

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

**KABERGOLİN'İN FARMASÖTİK PREPARATTAN
SPEKTROFOTOMETRİK ANALİZİ**

Ecz. Demet SALMAN

**Analitik Kimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Nursabah E. BAŞÇI**

**ANKARA
2007**

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne:

Bu çalışma jürimiz tarafından Analitik Kimya Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Nuran ÖZALTIN
Hacettepe Üniversitesi

Danışman: Prof. Dr. Nursabah E. BAŞÇI
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Sacide ALTINÖZ
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Sedef KIR
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Nilgün GÖĞER
Gazi Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hakan S. ORER
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen ve her konuda bana destek olan tez hocam Sayın Prof. Dr. Nursabah E. Başçı'ya,

Çalışmalarımın her aşamasında değerli katkılarını esirgemeyen değerli hocalarıma,

Değerli yardımlarını benden esirgemeyen Sayın Deniz Emre, Sayın Araş. Gör. Emirhan Nemutlu, Sayın Araş. Gör. Ayşegül Doğan'a,

Bu günlere gelmemi sağlayan ve her konuda desteğini esirgemeyen sevgili annem ve babama,

Yaptıkları tüm yardımlar ve gösterdikleri samimiyet için Filiz-Hamdi-Öykü Erhan'a,

Tez çalışmam sırasında her konuda bana yol gösterdiği için Füsün Gedil Üstün'e,

Ve her zaman, her konuda, her durumda yanımda olduğunu bildiğim Volkan İpek'e,

Teşekkür ederim.

ÖZET

Salman, D., Kabergolin'in farmasötik preparattan spektrofotometrik analizi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2007. Kabergolin erken ve gelişmiş dönemlerdeki Parkinson hastalarında ve hiperprolaktinemi olgularında kullanılan, D₂ reseptörlerine yüksek afinite gösteren bir sentetik ergolin dopamin agonistidir. Bu çalışmada, farmasötik preparatlardan Kabergolin tayini için basit, hızlı, güvenilir ve valide edilmiş UV-GB spektrofotometrisi ve 2.dereceden türev spektrofotometrisi yöntemleri geliştirilmiştir. Kabergolin'in tayini UV-GB spektrofotometrisinde 280 nm dalga boyunda, 2.dereceden türev spektrofotometrisinde 227-232 nm aralığında gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen UV-GB spektrofotometrisi ve 2.dereceden türev spektrofotometrisi ile tayin yöntemleri 1-125 µg mL⁻¹ Kabergolin derişimi aralığında doğrusaldır. Yöntemlerin gözlenebilme sınırları 0.5 µg mL⁻¹ (BSS = %0.75, BH = 0.30), tayin alt sınırları ise 1 µg mL⁻¹ (BSS = %0.67, BH = 0.33)'dir. UV-GB spektrofotometrisi yönteminin gün içi ve günler arası en yüksek bağıl hata ve bağıl standart sapma değerleri sırasıyla %1.10 ve %0.63, 2. dereceden türev spektrofotometrisi yönteminin gün içi ve günler arası en yüksek bağıl hata ve bağıl standart sapma değerleri ise sırasıyla %1.10 ve %0.70'dir. Geliştirilen yöntemler farmasötik preparatlarda Kabergolin tayinine uygulanmış, sonuçlar karşılaştırma yöntemi (HPLC/ECD) bulguları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Sonuç olarak, geliştirilen UV-GB ve 2. dereceden türev spektrofotometrisi yöntemleri, doğru, duyarlı, kesin ve tekrarlanabilir, Kabergolin'in farmasötik preparatlardan analizinde doğrudan, hızlı ve kolay bir biçimde uygulanabilecek yöntemlerdir.

Anahtar kelimeler: Kabergolin, spektrofotometri, türev, farmasötik preparat.

ABSTRACT

Salman, D., Spectrophotometric analysis of cabergoline from pharmaceutical preparation, Hacettepe University Health Sciences Institute Analytical Chemistry Program Master of Sciences Thesis, Ankara, 2007. Cabergoline is a synthetic ergoline dopamine agonist which shows high affinity to D₂ receptors and used for early and advanced Parkinson's patients and hyperprolactinemia disorders. In this study, simple, fast, reliable and validated UV-VIS and 2nd derivative spectroscopy methods for determination of cabergoline in pharmaceutical preparations are developed. Determination of cabergoline is carried out by UV-VIS spectrophotometry at 280 nm wavelength and by 2nd derivative spectrophotometry at a range of 227-232 nm. The developed UV-VIS and 2nd derivative spectrophotometry methods were linear over the range of 1-125 µg mL⁻¹ cabergoline concentrations. The limit of detection for the methods was 0.5 µg mL⁻¹ (RSD = 0.75%, Bias = 0.30) and the limits of quantification was 1.0 µg mL⁻¹ (RSD = 0.67%, Bias = 0.33). The highest relative error and relative standard deviation in inter-day and intra-day study for UV-VIS spectrophotometry were 1.10% and 0.63%, respectively. The highest relative error and relative standard deviation in inter-day and intra-day study for 2nd derivative spectrophotometry were 1.10% and 0.70%, respectively. The developed methods were applied to the analysis of cabergoline in pharmaceutical preparations and there was no statistically significant difference when the results were compared with the results of comparison method (HPLC/ECD). In conclusion, the developed UV-VIS and 2nd derivative spectrophotometry methods were accurate, sensitive, precise and repeatable and can be applied to the analysis of cabergoline in pharmaceutical preparations as direct, fast and simple methods.

Keywords: Cabergoline, spectrophotometry, derivative, pharmaceutical preparation.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....	İİİ
TEŞEKKÜR.....	İV
ÖZET.....	V
ABSTRACT	VI
İÇİNDEKİLER.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR	Xİ
ŞEKİLLER	Xİİİ
TABLolar	XV
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Parkinson Hastalığı	2
2.2. Parkinson Hastalığının Oluşma Nedeni.....	2
2.3. Parkinson Hastalığının Belirtileri.....	3
2.4. Parkinson Hastalığının Tedavisi	4
2.5. Hiperprolaktinemi.....	6
2.6. Kabergolin	8
2.6.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	8
2.6.2. Etki Mekanizmaları	8
2.6.3. Farmakodinamik Özellikleri	9
2.6.4. Farmakokinetik Özellikleri	9
2.6.5. Yan Etkileri	11
2.6.6. İlaç Etkileşimleri ve Diğer Etkileşimler	11
2.6.7. Uyarılar ve Önlemler	12
2.7. Kabergolin'in Analiz Yöntemleri.....	13
2.8. Spektrofotometri	16
a-Cihazdan Kaynaklanan Sapmalar	24
b-Kimyasal Maddelerden Kaynaklanan Sapmalar	25
c-Analizci Hatasından İleri Gelen Sapmalar	25
2.9. UV ve Görünür Bölge Spektrofotometrisi.....	25

