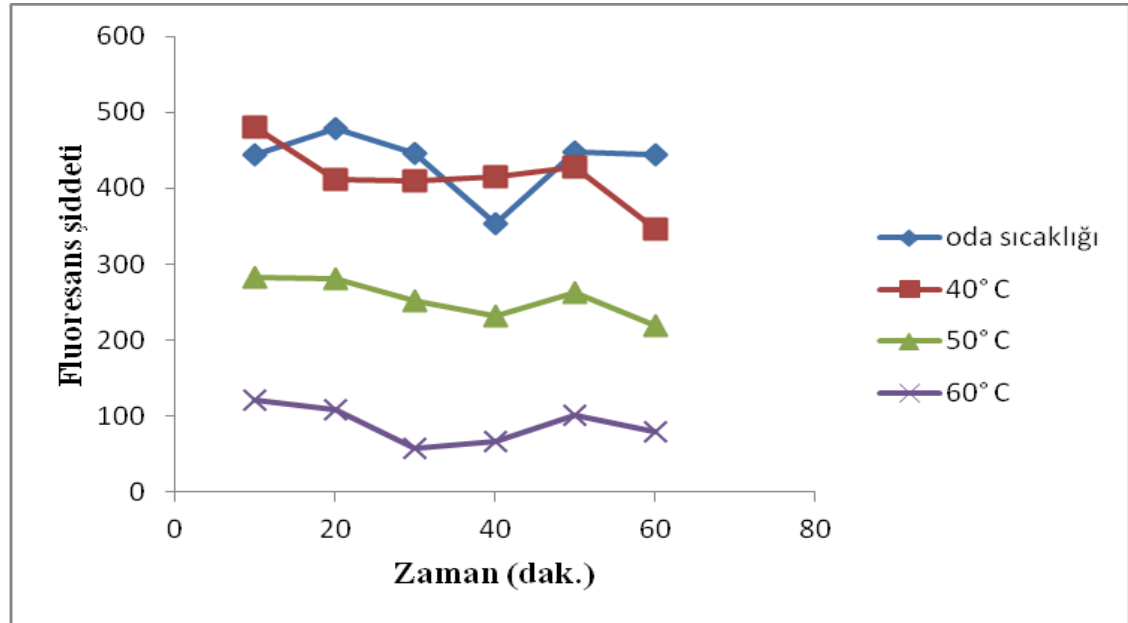
Nateglinid ile dansil klorür reaksiyonunun oluşması için en uygun sıcaklık ve reaksiyon süresini saptamak amacıyla 100 ng/ml nateglinid çözeltisinden 100 µL reaksiyon tüplerine alındı. Daha sonra üzerine 100 µL pH 11 sodyum bikarbonat tamponundan eklenip üzerine 100 µL dansil klorür ilave edildi. oda sıcaklığında, 40, 50 ve 60 °C sıcaklıklarında 10, 20, 30, 40, 50, 60 dakika süreyle çalışıldı. Soğutulan bu çözeltiler 3x2 mL diklorometan ile ekstre edildi. 10 mL lik balon jojeye alındı. Balon jodede birleştirilen organik fazlara susuz Na₂SO₄ ilave edildikten sonra hacmine diklorometan ile tamamlandı. Aynı koşullarda hazırlanmış boş denemelere karşı spektrofotometre yardımıyla spektrumları alındı.

Elde edilen nateglinid-dansil türevlerine ait floresans şiddeti değerlerinin, sıcaklık ve zamana karşı gösterdiği değişim Tablo 4.3 ve şekil 4.5 de verilmiştir. Bu verilere dayanarak, nateglinid ile dansil klorür arasındaki reaksiyonun tamamlanması

için optimum sürenin 40 °C de 10 dakika süreyle ısıtılmasının yeterli olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4-3: Çeşitli sıcaklık ve zamanlarda oluşturulan nateglinid-dansil türevine ait floresans şiddeti değerleri

Zaman \ Sıcaklık (C°)	10	20	30	40	50	60
Oda Sıc.	444	478	446	354	448	444
40	480	412	410	416	428	346
50	282	280	252	232	262	220
60	122	108	57	66	101	79



Şekil 4-5: Nateglinid-dansil türevinin oluşması üzerine sıcaklık ve zaman etkisi

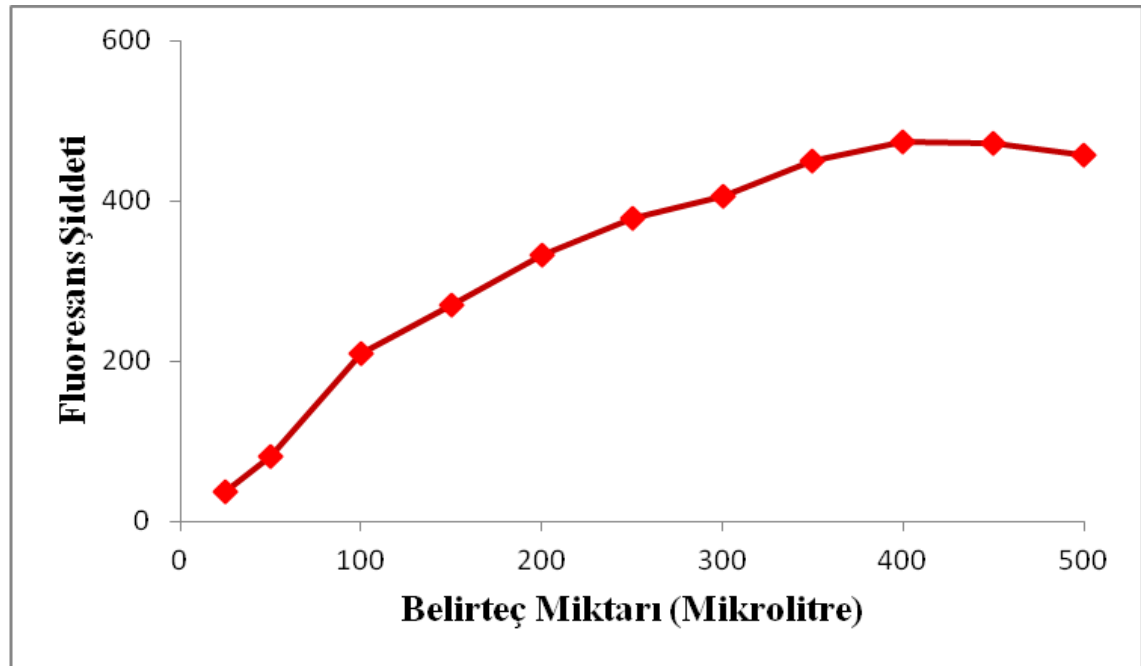
4.1.1.4. Belirteç Miktarı

Dansil klorür ile nateglinid arasındaki reaksiyonun maksimum oranda ürün vermesi için gerekli belirteç miktarını saptamak amacıyla 100 ng/ml nateglinid çözeltisi 100 µL reaksiyon tüplerine alındı. Daha sonra üzerlerine 100 µL pH 11 sodyum bikarbonat tamponundan eklenip üzerlerine 0.2 mg/ml konsantrasyondaki dansil klorürden hacmi 25-550 µL olacak şekilde hazırlanan bir seri belirteç çözeltisi ilave edildi. 40 °C 10 dakika süreyle su banyosunda bekletildi. Soğutulan bu çözeltiler 3x2 mL diklorometan ile ekstre edildi. 10 mL lik balon jojeye alındı. Balon jojede birleştirilen organik fazlara susuz Na₂SO₄ ilave edildikten sonra hacmine diklorometan ile tamamlandı. Aynı koşullarda hazırlanmış boş denemelere karşı spektrofotometre

yardımıyla spektrumları alındı. Tablo 4.4 ve Şekil 4.6 de nateglinid-dansil türevinin oluşması için optimum belirteç miktarının 400 μL olduğu belirlendi.

Tablo 4-4: Çeşitli hacimlerdeki dansil klorür miktarına karşı oluşan nateglinid-dansil türevine ait floresans şiddeti değerleri

Dansil Klorür Miktarı (μL)	25	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500	550
Floresans şiddeti	36	81	210	270	333	379	406	450	474	472	457	411



Şekil 4-6: Nateglinid-dansil türevi oluşumu üzerine belirteç miktarının etkisi

4.1.1.5. Türevin Dayanıklılığı

Nateglinid-dansil türevinin diklorometan çözeltisindeki dayanıklılığını incelemek üzere 100 ng/ml nateglinid çözeltisi 100 μL reaksiyon tüplerine alındı. Daha sonra üzerlerine 100 μL pH 11 sodyum bikarbonat tamponundan eklenip üzerlerine 400 μL belirteç çözeltisi ilave edildi. 40 $^{\circ}\text{C}$ 10 dakika süreyle su banyosunda bekletildi. Soğutulan bu çözeltiler 3x2 mL diklorometan ile ekstre edildi. 10 mL lik balon jojeye alındı. Balon jodede birleştirilen organik fazlara susuz Na_2SO_4 ilave edildikten sonra hacmine diklorometan ile tamamlandı. Aynı koşullarda hazırlanmış boş denemelere karşı spektrofotometre yardımıyla spektrumları alındı. Oda sıcaklığında gün ışığında, karanlıkta ve +4 $^{\circ}\text{C}$ de karanlıkta bekletilerek belirli sürelerde çözeltinin gösterdiği

fluoresans şiddeti değerleri tablo 4.5 de görülmektedir. Elde edilen veriler doğrultusunda türevin +4 °C de karanlıkta 48 saat dayanıklı olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4-5: Nateglinid-dansil türevinin diklorometandaki dayanıklılığı

	Fluoresans Şiddeti				
	Başlangıç	6 saat Sonra	24 saat Sonra	48 saat Sonra	72 saat Sonra
Oda Sıcaklığı Karanlık	423	417	400	364	321
Oda Sıcaklığı Gün Işığı	423	410	393	253	117
(+)4 °C de Karanlık	423	422	420	420	418

4.1.1.6. Sulu Çözeltide Hazırlanan Ölçü Eğrisinin Regrasyon Analizi

5 ayrı konsantrasyonda ve her bir konsantrasyon için 5 farklı kez Bölüm 3.3.1.6 da anlatıldığı gibi çalışıldı ve madde konsantrasyonu ile, fluoresans şiddeti arasında graafik çizilerek ölçü eğrileri her bir konsantrasyon aralığı için ayrı ayrı hazırlandı.