2.10.	Türev Spektrofotometrisi	27
2.10.1.	Giriş	27
2.10.2.	Teorik Temelleri	28
2.10.3.	Dalga Boyu Aralığı ($\Delta\lambda$)	36
2.10.4.	$\Delta\lambda'$ nın Türev Sinyaline Etkisi.....	36
2.10.5.	Türev Derecesi (n).....	37
2.10.6.	Ayırıcılıkta Artış	38
2.10.7.	Türev Spektrumun Alınması ve Türev Spektrumlarına Etki Eden Faktörler	41
2.10.8.	Türev Spektrumlarının Değerlendirilmesi.....	43
2.11.	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	44
3.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	48
3.1.	Tez Çalışmasında Kullanılan Gereçler	48
3.1.1.	Cihazlar	48
3.1.2.	Kimyasal Maddeler.....	48
3.1.3.	Cam Malzemeler ve Diğer Sarf Malzemeleri	48
3.1.4.	Farmasötik Preparatlar.....	49
3.2.	Deney İçin Gerekli Hazırlıklar	49
3.2.1.	Etkin Maddenin Saflığı	49
3.2.2.	Çözeltilerin Hazırlanması	49
3.2.3.	Farmasötik Preparatların Analize Hazırlanması	50
3.2.4.	Sentetik Preparatların Hazırlanması	50
3.2.5.	Cam Malzemelerin Temizliği	50
3.2.6.	Spektrofotometre Küvetlerinin Temizlenmesi	51
3.2.7.	HPLC Kolonunun Temizlenmesi	51
3.2.8.	Ortam Şartlarının ve Türev Derecesinin Seçimi	51
3.3.	Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi.....	51
3.3.1.	UV-GB Spektrofotometrisi	51
3.3.2.	2. Dereceden Türev Spektrofotometrisi.....	52
3.4.	Analitik Yöntem Validasyonu	52
3.4.1.	Analit Çözeltilerinin Kararlılığı	52
3.4.2.	Özgünlük	53

3.4.3.	Aralık ve Kalibrasyon Aralığı	53
3.4.4.	Doğruluk ve Kesinlik.....	54
3.4.5.	Duyarlılık	54
3.4.6.	Geri Kazanım	55
3.4.7.	Tekrarlanabilirlik	55
3.4.8.	Sağlamlık ve Tutarlılık	55
3.5.	Farmasötik Preparatlara Uygulama	56
3.5.1.	Kalibrasyon Eğrisi Yöntemi ile Analiz	56
3.5.2.	Standart Ekleme Yöntemi ile Analiz	56
3.5.3.	Karşılaştırma Yöntemi (HPLC-ECD) ile Analiz	56
4.	BULGULAR	58
4.1.	Etkin Madde Saflık Kontrolü	58
4.1.1.	Erime Noktası.....	58
4.2.	Spektrofotometrik Yöntem Bulguları	58
4.3.	Spektrofotometrik Yöntemlerin Validasyonu	60
4.3.1.	Analit Çözeltilerinin Kararlılığı	60
4.3.2.	Özgünlük	61
4.3.3.	Kalibrasyon Eğrileri ve Doğrusallık Aralıkları.....	64
4.3.4.	Doğruluk ve Kesinlik.....	69
4.3.5.	Duyarlılık	72
4.3.6.	Geri Kazanım	72
4.3.7.	Tekrarlanabilirlik	73
4.3.8.	Sağlamlık ve Tutarlılık	74
4.4.	Farmasötik Preparatların Analizi.....	77
4.5.	Karşılaştırma Yöntemi (HPLC-ECD) ile Analiz	83
4.5.1.	Doğrusallık	83
4.5.2.	Doğruluk ve Kesinlik.....	85
4.5.3.	Kabergolin'in Farmasötik Preparatlardan Analizi.....	86
5.	TARTIŞMA	89
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	98
	EKLER	105

- EK 1. İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması
- EK 2. Tez İçinde Kullanılan İstatistiksel Testler
- EK 3. Özgeçmiş

SİMGELER VE KISALTMALAR

$\bar{X}$	Aritmetik ortalama
%BH	% Bağıl Hata
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
μM	Mikromolar
AAS	Atomik absorpsiyon spektroskopisi
cm	Santimetre
dak	Dakika
EAA	Eğri altında kalan alan
ECD	Elektrokimyasal dedektör
F	Formal
fg	Femtogram
FSH	Folikül stimüle edici hormon
g	Gram
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IR	İnfrared (Kızılötesi)
Kcal	Kilokalori
KOMT	Katekol-O-Metiltransferaz
L	Litre
LC/MS	Sıvı kromatografi / kütle spektrometrisi
LH	Lütenleyici hormon
LOD	Gözlenebilirlik sınırı
LOQ	Tayin alt sınırı
M	Molar
MAO-B	Monoamin Oksidaz-B
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar

N	Etkinlik (Teorik tabaka sayısı); Normal (Değişim birimi olarak)
ng	Nanogram
nm	Nanometre
pg	Pikogram
PIF	Prolaktin baskılayıcı faktör
r	Korelasyon katsayısı
R, r ²	Tanımlayıcılık katsayısı
s	Saniye
SH	Standart hata
SS	Standart sapma
SSS	Santral sinir sistemi
TRH	Tiroit hormonu
UV	Ultraviyole (Morötesi)
UV-GB	Ultraviyole – Görünür Bölge
VIP	Vazoaktif intestinal peptid

ŞEKİLLER

Şekil 2-1 Kabergolin'in kimyasal yapısı	8
Şekil 2-2 Elektromanyetik ışımanın dalga özelliği (a: genlik).....	18
Şekil 2-3 Enerji seviyeleri arasındaki fark.....	19
Şekil 2-4 Moleküldeki enerji seviyeleri.....	20
Şekil 2-5 Sürekli spektrum.....	21
Şekil 2-6 Çözelti üzerine düşürülen bir ışın demetinde oluşabilecek olaylar	22
Şekil 2-7 Elektromanyetik radyasyonun spektral alanları	25
Şekil 2-8 Tek ve çift ışın yollu spektrofotometrenin şeması.....	27
Şekil 2-9 Absorbans ve türev spektrumları.....	30
Şekil 2-10 Türev derecesi ile bant genişliğinin türev yüksekliğine etkisi.....	33
Şekil 2-11 a) Gauss eğrisinin 1. tek tek ve 2. karışım halindeki spektrumları	34
Şekil 2-12 Doğrusal geri zemin fonksiyonunun türevlendirme ile uzaklaştırılması	39
Şekil 2-13 Maksimum türevlendirme ile sinyallerin keskinleştirilmesi ve ayırıcılığın artması.....	40
Şekil 2-14 Türev spektrumlarının değerlendirilmesi	43
Şekil 2-15 HPLC cihazının şematik gösterimi.....	46
Şekil 4-1 Kabergolin'in UV-GB spektrumu.....	58
Şekil 4-2 Kabergolin'in 1.dereceden türev spektrumu	59
Şekil 4-3 Kabergolin'in 2.dereceden türev spektrumu	59
Şekil 4-4 Kabergolin'in 3.dereceden türev spektrumu	59
Şekil 4-5 Kabergolin'in 4.dereceden türev spektrumu	60
Şekil 4-6 Kabergolin standardının ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) UV-GB spektrumu.....	61
Şekil 4-7 Plasebo örneğinin UV-GB spektrumu.....	61
Şekil 4-8 Plasebo+0.5 mg Kabergolin içeren örneğinin UV-GB spektrumu..	62
Şekil 4-9 Kabergolin içeren (0.5 mg) tablet örneğinin UV-GB spektrumu.....	62
Şekil 4-10 Kabergolin standardının ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) 2.dereceden türev spektrumu	63
Şekil 4-11 Plasebo örneğinin 2.dereceden türev spektrumu	63

Şekil 4-12 Plasebo+0.5 mg Kabergolin içeren örneğinin 2.dereceden türev spektrumu	63
Şekil 4-13 Kabergolin içeren (0.5 mg) tablet örneğinin 2.dereceden türev spektrumu	64
Şekil 4-14 Kabergolin'in UV-GB spektrofotometrisi kalibrasyon eğrisi	64
Şekil 4-15 Kabergolin'in pikten pike ölçüm ile elde edilen 2.dereceden türev spektrofotometrisi kalibrasyon eğrisi ($\lambda = 227-232\text{nm}$).....	66
Şekil 4-16 Kabergolin'in pikten sıfıra ölçüm ile elde edilen 2.dereceden türev spektrofotometrisi kalibrasyon eğrisi ($\lambda = 232\text{nm}$).....	66
Şekil 4-17 Kabergolin'in UV-GB spektrofotometrisine ait yöntem doğruluk grafiği	68
Şekil 4-18 Kabergolin'in 2.dereceden türev spektrofotometrisine ait yöntem doğruluk grafiği.....	68
Şekil 4-19 HPLC cihazından elde edilen kromatogram	84
Şekil 5-1 Kabergolin'in UV-GB spektrofotometrisi ile kalibrasyon ve standart ekleme yöntemleri eğrileri	96
Şekil 5-2 Kabergolin'in 2.dereceden türev spektrofotometrisi ile kalibrasyon ve standart ekleme yöntemleri eğrileri.....	97

TABLOLAR

Tablo 4-1 Kabergolin'in kararlılık testi bulguları.....	60
Tablo 4-2 Kabergolin'in UV-GB spektrofotometrisi ile analizinden elde edilen kalibrasyon eğrisinin doğrusallıktan ayrılış ve korelasyon katsayısının önem kontrolü	65
Tablo 4-3.Önerilen yöntemlere ait kalibrasyon eğrilerinin özellikleri.....	67
Tablo 4-4 Kabergolin'in 2.dereceden türev spektrofotometrisi ile analizinden elde edilen kalibrasyon eğrisinin pikten pike ölçüm ile korelasyon katsayısı ve doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü.....	67
Tablo 4-5 UV-GB spektrofotometrisi ile gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk analiz bulguları	70
Tablo 4-6 2.Dereceden türev spektrofotometrisi ile gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk analiz bulguları	71
Tablo 4-7 Sentetik tablet preparatlarının UV-GB spektrofotometrisi ile analiz bulguları	72
Tablo 4-8 Sentetik tablet preparatlarının 2.dereceden türev spektrofotometrisi ile analiz bulguları	73
Tablo 4-9 Geliştirilen yöntemlerin tekrarlanabilirlik bulguları (Analiz edilen: 20µg mL ⁻¹).....	74
Tablo 4-10 Geliştirilen yöntemlere ait sağlamlık bulguları	75
Tablo 4-11 UV-GB spektrofotometrisi ve 2.dereceden türev spektrofotometrisi ile farklı cihazlara ait analiz sonuçları	76
Tablo 4-12 UV-GB spektrofotometrisi ve 2.dereceden türev spektrofotometrisi ile farklı analizcilere ait analiz sonuçları	77
Tablo 4-13 Kabergolin içeren farmasötik preparatların UV-GB spektrofotometrisi ile kalibrasyon eğrisi kullanılarak elde edilen analiz bulguları	78
Tablo 4-14 Kabergolin içeren farmasötik preparatların 2.dereceden türev spektrofotometrisi ile kalibrasyon eğrisi kullanarak elde edilen analiz bulguları	79
Tablo 4-15 Kabergolin içeren farmasötik preparatların UV-GB spektrofotometrisi ile standart ekleme yöntemi kullanarak elde edilen analiz bulguları	80
Tablo 4-16 Kabergolin içeren farmasötik preparatların 2.dereceden türev	

spektrofotometrisi ile standart ekleme yöntemi kullanarak elde edilen analiz bulguları	81
Tablo 4-17 Kabergolin içeren preparatlardan UV-GB spektrofotometrisi ve 2.dereceden türev spektrofotometrisi yöntemi ile elde edilen analiz bulguların karşılaştırılması	82
Tablo 4-18 Kabergolin içeren preparatlardan kalibrasyon eğrisi ve standart ekleme yöntemi ile elde edilen analiz bulguların uygulanan yöntemler arasında karşılaştırılması	83
Tablo 4-19 HPLC yöntemine ait kalibrasyon eğrisinin özellikleri	84
Tablo 4-20 Kabergolin'in HPLC ile analizinden elde edilen kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı ve doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü	85
Tablo 4-21 HPLC yöntemiyle Kabergolin için elde edilen gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk bulguları	86
Tablo 4-22 Dostinex® ve Cabaser® tabletlerinin geliştirilen UV-GB spektrofotometrisi ve karşılaştırma yöntemi ile analizi bulguları	87
Tablo 4-23 Dostinex® ve Cabaser® tabletlerin geliştirilen 2.dereceden türev spektrofotometrisi ve karşılaştırma yöntemi ile analizi bulguları	88
Tablo 4-24 Dostinex® ve Cabaser® tabletlerin geliştirilen UV-GB, 2.dereceden türev spektrofotometrisi ve karşılaştırma yöntemi ile analizi bulguları	88

1. GİRİŞ

Kabergolin günümüzde erken ve gelişmiş dönemlerdeki Parkinson hastalarında ve hiperprolaktinemi olgularında kullanılan, D₂ reseptörlerine yüksek afinite gösteren bir sentetik ergolin dopamin agonistidir (1, 2).

Kabergolin'in kan, idrar gibi vücut sıvılarından analizi için RIA, HPLC ve LC/MS yöntemleri kaynaklarda bildirilmiştir (2-8). Ancak, UV-GB spektrofotometrisi ve türev spektrofotometrisi ile farmasötik preparatlardan yapılmış analiz çalışmasına rastlanmamıştır.

Kabergolin'in sulu ortamda çözeltisinin UV-GB spektrumu incelendiğinde, 219 nm ve 280 nm'de büyüklüğü ve şekli açısından analiz amacıyla değerlendirilebilir absorpsiyon bantları görülmektedir. Bu çalışmada, Kabergolin'in farmasötik preparattan analizinin UV-GB spektrofotometrisi ve daha sonra da türev spektrumundan da yararlanılarak türev spektrofotometrisi yöntemi ile analizlerinin yapılması amaçlanmıştır. Diğer yöntemlere göre daha kolay ve hızlı olan UV-GB spektrofotometrisi ve türev spektrofotometrisi ile Kabergolin'in tablet formundaki farklı farmasötik preparatlardan analizi için duyarlı ve seçici yöntemlerin geliştirilmesi ve uygulanması amaçlanmıştır. Geliştirilen bu yöntemler analitik yöntem validasyon parametreleri kullanılarak valide edilecektir.

Bu araştırmada elde edilen veriler istatistiksel yöntemlerle değerlendirilecek, kendi aralarında ve kaynakta yer alan HPLC yöntemi (3) ile karşılaştırılarak sonuçların uygunluğu tartışılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Parkinson Hastalığı

Parkinson hastalığı kas hareketlerini bozan, ilerleyici bir nörolojik hastalıktır. Titreme (tremor), kas rijiditesi, bradikinezi (istemli hareketlerin başlatılması ve sürdürülmesinde yavaşlık) ile postür ve yürüme bozuklukları ile karakterizedir (9).

Parkinson hastalığı ilk kez 1817 yılında İngiliz hekim James Parkinson tarafından titrek felç (shaking palsy) adıyla tanımlanmıştır. Hastalık 40-75 yaşları arasında, sıklıkla da 60 yaşın üzerinde başlar. Parkinson hastalarının sadece %5 ila 10'unda hastalık başlangıç yaşı 20 ila 40 yaşları arasındadır. Hastalık genellikle sinsi başlar ve belirtileri yıllar içinde son derece yavaş ama giderek artan biçimde ilerler. Hastaların çoğunda belirtiler bedenin tek bir yarısında ortaya çıkma eğilimindedir, ancak zamanla karşı beden yarısında da kendini gösterir. Hastalığın ilerleme hızı belirtilerin türü ve şiddeti hastadan hastaya değişiklik gösterecek şekilde farklıdır. Parkinson hastalığı erkeklerde kadınlara oranla biraz daha sık görülür, fakat cinsiyetler arasındaki fark küçüktür. Toplumda 65 yaş üzerinde her 100 kişiden birinin Parkinson hastası olduğu kabul edilmektedir (10, 11).