Ölçü eğrilerine en küçük kareler yöntemi uygulanarak doğru denklemi ve korrelasyon katsayısı (r) hesaplandı.

$$F=aC+b$$

Doğru denkleminde **C** ng/mL cinsinden konsantrasyon, **a** doğrunun eğimi, **b** intersept doğrunun ordinat eksenini kestiği noktanın sıfır noktasına olan uzaklığı, **F** ise fluoresans şiddetini bildirmektedir. Ölçümlerin sonuçları ve istatistiki hesaplamalar Tablo 4.6 ve 4.7 de verilmiştir.

Tablo 4-6: Nateglinidin Spektrofluorimetrik tayini için 25-250 ng/mL konsantrasyon aralığında sulu çözeltide hazırlanan ölçü eğrilerine ait floresans şiddeti değerleri ve istatistik verileri

C								SD	%RSD
No	(ng.mL ⁻¹)	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	Fort		
1	25	190	191	191	200	185	191,4	5,41	2,83
2	50	257	257	257	280	275	265,2	11,37	4,29
3	100	419	419	419	450	425	426,4	13,45	3,15
4	150	570	570	570	600	590	580,0	14,14	2,44
5	250	846	846	846	900	895	866,6	28,26	3,26

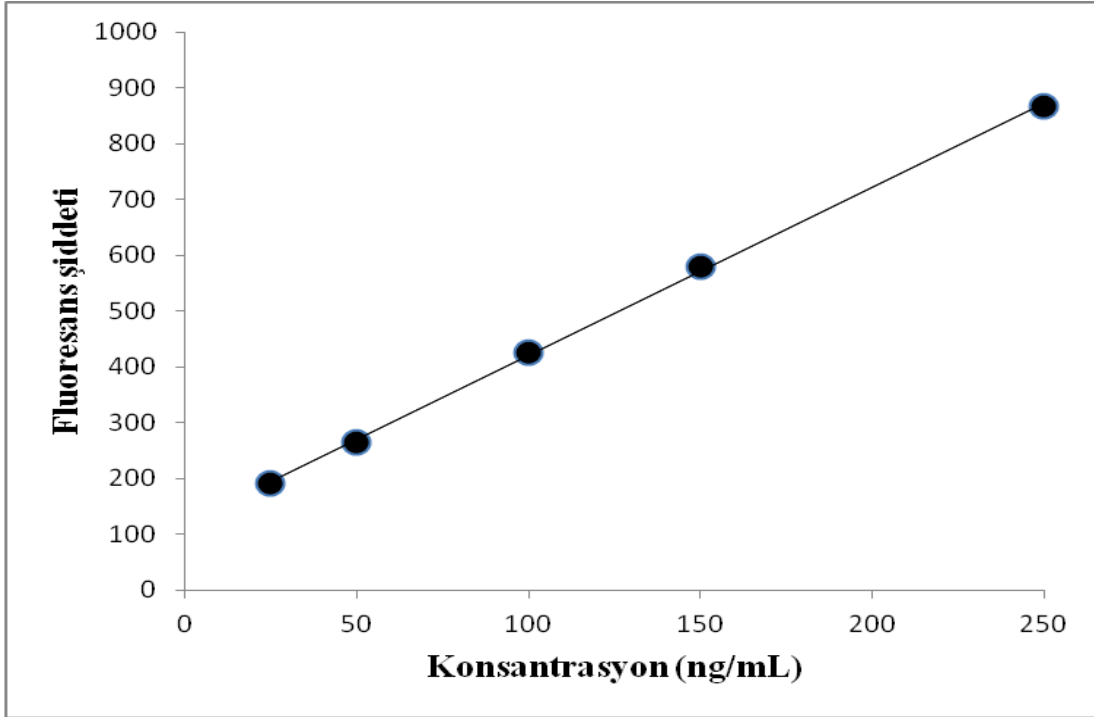
F_{ort} değerlerinden hesaplanan doğru denklemi:

$$F = 3,0135C + 119,37$$

$$r = 0,9996$$

Tablo 4-7: Tablo 4-6 daki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler

	1	2	3	4	5	Ortalama
a	2,9397	2,9369	2,9369	3,1109	3,143	3,0135
b	118,34	118,86	118,86	128,24	112,56	119,37
r	0,9995	0,9995	0,9995	0,9996	0,9998	0,9996



Şekil 4-7: Nateglinidin 25-250 ng/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi

4.1.1.7. Geliştirilen Yöntem ile Tabletlerde Nateglinid Tayini ve Sonuçların Kıyas Yöntemi ile Elde Edilen Sonuçların Karşılaştırılması

120 mg nateglinid içeren **tabletler**, geliştirilen spektrofotometrik yöntem ve farmakope (USP XXXIV) kıyas yöntemi ile analiz edilerek, nateglinid miktarı tayin edildi. Elde edilen sonuçlar ve 6 adet tayin üzerinden hesaplanan ortalama, standart sapma (s), bağıl standart sapma ve % 95 olasılık düzeyinde güven aralığı Tablo 4.8 de görülmektedir.