2.2. Parkinson Hastalığının Oluşma Nedeni

Parkinson hastalığı, ekstrapiramidal sistemde striatal dopaminerjik etkinliğin zayıflaması sonucu oluşan ve özellikle harekette belli bozukluklar ile şekillenen dejeneratif bir santral sinir sistemi (SSS) hastalığıdır. Parkinson hastalığı substantia nigra ve corpus striatum'daki nöronların aktivitelerindeki azalmaya bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Bu bazal ganglionlar motor kontrolü sağlarlar. Ekstrapiramidal sistemin bir parçası olan substantia nigra striatum'da sonlanan nöronların çıkış bölgesidir. Her bir dopaminerjik nöron striatum içerisinde binlerce sinaptik bağlantı yaparak çok sayıda hücrenin fonksiyonunu etkiler. Bu nedenle, dopaminerjik sistem belirli hareketlerde rol almaktan çok motor aktivite üzerinde tonik, sürekli etki göstermektedir. Striatum, substantia nigra'ya, inhibitör transmitter GABA salıveren nöronlar ile bağlantılıdır. Substantia nigra'da striatum'a inhibitör transmitter dopamini

salıveren nöronlar gönderir. Bu karşılıklı yolaklar iki bölge arasındaki inhibisyonun belli bir düzeyde sürekliliğini sağlar. Serebral korteks ve talamus'tan gelen sinir lifleri neostriatuma asetilkolin salıverirler, neden oldukları eksitator etkiler vücudun istemli hareketlerini başlatır ve kontrol eder. Parkinson hastalığında substantia nigra'daki nöronların harabiyeti neostriatum'a dopamin salgılayan nöronların dejenere olmasına neden olur. Dopaminin neostriatum üzerindeki inhibitör düzenleyici etkilerinin azalması sonucunda kas hareketlerinin kontrolü bozulur (12, 13).

Genetik faktörler Parkinson hastalığına yatkınlık oluşturmaya rağmen bu hastalığın etiolojisinde baskın rol oynamazlar. Ancak nadir de olsa ailevi Parkinson hastalığı tanımlanmıştır. Kalıtsal özellikteki Parkinson hastalığı daha çok genç yaşlarda başlar ve tüm Parkinson hastalarının yaklaşık %5'ini oluşturur. Karı-kocanın her ikisinde de Parkinson hastalığının %2'den daha az sıklıkta görülmesi hastalığın bulaşıcı olmadığını göstergesidir. Eşlerin aynı çevreyi, aynı beslenme şeklini, hastalık ortaya çıkmadan yıllar önce paylaşmakta olmaları beslenmeye ait unsurların da hastalığa neden olmadığına işaret eder (9).

2.3. Parkinson Hastalığının Belirtileri

Parkinson hastalığı genellikle çok sinsi ve yavaş bir biçimde başlar, büyük çoğunluğunda sıklıkla ilk belirti bir elde veya el parmağında titremedir, kimi hastada ise yazı yazarken harflerde küçülme veya yüzünde donuk ifade ilk belirtiyi oluşturur.

Parkinson hastalığının titreme, kas sertliği ve hareket azlığı ile şekillenen üç temel belirtisinden en belirgin olan titreme genellikle hastanın doktora en sık başvurma nedenidir. Parkinson hastalarının yaklaşık %80'inde titreme ortaya çıkmaktadır. Titreme sıklıkla bir taraftaki elde, bazen bir ayakta ortaya çıkar. Diğer hastalıklarda görülebilen titremelere benzemeksizin, Parkinson hastalığında etkilenmiş olan el ve ayak dinlenme sırasında titrer. Titreme uyku sırasında ve o uzvun harekete başlamasıyla kaybolur (11, 14). Bazı hastalar uzuvlarda sertlik hissinden yakınır.

Parkinson hastalığının belki de özüllük yaratan en temel belirtisi olan hareketlerdeki yavaşlama yani bradikinezi, erken veya geç olarak her

hastada gelişir. Hareket yavaşlığı günlük yaşamdaki faaliyetlerin tümünün belli bir yavaşlıkta olmasına yol açar. Akinezi ise hareketsizlik anlamı taşır ve genellikle hastalığın ilerlemiş olduğu dönemlerde ortaya çıkar. Bu durumdaki Parkinson hastaları uzun süre izlendiğinde hareket yapma yeteneğini gözle görülür derecede yitirdikleri görülür, göz kırpması, doğal yüz ifadesini oluşturan hareketler, oturuşu düzeltme gibi yardımcı hareketler gözlenmez.

Ayakta dik duruş postüründe ağırlık her iki ayak üzerine eşit verilmiş, topuklar birbirine yakın, ayak burunları dışa dönmüş, üst ekstremiteler gövdenin yanlarında sarkık, baş aşağıya bakar ve bütün kaslar olabildiğince gevşektir (14). Ancak birçok Parkinson hastası öne doğru hafifçe eğik durma eğilimindedir. Yürürken ve ayakta dururken bu durum daha belirgin olur.

Parkinson hastalığında konuşma bozukluğu nadiren hastalığın başlangıcında ortaya çıkar. İlk değişiklik genellikle yumuşak tonda bir konuşma şeklindedir.

Boğaz kaslarının hareket azlığına bağlı olarak gıdaları yutma gücü ortaya çıkabilir. Yutma hızının azalmasının yanı sıra, çiğneme de yavaşlamış olduğu için yemek ağzın gerisinde ve boğazda birikir.

Hareket yavaşlığı ön planda olan Parkinson hastalarının el yazılarında harfler küçülme eğilimindedir. Harflerin şekilleri normaldir ama yazı yazdıkça giderek küçülür ve okunamayacak hale gelebilir. Bu duruma 'mikrografi' adı verilir.

2.4. Parkinson Hastalığının Tedavisi

Parkinson tedavisinde kullanılabilen sınırlı sayıda ilaç çeşidi vardır. Önemli olan belli bir hastanın bünyesinde gelişebilecek yan etkileri önceden kestirmek ya da bu etkileri ortadan kaldıracak girişimlerde bulunmaktır. Günümüzde Parkinson hastalığındaki belirtilerden sorumlu olan dopamin hücrelerinin hasarını onaracak kesin bir tedavi henüz bulunamamış olmakla birlikte, mevcut ilaçlar beyinde eksilmiş olan dopamini yerine koyar ya da onun etkisini taklit eder. Hastalığın erken evresinde, belirtilerin çok hafif olduğu durumlarda sadece koruyucu olduğu varsayılan ilaçlar (Selegilin, E vitamini gibi) verilerek hasta izlenir (15).

Tedavi protokolü her hastada farklı olmakla birlikte tedavi seçiminde dikkat edilecek özellikler şöyle sıralanabilir:

- a-Hastanın yaşı
- b-Hastalık evresi
- c-Önde gelen belirti
- d-Hastayı en fazla rahatsız eden belirti
- e-Mesleğini sürdürme veya emekli olma durumu
- f-Unutkanlığın varlığı
- g-Hastanın maddi gücü/sosyal güvencesi

Antiparkinson ilaçlar, temel etki mekanizmalarına göre iki grup altında toplanabilir (9):

a-Dopaminerjik etkinliği artıran ilaçlar

- Dopamin prekürsörleri
- Ergot alkaloidleri
- Diğer dopamin agonistleri

b-Antiparkinson etkili antimuskarinik ilaçlar (kimyasal yapısına göre)

- Tersiyer alkol türevleri
- Benzhidril eterler
- Diğer ilaçlar

Semptomatik etkileri ile, dopamin yetmezliğini düzeltmeyi hedefleyen ilaçlar (16):

- L-dopa
- Dopamin reseptör agonistleri
- Antikolinerjik ilaçlar
- Amantadin
- KOMT inhibitörleri
- MAO-B inhibitörleri

L-dopa ile tedavinin amacı yetersiz olan dopaminin düzeyini artırmaktır. Normalde substantia nigra'nın salgıladığı ve basal ganglionlara giden dopamin yetersizliğine bağlı Parkinson hastalığının tedavisinde L-dopa kullanılır. L-dopa'nın etkisi uzun süre kullanılmasına bağlı olarak

başlangıcından itibaren genellikle 2–5 yıl sonra dopaminerjik nöronlardaki dejenerasyonun devam etmesine bağlı azalır (17).

Dopamin agonistleri beyinin striatum bölgesindeki reseptör adı verilen dopaminin bağlanma yerlerini doğrudan uyararak Parkinson hastalığında eksilmiş olan dopamine benzer etki gösterirler.

Kolinerjik sistemin dopamin üzerine baskılayıcı etkisini kaldırmak amacıyla verilen antikolinerjik ilaçlar daha çok istirahat titremesine ve bazen de kas sertliğine etkilidirler. Günümüzde yan etkileri nedeniyle oldukça seyrek kullanılan bu gruptaki ilaçlar daha çok genç yaşta ve titremesi ön planda olan hastalarda tercih edilir.

Amantadin'in dopaminin sentezini ve salınmasını artırdığı ve depolanmak üzere geri alınmasını engelleyerek antiparkinson etki gösterdiği düşünülür. Normalde influenza tedavisinde kullanılan bir antiviral ajandır.

Katekol-O-Metiltransferaz (KOMT) enzimi inhibitörü, L-dopa'nın beyine geçmeden önce mide-barsak sisteminde KOMT enzimi ile yıkılmasını önler, böylece L-dopa'nın beyine daha fazla miktarda geçmesini sağlar (17).

Monoamin Oksidaz B (MAO-B) enzimi inhibitörü, dopaminin kimyasal olarak yıkılmasında rol oynayan enzimlerden biri olan MAO-B enzimi ile parçalanmasını önleyerek dopaminin etkinliğini artırır.

Parkinson hastalığında tedavi öncelikle ilaçlarla yapılır. Ancak kullanılan çeşitli ilaçlardan yeterli yarar görülmediği takdirde, hekimin gerek gördüğü bazı durumlarda cerrahi yöntemlere başvurulabilir. Bu girişimler hücre yakma (ablasyon) ameliyatları, pil (stimülasyon) ameliyatları, hücre nakli (transplantasyon) ameliyatlarıdır (15).

2.5. Hiperprolaktinemi

Prolaktin hipofiz ön lobunda bulunan laktotrop hücrelerden salınır, 198 aminoasit zincirinden oluşan bir polipeptit olup 3 disülfid köprüsü içerir. Yapısal olarak büyüme hormonu ile benzerlik gösterir ve plazma yarı ömrü 20 dakikadır. Prolaktin, östrojen ve progesteronla birlikte (ortak etkileşim) meme ve gonadlardaki reseptörleri etkileyerek laktasyonu başlatır ve devam ettirir. Gebelikte artmış olan östrojen salınışı laktotrop hücrelerin hiperplazisini ve hiperprolaktinemiye uyarır. Buna karşın prolaktinin meme

üzerindeki etkisini bloke ederek doğuma kadar süt salınışına engel olur. Prolaktin aynı zamanda gonadotropinlerin (FSH ve LH) overler üzerindeki etkilerini baskılar. Laktasyon sırasında veya prolaktinomalarda ovulasyonun olmaması prolaktinin gonadotrop hormonlar üzerindeki inhibitör etkisine bağlı olabilir. Prolaktinin erkekler üzerinde etkisi tam olarak bilinmemekle beraber aşırı salınışında libido azalması ve impotans gelişir. Prolaktin salınışı hipotalamusda arkuat nükleustan salınan prolaktin baskılayıcı faktör (PIF; hipotalamik dopamin) tarafından kontrol edilir ve laktotrop hücreler esas olarak hipotalamusun baskılayıcı etkisi altındadır. Bu nedenle hipotalamus veya pituitary sap lezyonlarında hiperprolaktinemi gelişir.

Prolaktin baskılayıcı faktör hipotalamik arkuat nükleusdan çıkan sinir aksonları ile primer portal pleksusa oradan ön hipofize taşınır. Normal serum prolaktin seviyesi: 5-22 ng mL⁻¹'dir. TRH, uyku, östrojen, vazoaaktif intestinal peptid (VIP) ve dopamin yapımını bloke eden bazı ilaçlar prolaktin salınışını arttırmırlar. Hiperprolaktinemi kadınlarda hipogonadizm ve galaktoreye yol açarlar. Libido azalır ve infertilite gelişir. Erkeklerde libido azalması, impotans, sperm sayısında azalma ve sonuçta infertiliteye neden olur. Yine orta yaş üstü kadınlarda hiperprolaktinemiye bağlı hipogonadizm ve östrojen azalması osteoporoz gelişim riskini arttırır. Buna karşın hipoprolaktinemi laktasyonu baskılar. *Sheehan* sendromu postpartum pituitary nekroz olup, akut hipofiz yetmezliğine neden olabilir. Doğumdan sonra laktasyonun başlamaması *Sheehan* sendromunun önemli bir belirtisidir. Lenfositik hipofizitis benzer şekilde genellikle doğumdan sonra gelişen otoimmün bir patoloji olup, aktif fazda hiperprolaktinemiye, daha geç dönemde hipopituitarizm ve hipoprolaktinemiye neden olur (18).

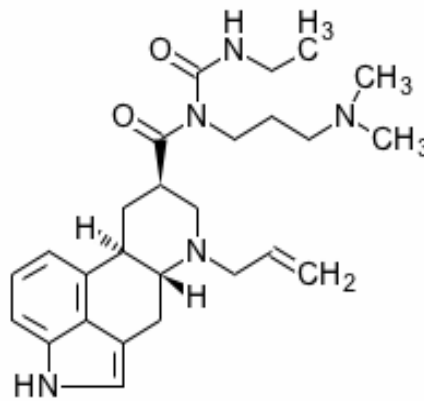
Hiperprolaktinemi Sendromu'nun en önemli nedenlerinden biri ise beyinde yer alan ve hormon salgılarını kontrol eden hipofiz bezinde oluşan tümörlerdir. Hiperprolaktinemi Sendromu'nun her bin kadından yaklaşık yirmi beşini tehdit ettiği bildirilmiştir. Bromokriptin uzun yıllardan bu yana prolaktinoma tedavisinde kullanılmaktadır. Klinik olarak Kabergolin kullanılmaya başlamasıyla Kabergolin'in etkilerinin incelenmesine yönelik araştırmalar artmıştır.

2.6. Kabergolin

Güçlü ve uzun süreli dopamin D₂ reseptör agonisti olan Kabergolin aynı zamanda prolaktin inhibitörü ve dopaminerjik etkilidir. Kabergolin'in özellikleri bu bölümde ayrıntılı olarak verilecektir (19).

2.6.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Kabergolin kimyasal olarak (8β)-N-[3-(Dimetil-amino)propil]-N-[(etilamino)karbonil]-6-(2-propenil)-ergolin-8-karboksamid yapısında olup açık formülü Şekil 2-1'de görülmektedir.