Geliştirilen yöntem ve kıyas yöntemiyle elde edilen sonuçların ortalamalar yönünden karşılaştırılması Student (*t*), standart sapmalar yönünden karşılaştırılması Fisher testi (*F*) testi uygulanarak yapıldı. Tablo 4.8 de görüldüğü gibi hesaplanan *t*- ve *F*- değerleri %95 olasılık düzeyi ve 6 deneme için ilgili cetvellerde bildirilen değerlerden daha küçük olduğundan geliştirilen spektrofotometrik yöntem ile kıyas yöntemi arasında gerek doğruluk gerekse kesinlik dereceleri yönünden anlamlı bir fark olmadığı belirlendi.

Tablo 4-8: 120 mg Nateglinid içeren tabletlerin analiz sonuçları ve sonuçların istatistikî olarak değêrlendirilmesi

Kıyas Yöntemi			Geliştirilen Yöntem	
Örnek	mg/Tablet	Geri Kazanım (%)	mg/Tablet	Geri Kazanım (%)
1	121,01	100,84	121,23	101,03
2	120,96	100,80	122,19	101,82
3	122,54	102,12	121,46	101,21
4	121,03	100,86	121,80	101,50
5	122,45	102,04	120,68	100,57
6	120,95	100,79	121,27	101,06
x	121,49	101,24	121,44	101,20
SD	0,78		0,52	
% RSD	0,64		0,43	
Güven Aralığı	0,82		0,54	
t _{hesaplanan} = 0,13		t _{tablo} = 2,23		
F _{hesaplanan} = 2,25		F _{tablo} = 5,05		
n ₁ = n ₂ = 6		P = 0,05		

4.2. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

4.2.1. Doğrusallık

Flouresans şiddeti ile nateglinid konsantrasyonu arasındaki ilişkinin 25-250 ng/mL aralığında doğrusal olduğu belirlendi.

4.2.2. Tanıma (LOD) ve Tayin (LOQ) Sınırları

LOD değeri 6.17 ve LOQ değeri 18.68 ng/mL olarak hesaplandı. Bulunan sonuçlar Tablo 4.9 da verilmiştir.

Tablo 4-9: Tablo 4-7'deki değerlere göre hazırlanan LOD ve LOQ değerleri

Parametreler	Değerler
Doğru denklemi	$F = 3,0135C + 119,37$
Eğim $\pm$ SD	$3,0135 \pm 0,10$
Intersept $\pm$ SD	$119,37 \pm 4,63$
LOD ng/mL	6,17
LOQ ng/mL	18,68
r	0,9996

4.2.3. Kesinlik ve Doğruluk

Gün içi tekrarlanabilirlik

Üç farklı konsantrasyonda (25, 100 ve 250 ng/mL) nateglinid içeren çözeltilerden altışar adet hazırlamak için 10 µg/mL konsantrasyondaki nateglinid stok çözeltisinden 25, 100, 250 µL reaksiyon tüplerine alındı. 10 dakika 40 °C de su banyosunda ısıtıldı. Soğutulan bu çözeltiler 3x2 mL diklorometan ile ekstre edildi. 10 mL lik balon jojeye alındı. Balon jodede birleştirilen organik fazlara susuz Na₂SO₄ ilave edildikten sonra hacmine diklorometan ile tamamlandı. Aynı koşullarda hazırlanmış boş denemeye karşı spektrofloreometre yardımıyla spektrumları alındı. Bulunan sonuçlar Tablo 4.10 da verilmiştir.

Tablo 4-10: Aynı Gün İçinde Yapılan Analizlerin Tekrarlanabilirliği

	Konsantrasyon (ng/mL)		
	25	100	250
Bulunan Konsantrasyon (ng/mL)	24,39	99,72	248,27
	24,58	99,5	248,5
	24,28	99,46	248,86
	23,96	99,43	249,27
	24,58	99,43	249,13
	24,91	99,48	249,05
Ortalama	24,45	99,50	248,85
Standart Sapma	0,32	0,11	0,39
% RSD	1,31	0,11	0,16

Günler arası tekrarlanabilirlik

Üç farklı konsantrasyonda (25, 100 ve 250 ng/mL) nateglinid içeren çözeltilerden altışar adet hazırlamak için 10 µg/mL konsantrasyondaki nateglinid stok çözeltisinden 25, 100, 250 µL reaksiyon tüplerine alındı. 10 dakika 40 °C de su banyosunda ısıtıldı. Soğutulan bu çözeltiler 3x2 mL diklorometan ile ekstre edildi. 10 mL lik balon jojeye alındı. Balon jodede birleştirilen organik fazlara susuz Na₂SO₄ ilave edildikten sonra hacmine diklorometan ile tamamlandı. Aynı koşullarda hazırlanmış boş denemeye karşı spektrofloreometre yardımıyla spektrumları alındı. Analizler birbirini takip eden 5 günde ve her defasında yeni çözeltilerle çalışılmak koşuluyla tekrarlandı. Bulunan sonuçlar Tablo 4.11 da verilmiştir.