Şekil 2-1 Kabergolin'in kimyasal yapısı

Kabergolin'in molekül formülü C₂₆H₃₇N₅O₂, molekül ağırlığı 451.60'dır. Element analizi verilerine göre %69.15 C, %8.26 H, %15.51 N, %7.09 O içerir. Kokusuz beyaz renkte bir tozudur. Kabergolin; alkol, kloroform ve N,N-dimetil formamid'de iyi, 0.1 N HCl'de biraz, n-hekzan'da çok az çözünmektedir, suda ise çözünmez (20, 21).

2.6.2. Etki Mekanizmaları

Parkinson Hastalığındaki Etkileri;

Dopamin agonisti olan Kabergolin beynin striatum bölgesindeki reseptör adı verilen dopaminin bağlanma yerlerini doğrudan uyararak Parkinson hastalığında eksilmiş olan dopamine benzer etki gösterirler.

Hiperprolaktinemi'deki Etkileri;

Dopaminerjik etki göstererek idiyopatik ve hipofiz adenomuna bağlı hiperprolaktinemi tedavisinde kullanılır, prolaktin salgılanmasını durdurur.

2.6.3. Farmakodinamik Özellikleri

Fariello (22), Kabergolin'in farmakodinamik ve farmakokinetik özellikleri üzerine çalışmıştır. Uzun süre L-dopa kullanan Parkinson hastalarında geç motor komplikasyonları gözlenmektedir. Bu komplikasyonların etiyolojisinde hastalığın ilerlemesi olasılığı bulunmakla birlikte, L-dopa'nın yan etkileri de buna sebep olmaktadır. Bu yan etkilere, gastrointestinal kanal ve kan-beyin engelinden geçişte amino asitlerle ilacın yarışması ve ilacın plazmaya ani geçişiyle pik plazma derişimine hızla ulaşarak ani klirensiyle birlikte bütün dopamin reseptörlerinin güçlü seçici olmadan uyarılması neden olmaktadır. Bununla birlikte ileri nörodejenerasyon, postsinaptik dopamin reseptörlerinin (dopamin agonistlerinin terapötik hedefi) paylaşıldığı yer olan ve dopamin geri alımı ve iletiminden sorumlu olan anatomik yapıların kaybına neden olmaktadır. Teorik olarak, D₁ reseptörlerini de uyararak uzun etkili doğrudan dopamin D₂ reseptör agonistleri, üstte anlatılan yan etkiler olmadan, L-dopa'ya iyi bir alternatif olarak kullanılabilirler. Kabergolin, D₂ reseptörlerini devamlı ve düzenli olarak uyararak Parkinson hastalarında geç motor komplikasyonların oluşmasını en aza indirerek bu hipotezi doğrulamaktadır. Kabergolin'in uygun bir reseptör afinitesi olup 6-hidroksidopamin uygulanan kobay farelerde ve MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,5,6-tetrahidropiridin) uygulanan primatlarda etkin ve uzun süreli dopaminerjik stimülatör etkileri bulunmaktadır.

2.6.4. Farmakokinetik Özellikleri

Kabergolin, erken ve gelişmiş dönemlerdeki Parkinson hastalarında ve hiperprolaktinemi olgularında kullanılan, D₂ reseptörlerine yüksek afinite gösteren bir sentetik ergolin dopamin agonistidir. Kabergolin'in oral kullanımının ardından 2-3 saatte pik plazma derişimine ulaşılır (23).

Dotto ve Bonuccelli (1), Kabergolin'in klinik farmakokinetiği üzerine çalışma yapmıştır. Kabergolin, sağlıklı gönüllülerde ve Parkinson

hastalarında 0.5-7 mg doz aralığında doğrusal farmakokinetik gösterir. Kabergolin, plazma proteinlerine yaklaşık % 40 oranında bağlanır ve bağlanma oranı derişimden bağımsız olup yüksek bağlanma oranına sahip diğer ilaçların kullanımı Kabergolin'i etkilemez. Kabergolin'in mutlak biyoyararlanımı bilinmemektedir. Kabergolin büyük oranda karaciğerde açıl üre metabolitinin hidrolizi ile metabolize olur. Sitokrom P450 ile metabolizasyonu da küçük oranda gerçekleşir. Ana metabolitlerin terapötik etkisi yoktur. Uygulanan dozun önemli bir kısmı karaciğerden ilk geçiş etkisine maruz kalır, başlıca metabolit 6-allil-8β-karboksi ergolin olup %4'ünden azı idrarla değişmeden atılır.

Kabergolin'in farmakokinetik profili incelendiğinde 65-100 saatlik oldukça uzun plazma eliminasyon yarılanma ömrünün olduğu, absorpsiyon ve eliminasyonunun gıda, yaş, böbrek veya karaciğer yetmezliğinden etkilenmediği görülür (23). Bununla birlikte, Kabergolin L-dopa ile birlikte kullanıldığında, L-dopa'nın farmakokinetiğini etkilemez. Yeni klinik çalışmalar, Parkinson hastalarında Kabergolin'in etkinliğinin L-dopa'ya yakın olduğunu göstermiştir. Parkinson hastalığında uzun süreli Kabergolin ve L-dopa kullanımıyla ilgili bir çalışmanın ön bulguları, devamlı ve düzenli reseptör stimülasyonunun geç motor komplikasyonlarını azalttığı hipoteziyle uyushmaktadır (11). Kabergolin'in farmakokinetik özellikleri Parkinson hastalarının ilacı günde 1 defa kullanmasına olanak verirken hiperprolaktinemi hastaları ilacı haftada 2 defa kullanmakta, bu durum hasta uyuncu ve semptomların kontrolü açısından Kabergolin'i diğer dopaminerjik ilaçlardan üstün hale getirmektedir.

Kabergolin'in farmakokinetiği ve metabolik profili, her iki cinsiyetten sağlıklı gönüllülerde, hiperprolaktinemi ve Parkinson hastalarında incelenmiştir. Radyoaktif olarak işaretlenmiş bileşik oral yolla verildikten sonra, gastrointestinal kanaldan hızla absorbe olurken, plazmada radyoaktivite pikine 0.5-4 saat arasında ulaşmıştır. Uygulamalardan 10 gün sonra ¹⁴C-Kabergolin'in radyoaktif dozunun % 20'si idrarda, % 72'si feçeste bulunmuştur.

2.6.5. Yan Etkileri

Kabergolin baş dönmesine neden olabilir. Kabergolin'in bazı durumlarda aşırı gündüz uykusu ve aniden uykuya dalma vakaları ile bağlantılı olduğu görülmüştür. Görülen bu etkiler genellikle geçici ve hafif orta şiddetli olmuştur. Vakaların çoğunda (% 51) görülen yan etkiler, diskinezi, hiperkinezi, halusinasyon ve konfüzyon gibi sinir sistemi ile ilgili etkilerdir. Vakaların % 33'ünde gastrointestinal sisteme bağlı etkiler ortaya çıkmıştır. En sık rastlanılan etkiler, bulantı, kusma, dispepsi veya gastrit olmuştur. Vakaların % 27'sinde görülen kardiyovasküler sistem etkileri arasında en sık baş dönmesi ve hipotansiyon bildirilmiştir. Vakaların % 13'ünde solunum sistemi ile ilgili etki görülürken, plevral efüzyon/pulmoner fibrizyon % 2'den az sıklıkta bildirilmiştir. İlacın farmakolojik sınıfına bağlı vazokonstrüktif özelliklerin açısından beklenebilen diğer yan etkiler; hastaların yaklaşık %1'inde bildirilmiş olan anginadır. Her iki hastalıkta da, azınlıkta kalan bir hasta grubunda klinikle uyumlu, ağırlıklı ortostatik olmak üzere kan basıncı düşmesi gözlenmiştir (24).

Fizyolojik laktasyon inhibisyonu için 1 mg'lık tek doz ile tedavi edilen kadınlarda, en sık görülen yan etkiler baş dönmesi, baş ağrısı, mide bulantısı ve karın ağrısı olarak bildirilmiştir. Laktasyonun baskılanması için, 2 gün süreyle 12 saatte bir 0.25 mg ile tedavi edilen emziren kadınlarda, en sık görülen semptomlar; baş dönmesi, baş ağrısı, mide bulantısı, uyku hali ve karın ağrısı olmuştur.

2.6.6. İlaç Etkileşimleri ve Diğer Etkileşimler

Parkinson hastalarında, Kabergolin ile yürütülen klinik çalışmalarda L-dopa veya selegilin ile farmakokinetik etkileşimler açığa çıkmamıştır.

Kabergolin'in diğer ilaçlarla, özellikle de dopamin agonisti olmayan diğer Parkinson ilaçlarıyla eşzamanlı kullanılabileceği ve etkinliğini değiştirecek etkileşimlere yol açmadığı görünmektedir.

Kabergolin dopamin reseptörlerinin doğrudan stimülasyonu ile terapötik etki gösterdiğinden ve dopamin antagonisti diğer ilaçlar (fenotiazinler, butirofenonlar, tioksantenler, metoklopramid gibi) terapötik etkisini azaltabileceğinden, Kabergolin bu ilaçlar ile birlikte kullanılmamalıdır.

Ayrıca diğer ergot türevleriyle benzer şekilde, sistemik biyoyararlanım ve dolayısıyla yan etkide artış olacağı düşünülerek Kabergolin ile birlikte makrolid grubu antibiyotikler (eritromisin gibi) verilmemelidir (15).

2.6.7. Uyarılar ve Önlemler

Kabergolin'in, özellikle de Parkinson hastalığı olan kişilerde, uyku hali ve ani uyku atağı nöbetleriyle bağlantılı olduğu görülmüştür. Kabergolin'in farmakokinetik parametreleri böbrek yetmezliği olan hastalarda değişkenlik sergilemezken, ciddi karaciğer yetmezliği olgularında eğri altında kalan alan (EAA) değerinin arttığı gözlenmiştir. Bu nedenle ciddi karaciğer yetmezliği olan Parkinson hastalarında doz ayarlaması yapılmalıdır.

Diğer ergot türevlerinde olduğu gibi; ciddi kardiyovasküler hastalığı, Raynaud sendromu, peptik ülseri ya da gastrointestinal kanaması veya ciddi psikotik bozukluk hikayesi olan kişilerde Kabergolin dikkatle kullanılmalıdır.

Kabergolin kullanımından sonra, özellikle ilk günlerde semptomatik hipotansiyon görülebilir. Bu nedenle, Kabergolin kan basıncını azalttığı bilinen diğer ilaçlarla birlikte verildiğinde özellikle dikkatli olunmalıdır.

Halen alkolün ilacın tolere edilebilirliği üzerindeki etkileri bilinmemektedir (15).

Kabergolin formülde bulunan diğer maddelere ya da ergot alkaloidlerine karşı aşırı duyarlılık durumlarında kontrendikedir.

Gebelik ve emzirme dönemindeki kullanımında (Gebelik kategorisi: B) emziren kadınlarda emzirmeyi bıraktıktan sonra tedaviye başlamak ya da ilacın kullanımından kaçınmak konusunda karar vermek gereklidir.

Kabergolin sıçanlarda plasenta engelini geçebilir; halen bunun insanlarda da gerçekleşip gerçekleşmediği bilinmemektedir. Şimdiye kadar değerlendirilebilen gebelikler arasından % 85'i canlı doğum ile sonuçlanırken yaklaşık % 10'unda kendiliğinden düşük görülmüştür. Ayrıca terapötik düşükle sonlanan üç konjenital anomali olgusu (Down sendromu, hidrosefali, alt ekstremitelerde malformasyon) ve canlı doğumlar arasında üç minör anomali olgusu görülmüştür. Yukarıdaki verilere dayanılarak, Kabergolin kullanımının düşük, prematüre doğum, çoklu gebelik ya da konjenital anomali sayılarında bir artışla ilişkisi olduğu düşünülmemektedir. Sonuç olarak

Kabergolin tedavilerini en azından gebelikten bir ay öncesinden kesmelidirler. Eğer tedavi sırasında gebelik ortaya çıkarsa, hastanın gebe olduğu öğrenilir öğrenilmez tedavi kesilmelidir (25).

2.7. Kabergolin'in Analiz Yöntemleri

Persiani ve diğ. (2), Parkinson hastalığı ve hiperprolaktinemi tedavisinde klinik araştırması yapılan güçlü bir dopamin agonisti olan Kabergolin'e karşı bir antiserum elde etmiştir. Bu antiserum, sığır serum albuminine Kabergolin konjugasyonu ile üretilen immünojenle tavşanlarda immünizasyon yöntemiyle elde edilmiştir. Antiserum, trityumla işaretlenmiş Kabergolin türevini bağlamıştır, bu da Kabergolin'in benzer bileşikler ve Kabergolin'le tedavi gören hastaların plazmasında aynı anda bulunan diğer bileşiklerden ayrılmasını sağlamıştır. Antiserum ve trityumla işaretlenmiş haptene, plazmadan ve idrardan Kabergolin'in miktar tayini için bir radyoimmünoassay yöntemi geliştirilmesinde kullanılmıştır. 1.9-500 pg/tüp aralığında eklenen Kabergolin ile % radyoaktivite ilişkisi doğrusaldır. Yöntemde 200 µL insan plazması veya 25 µL idrar eklenmesi, radyoaktif işaretlenmiş haptene spesifik ve non-spesifik bağlanmasını etkilememiş ve sonuç olarak elde edilen duyarlılık, plazmada 12 pg mL⁻¹ ve idrarda 120 pg mL⁻¹ olmuştur. Plazmada ve idrarda çalışılan bütün derişim aralıklarında yöntemin tekrarlanabilirliği, kesinliği ve doğruluğu valide edilmiştir. İlaç 3, 5 ve 7 mg günlük dozlarda alan bir Parkinson hastasında ilaç sabit düzeye erişince alınan plazma örneklerinde, geliştirilen yöntem uygulanmıştır.

Pianezzola ve diğ. (3), Kabergolin'in plazma ve idrardan elektrokimyasal dedektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC-ECD) ile analizi üzerine çalışmışlardır. Plazma ve idrardan Kabergolin'in miktar tayini için duyarlı ve seçici bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Plazma ve idrar örneklerinin tamponlanması ardından, Kabergolin metilen klorür-izooktan karışımıyla tüketilmiş ve geri-tüketmeyle 0.1M fosforik aside çekilerek HPLC ile analiz edilmiştir. Yöntemin doğrusallığı, kesinliği ve doğruluğu tespit edilmiştir. Biyolojik matriksten (insan plazması ve idrar) gelen bir girişime rastlanmamıştır. Yöntem, insanlara oral yoldan 1 mg Kabergolin'in uygulanmasında plazmadan miktar tayini için yeterince duyarlı

değildir ancak, idrarda miktar tayini başarıyla uygulanmıştır. İlacın etki potensinin yüksek, dolayısıyla uygulanan dozun düşük olması uygun analitik yöntemin geliştirilmesini zorlaştırmıştır.