Tablo 4-11: Günler arası yapılan analizlerin tekrarlanabilirliği

	Konsantrasyon (ng/mL)		
	25	100	250
Bulunan Konsantrasyon (ng/mL)	24,62	99,67	249,48
	24,66	99,49	249,48
	24,58	99,52	249,47
	24,37	99,56	250,24
	24,85	99,59	250,13
	24,97	99,47	250,05
Ortalama	24,67	99,55	249,81
Standart Sapma	0,21	0,07	0,37
% RSD	0,85	0,07	0,15

4.2.4. Robustness (Yöntemin Sağlamlığı)

Yöntemin parametrelerinde ufak değişiklikler yapılarak yöntemin sağlamlığı araştırıldı. Bulunan sonuçlar Tablo 4.12 de verilmiştir. Bulunan sonuçlar doğrultusunda sonuçların anlamlı değişimlere sebep olmadığı gözlemlendi.

Tablo 4-12: Yöntemin Sağlamlığının incelenmesinde elde edilen sonuçlar 36

	Eksitasyon Dalga Boyu $\lambda_{eks}=398$	Eksitasyon Dalga Boyu $\lambda_{eks}=396$	Emisyon Dalga Boyu $\lambda_{ems}=518$	Emisyon Dalga Boyu $\lambda_{ems}=516$	Reaksiyon Süresi (10-1dk)	Reaksiyon Süresi (10+1dk)	Dansilklorür Miktarı (400-5 μ l)	Dansilklorür Miktarı (400+5 μ l)
	100,03	100,09	100,06	100,89	100,00	100,10	100,01	100,02
	100,01	100,06	100,02	100,75	100,03	100,00	100,02	100,09
Bulunan	100,00	100,04	100,30	100,66	100,01	100,08	100,06	100,08
Konsantrasyon	100,05	100,02	100,04	100,02	99,99	100,07	100,07	100,10
	100,07	100,07	100,45	100,30	100,05	100,06	100,02	100,06
	100,01	100,08	100,28	100,10	100,01	100,12	100,03	100,09
Ortalama	100,03	100,06	100,19	100,45	100,02	100,07	100,04	100,07
Standart Sapma	0,027	0,026	0,177	0,363	0,022	0,041	0,024	0,029
RSD	0,027	0,026	0,176	0,361	0,022	0,041	0,024	0,029

4.2.5. Seçicilik

120 mg Nateglinid içeren Starlix tabletlerde bulunan Laktoz monohidrat, Kroskarmeloz sodyum, Mikrokristalin selüloz, Povidon, Hidroksipropil metil selüloz, Koloidal silikon dioksit, Magnezyum stearat, Talk, Polietilen glikol 4000, Sarı demir oksit (E 172), Titanyum dioksit (E 171) gibi yardımcı maddelerin Dansil klorür ile reaksiyon vermediği, flouresans şiddetini etkilemediği gözlemlendi.

çözücüye ait maksimum eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 397 nm ve 517 nm olarak belirlendi.

Türevin diklorometan içindeki stabilitesi incelendiğinde +4 °C de, karanlıkta 48 saat stabil olduğu saptandı.

Belirlenen optimum koşullardan sonra konsantrasyon ile floresans şiddeti arasında doğrusallık 25-250 ng/mL dir. Hesaplanan doğru denklemi $F = 3,0135C + 119,37$ dir. LOD ve LOQ değerleri sırası ile 6,17 ve 18,68 ng/mL⁻¹ dir.

Geliştirilen yöntemin kesinlik derecesini belirlemek üzere aynı gün içinde ve günler arası üç ayrı konsantrasyonda (25, 100 ve 250 ng/mL) nateglinid analiz edildi. Aynı gün içinde ve günler arası analizlerin bağıl standart sapmaları sırasıyla % 0,11-1,33 ve % 0,06-0,85 arasında bulundu. Yöntemin eksitasyon, emisyon çalışmasının dalga boyu reaksiyon süresi ve belirteç miktarı gibi parametrelerinde ufak değişiklikler yapılarak yöntemin sağlamlığı araştırıldı. Bulunan RSD değerleri sırasıyla % 0,027-0,026 , % 0,022- 0,041 ve % 0,024- 0,029 dur. Bulunan değerler dikkate alınmayacak kadar küçük olduğu gözlemlendi.

Geliştirilen yöntem nateglinid içeren tabletlerin analizinde uygulandı. Geri kazanım % 101,20 ve RSD % 0,43 olarak bulundu. Farmakope ile analizlenen tablet analizinde ise geri kazanım % 101,24 ve RSD % 0,64 olarak bulundu. Elde edilen sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesi 6 deneme üzerinden standart sapma, bağıl standart sapma ve %95 olasılık düzeyinde güven sınırları hesaplanarak yapıldı. Bu sonuçlara göre elde edilen tüm dataların “ICH Q2 (R1)” in de gerekliliklerini karşıladığı gözlemlendi.

Sonuç olarak bu çalışma tabletlerde nateglinid tayini için bildirilen yöntem tekrarlanabilirliği yüksek, basit, duyarlı ve miktarları çok düşük olduğu için ekonomiktir. Literatürdeki diğer yöntemlere göre tayin aralığının geniş olması önemli bir üstünlük sağlamaktadır. Bağıl standart sapma değerlerinin %1 den küçük olması, türevin diklorometan içindeki 48 saat dayanıklı kalabilmesi yöntemin önemli avantajıdır. Türevlendirme ve ekstraksiyon işlemleri ise fazla zaman almamaktadır. Bu nedenle rutin farmasötik analizler için rahatlıkla önerildiği gibi biyolojik sıvılarda nateglinid analizleri ve biyoyararlanım çalışmaları içinde güvenilir bir yöntem olabileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- 1- Wikipedia / www.wikipedia.com/Dansylchloride
- 2- The Merck Index, 13th ed. Nateglinide (Merck, Inc., Whitehouse Station, 2001), 1151 (2).
- 3- Vademecum Online/ www.vademecumonline.com.tr/STARLIX 120 mg film kaplı tablet
- 4- İnteraktif ilaç bilgi kaynağı, Rx Media Pharma
- 5- Lakshmi, K.S., Rajesh T., Sharma, Shrinivas. (2010). Liquid Chromatographic Method for the Determination of Metformin and Nateglinide in Pharmaceutical Formulations. *Asian Journal of Chemistry* **22**, 5231-5236
- 6- Madhavi, A. Reddy G.S., Suryanarayan M.V. (2008). Development of a new analytical method for determination of related components in nateglinide. *Chromatographia* **67**, 639-645
- 7- Sagar, G.V. (2004). Visible spectrophotometric determination of nateglinide in pharmaceutical formulations. *Asian Journal of Chemistry* **16**, 1431-1434
- 8- Kale, D.L., Kakde R.B. (2011). HPTLC Estimation of Nateglinide in Bulk Drug and Tablet Dosage Form. *Asian Journal of Chemistry* **10**, 4351-4354
- 9- Sangaraju, S., Rao, B. M.; Srinivas, T. (2009). A Validated Chiral LC Method for the Enantiomeric Separation of Nateglinide and the Quantitative Determination of Its L-Enantiomer. *Chromatographia* **69**, 1123-1127
- 10- Karasakal, A., Ulu Tatar, S. (2014). Spectrofluorimetric determination of Nateglinide in pure and pharmaceutical preparations through derivatization with 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole. *Optics and Spectroscopy* **116**, 52-55
- 11- Malli, Danai, Gikas, Evangelos, Vavagiannis, Andreas. (2007). Determination of nateglinide in human plasma by high-performance liquid chromatography with pre-column derivatization using a coumarin-type fluorescent reagent. *Analytica Chimica Acta* **599**, 143-150

- 12- Maddi, Srinivas, Keshetty, Srisailam, Ega, Chandra Mohan. (2007). Development and validation of a stereoselective HPLC method for the determination of the in vitro transport of nateglinide enantiomers in rat intestine. *Journal of Separation Science* **30**, 1875-1880
- 13- Sankalia, Jolly M., Sankalia, Mayur G., Sutariya, Vijay, B. (2007). Nateglinide quantification in rabbit plasma by HPLC: Optimization and application to pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **44**, 196-204
- 14- Bauer S., Stormer E., Kirchheiner, J. (2003) Rapid and simple method for the analysis of nateglinide in human plasma using HPLC analysis with UV detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **31**, 551-555
- 15- Qi, M.L., Wang, P., Sun, Y.J. (2003). Determination of the L-enantiomer of nateglinide in a bulk drug substance by chiral reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **26**, 1839-1845
- 16- Han, De-En, Zheng Yi, Li Ning. (2010). Determination of Nateglinide in Human Plasma by LC-ESI-MS and Its Application to Bioequivalence Study. *Chromatographia* **71**, 299-304
- 17- Varanasi, Kanthi Kiran V.S., Sridhar, V., Potharaju, Suresh. (2008). Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay for the simultaneous determination of nateglinide, cilostazol and its active metabolite 3,4-dehydro-cilostazol in Wistar rat plasma and its application to pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **865**, 91-98
- 18- He, Z.Q., Chen, X.Y., Zhong, D.G. (2004). Study on the bioavailability of nateglinide-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin complex capsule in rabbits by liquid chromatographic tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography* **18**, 532-537
- 19- Yan, H.Y., Yang, G.L., Qiao, F.X. (2004) Determination of nateglinide in animal plasma by micellar electrokinetic chromatography and on-line

sweeping technique. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **36**, 169-174

20- Wikipedia/ [www.wikipedia.com/ DansylChloride](http://www.wikipedia.com/DansylChloride)

21- Aydogmus, Z., Sari, F., Ulu Tatar, S. (2012). Spectrofluorimetric Determination of Aliskiren in Tablets and Spiked Human Plasma through Derivatization with Dansyl Chloride. *Spectrofluorimetric Determination of Aliskiren in Tablets and Spiked Human Plasma through Derivatization with Dansyl Chloride. Journal of Fluorescence* **22**, 549-556

22- Karasakal, A., Ulu Tatar, S. (2014). New Spectrofluorimetric Method for the Determination of Nizatidine in Bulk Form and in Pharmaceutical Preparations. *Optics and Spectroscopy* **115**, 306-309

23- Karasakal, A., Ulu Tatar, S. (2014). Development and validation of a sensitive spectrofluorimetric method for the determination of amoxapine in human plasma and urine. *Luminescence* **3**, 284-287

24- Abd El-Ghaffar, M.E., El-Wasseef, D.R., El-Sherbiny, D.T. (2011) Spectrofluorimetric Determination of Two beta-Agonist Drugs in Bulk and Pharmaceutical Dosage Forms via Derivatization with Dansyl Chloride. *Journal of Analytical Chemistry* **66**, 476-481

25- Aksamija A., Mathe C., Vieillescazes C. (2012). Liquid chromatography of triterpenic resins after derivatization with dansyl chloride. *Journal of Liquid Chromatography&Related Technologies* **35**, 1222-1237

26- Higashi Y., Sakata M., Nakamura S. (2008). Simultaneous determination of N-dealkylated metabolites of four butyrophenone-type agents by HPLC with fluorescence detection after pre-column derivatization with dansyl chloride. *Journal of Liquid Chromatography& Related Technologies* **31**, 2762-2770

27- Wang Y., Kang Xue-J., Ge Wei-H. (2007). Simple, rapid, and accurate RP-HPLC method for determination of cystine in human urine after derivatization with dansyl chloride. *Chromatographia* **65**, 527-532

28- Romero L., Keunchkarian S., Reta M. (2006). Extraction of biogenic amines and their dansyl derivatives with reverse microemulsions of bis [2-

- ethylhexyl] sulphosuccinate (AOT) prior to high-performance liquid chromatographic determination. *Analytica Chimica Acta* **565**, 136-144
- 29- Higashi, Y., Fujii, Y., (2004). Sensitive determination of the binding of antidepressants to synthetic melanin by liquid chromatography after pre-column derivatization with dansyl chloride. *Journal of Liquid Chromatography&Related Technologies* **27**, 1903-1914
- 30- Dugo, G., Vilasi, F., La Torre G.L., (2006) Reverse phase HPLC/DAD determination of biogenic amines as dansyl derivatives in experimental red wines. *Food Chemistry* **95**, 672-676
- 31- Lamshoeft, M., Grobe, N., Spiteller M. (2011). Picomolar concentrations of morphine in human urine determined by dansyl derivatization and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Science* **879**, 933-937
- 32- Gong, Y., Yip S., Chung, Thamarai Sennappan, K. (2007). Trace analysis of icariin in human serum with dansyl chloride derivatization after oral administration of Epimedium decoction by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Science* **860**, 166-172
- 33- Beach Daniel, G., Liu H., Quilliam Michael, A. (2015). Sensitive determination of domoic acid in mussel tissue using dansyl chloride derivatization and liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical Methods* **7**, 1000-1007
- 34- Yao, L., Yang, J., Liu, B. (2014). Development of a sensitive method for the quantification of urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene by solid phase extraction, dansyl chloride derivatization and liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection. *Analytical Methods* **6**, 6488-6493
- 35- Nirogi, R., Komarneni, P., Kandikere, V. (2013). A sensitive and selective quantification of catecholamine neurotransmitters in rat microdialysates by pre-column dansyl chloride derivatization using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Science* **913**, 41-47

- 36- Dillen, L., Sips, Luc., de Vries, R. (2013). Quantitative LC-MS/MS analysis of azide and azidoalanine in in vitro samples following derivatisation with dansyl chloride. *Analytical Methods* **5**, 3136-3141
- 37- Salomonsson, Matilda, L., Hansson, A., (2013). Development and in-house validation of a method for quantification of BMAA in mussels using dansyl chloride derivatization and ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical Methods* **5**, 4865-4874
- 38- Wang, He-X., Zhou, Y., Jiang, Qing-W. (2013). Enhanced screening efficiency for endocrine-disrupting chemicals in milk and powdered milk using UPLC/QTOF-MS by the introduction of dansyl chloride derivatisation. *Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* **30**, 166-180
- 39- Lin, H., Tian Y., Zhang, Z. (2010). Quantification of piperazine phosphate in human plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry employing precolumn derivatization with dansyl chloride. *Analytica Chimica Acta* **664**, 40-48
- 40- Beaudry, F., Ross, A., Vachon, P. (2007). Development of a LC-ESI/MS/MS assay for the quantification of vanillin using a simple off-line dansyl chloride derivatization reaction to enhance signal intensity. *Biomedicalchromatography* **21**, 113-115
- 41- Beaudry, F., Guenette, S.A., Winterborn A. (2005). Development of a rapid and sensitive LC-ESI/MS/MS assay for the quantification of propofol using a simple off-line dansyl chloride derivatization reaction to enhance signal intensity. *Journal of Pharmacetucal and Biomedical Analysis* **39**, 411-417
- 42- Beaudry, F., Guenette Sarah, A., Vachon P. (2006). Determination of eugenol in rat plasma by liquid chromatography-quadrupole ion trap mass spectrometry using a simple off-line dansyl chloride derivatization reaction to enhance signal intensity. *Biomedical Chromatography* **20**, 1216-1222
- 43- Maraschiello, C., Miranda, E., Millan, E. (2003). Phenylisothiocyanate and dansyl chloride precolumn derivatizations for the high-performance liquid chromatography analysis of the antitumoral agent ES-285 in dog plasma.

Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences **791**, 1-11

- 44- Kwakman, P.J.M., Kamminga, D.A., Brinkman, U.A.Th., de Jong, G.J. (1991). Liquid chromatographic determination of oestradiol in serum by pre-column derivatization with dansyl chloride or laryl chloride and peroxyoxalate chemiluminescence detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **9**, 753–759
- 45- Zhi, W., Hongda, X., Chengguang, F. (1992). Sensitive fluorescence detection of some nitrosamines by precolumn derivatization with dansyl chloride and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **589**, 349–352
- 46- Ramakrishna, N., Prashanth K., Vishwottam K., Rajeshkumar, B. (2013). A sensitive and selective quantification of catecholamine neurotransmitters in rat microdialysis by pre-column dansyl chloride derivatization using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **7**, 913–914
- 47- Wang, T.K., Fuh M.S. (1996). Determination of amphetamine in human urine by dansyl derivatization and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* **686**, 285-290
- 48- Peter, C., Larry G., Rushing, G.D., Newport, J., Bowyer, F. (1997). Determination of D-fenfluramine, D-norfenfluramine and fluoxetine in plasma, brain tissue and brain microdialysis using high performance liquid chromatography after pre column derivatization with dansyl chloride. *Journal of Chromatography B* **692**, 419-426
- 49- Mardiana, S., Bahruddin, S., Abdussalam Salhin, M., Muhammad Idiris, S., Chanbasha B., Hian Kee, L. (2009). In situ derivatization hollow fibre liquid-phase microextraction for the determination of biogenic amines in food samples. *Journal of Chromatography A* **1216**, 5165–5170
- 50- Hua-Lin, C., Rong-Hua, Z., Huan-De, L., Jun, Z., Lan-Fang, L. (2011). MultiSimplex optimization of chromatographic separation and dansyl derivatization conditions in the ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis of risperidone, 9-hydroxyrisperidone,

- monoamine and amino acid neurotransmitters in human urine. *Journal of Chromatography B* **879**, 1993– 1999
- 51- . Xuejun, K., Jing, X., Xiao H., Zhongze, G. (2006). Optimization of dansyl derivatization and chromatographic conditions in the determination of neuroactive amino acids of biological samples. *Clinica Chimica Acta* **366**, 352 – 356
- 52- Maraschielloa, C., Mirandab, E., Milla'n, E., Florianob, P., Vilageliu, J. (2003). Phenylisothiocyanate and dansyl chloride precolumn derivatizationfor the high-performance liquid chromatography analysis of the antitumoral agent ES-285 in dog plasma. *Journal of Chromatography B* **791**, 1–11
- 53- Marc, L., Nadja, G., Michael, S. (2011). Picomolar concentrations of morphine in human urine determined by dansyl derivatization and liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **879**, 933–937
- 54- Huguette, C., Fred A., Harold, C. (1995). Sensitive fluorescence detection of robenidine by derivatization with dansyl chloride and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **694**, 407-413
- 55- . Mahmoud, A. O., Osama, H. A., Sayed, M. D.,Tamer, Z. A. (2014). Spectrofluorimetric protocol for antidepressant drugs in dosage forms and human plasma through derivatization with dansyl chloride. *Arabian Journal of Chemistry Note to users: Corrected proofs*.
- 56- Wei, D., Yande, H., Scott A. M., Mark, S. B. (2015). Trace level liquid chromatography tandem mass spectrometry quantification of the mutagenic impurity 2-hydroxypyridine N-oxide as its dansyl derivative. *Journal of Chromatography A* **1386**, 47–52
- 57- USP Pharma pharmacopoeia/ XXXIV Edition/ Volume 3/ Nateglinid Tablets
- 58- International Conference on Harmonization (2005) ICH Guideline, Q2(R1) Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology, London, UK

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	NEVRUZ ORÇUN	Soyadı	ÖZÇELİK
Doğ.Yeri	IĞDIR	Doğ.Tar.	14.07.1986
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	50983816808
Email	kimyaci_orcun@hotmail.com	Tel	0544 663 14 43

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi	2009
Lise	100. Yıl Lisesi	2003

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Ar-Ge :Uzman Yardımcısı	Deva İlaç	2013-Halen
2.	Ar-Ge & İş Geliştirme	Gelişim Kimya	2010-2013
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	YDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi	61,25	-

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	69,59	66,43	57,98
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office Programları	Çok İyi
İnternet Explorer	Çok İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

--

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Kitap Okumak, Amatör olarak müzikle uğraşmak, yüzmek, doğa yürüyüşleri.