Hughes ve diğ. (4), Kabergolin ve pergolidin yüksek kütle ayırıcılığına sahip üçlü-kuadrupol kütle spektrometresi kullanılarak yüksek duyarlılıklı miktar tayini üzerine çalışmışlardır. Kabergolin'in plazmadan miktar tayini için sıvı kromatografisi/elektrosprey iyonizasyonlu seçici tepkime izleme ile yüksek duyarlılık (50 fg), geniş bir doğrusal aralıkta (50 fg-5 ng) doğruluk ve kesinlik sağlamıştır. Sıvı kromatografisi/atmosfer basıncı kimyasal iyonizasyonlu seçici tepkime izleme ile pergolidin plazmadan miktar tayininde de yüksek duyarlılık (500 fg), farmasötik endüstri standartlarına uygun doğruluk ve kesinlik sağlamıştır. Aynı şekilde, bu yöntem için de doğrusallık aralığı (500 fg-50 ng) belirlenmiştir. Pergolidin miktar tayininde üçlü-kuadrupol kütle spektrometresinin gelişmiş kütle çözünürlüğü özelliğinin kullanılması ile yüksek duyarlılık (250 fg) ve geniş bir doğrusallık aralığı (250 fg-50 ng) elde edilmiştir.

Igarashi ve diğ. (5), sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi ile Kabergolin ve L-dopa'nın insan plazmasından LC-MS-MS yöntemi ile miktar tayini üzerine çalışmıştır. Organik çözücü veya asit ile proteinlerinden arındırılan plazma örnekleri ters farz sıvı kromatografisi ile ayrılmıştır. İnsan plazmasından Kabergolin'in miktar tayini elektrosprey iyonizasyonlu LC-MS-MS cihazında çoklu tepkime izleme (MRM) uygulanarak gerçekleştirilmiştir (Kabergolin için m/z 381 ve m/z 452; L-dopa için m/z 152 ve m/z 198). Kabergolin kalibrasyon eğrileri 5-250 pg mL⁻¹ ve L-dopa için 1-200 ng mL⁻¹ aralıklarında doğrusallık göstermiştir. Tayin alt sınırları Kabergolin için 2 pg mL⁻¹, L-dopa için 0.1 ng mL⁻¹ olarak belirlenmiştir. Geliştirilen yöntem Kabergolin ve L-dopa kullanan hastalardan alınan plazma örneklerine bu ilaçların miktar tayini için uygulanmıştır. Yöntem kesinliği için hesaplanan değişkenlik katsayısı, 13.8-26.2 pg mL⁻¹ derişim aralığında Kabergolin için % 3.8-10.5; 302.5-522.1 ng mL⁻¹ derişim aralığında L-dopa için % 2.9-8.9 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, geliştirilen yöntem rutin analizler için oldukça uygundur.

Paul ve diğ. (6), Kabergolin'le ilgili nitel bilgi edinmek amacıyla, gelişmiş kütle ayırıcılığı modunda çalışan üçlü kuadropol kütle spektrometresinde elektrosprey iyonizasyonu (ESI) uygulanmıştır. ESI-MS ile kesin kütle tayinleri, Kabergolin'in saklanması sırasında oluşan protonize safsızlık ile gerçekleştirilmiş, Kabergolin'in reaksiyon safsızlıkları ve çarpışma kaynaklı iyon fragmanları tanımlanmıştır. Kesin kütle ölçümü sonucunda bu safsızlığın tek bir elementel bileşimde olduğu gösterilmiştir. Bu bilgi, safsızlığın yapısını belirlemede yeterli olmuş ve ESI-MS/MS bunu doğrulamıştır. ESI-MS/MS ile yapılan kesin kütle tayinleri, çarpışma kaynaklı dissosiyasyonlarla oluşan Kabergolin iyon fragmanları hakkında bilgi sağlamıştır. Böylece, kesin kütle ölçümü için en olası iyon fragmanların yapısı tayin edilmiştir. Bu iyon fragmanlarının tekrarlı kesin kütle ölçümleri ile hesaplanan tam kütleleri arasında 1.9 ve 2.1 mmu fark olup, standart sapmalar 0.4 ve 0.8 olarak bulunmuştur.

Kimball ve diğ. (7), elektrosprey iyonizasyonlu tandem kütle spektrometrisi ile Kabergolin'in pg düzeyinde tayini için kolon odaklamalı numune girişi ile çalışmışlardır. Tarla köpeği plazma ekstratından, bir ergot alkaloidi olan Kabergolin'in düşük-pg düzeyinde miktar tayini için elektrosprey iyonizasyonlu tandem kütle spektrometrisi yöntemi geliştirilmiştir. Göreceli olarak büyük hacimlerdeki numunelerin kütle spektrometresine tatbik edilebilmesi, bu yöntemin asıl başarısıdır. Bu başarı, analitin spektrometreye girişinden önce HPLC koruma kolonu (guard column) kullanılmasıyla sağlanmıştır. En az 900 µL'ye varan hacimler % 100 sulu hareketli faz kullanılarak koruma kolonuna enjekte edilebilmiştir. Kolonda tutunan Kabergolin, % 30 metanolün aniden eklenmesi ile bir bant şeklinde elüe edilip kütle spektrometresine gönderilmiştir. Numunenin akış enjeksiyonu sistemiyle verilmesiyle karşılaştırıldığında, bu yöntemde yüksek hacimli numune enjeksiyonu sayesinde tayin sınırı oldukça düşmüştür. Bu teknikle birlikte kaynaklardaki bir tüketme işleminin yeniden düzenlenmiş şekli uygulanarak tarla köpeği plazmasındaki Kabergolin 9 pg mL⁻¹ düzeyinde tayin edilmiştir.

Allievi ve Dostert (8), sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrisi kullanılarak insan plazmasından Kabergolin'in miktar tayini üzerine çalışmışlardır. İnsan plazmasından Kabergolin'in miktar tayini için elektrosprey iyonizasyonu kullanan sıvı kromatografi/kütle spektrometrisi (LC/MS) yöntemi geliştirilmiştir. Yöntemde dötöro iç standart eklenmesinin ardından sıvı-sıvı tüketmesi yapılmakta ve ters faz sıvı kromatografisi ile elektrosprey iyonizasyonu kombine edilmiş tandem kütle spektrometrisi (MS/MS) uygulanmıştır. Yöntemin tayin alt sınırı, seçilen tepkime izleme (SRM) ile 1.86 pg mL^{-1} 'dir, $1.86\text{-}124 \text{ pg mL}^{-1}$ derişim aralığında doğrusallık ($r>0.99$) ve tekrarlanabilirlik (BSS=% 10) göstermiştir. Kabergolin içeren plazma örneklerinin tekrarlı analizleri sonucunda gün içi kesinlik (BSS) % 2.4-17.0, günler arası kesinlik (BSS) % 7.9-10.7 aralıklarındadır. Yöntemin plazmadan geri kazanma değeri % 99.1 ± 10.2 (BSS=% 10.3; $n=78$) olarak bulunmuştur.

2.8. Spektrofotometri

Işık ile madde arasındaki etkileşmeden yararlanılarak gerçekleştirilen analiz yöntemleri, seçiciliği ve doğruluk derecesinin yüksek oluşu nedeniyle analitik amaçlar için sıkça kullanılmaktadır (26).

Spektrofotometri, bir örnekteki atom, molekül veya iyonların, bir enerji düzeyinden diğerine geçişleri sırasında absorplanan ya da yayılan elektromanyetik ışmanın ölçülmesi ve yorumlanmasıdır. Her atom, molekül veya iyonun elektromanyetik ışma ile kendine özgü ilişkisi vardır ve bunların dönme, titreşim ve elektronik enerjilerindeki değişiklikler spektroskopinin temelini oluşturur.

Elektromanyetik ışma uzayda çok büyük bir hızla hareket eden bir enerji türüdür. Elektromanyetik ışmanın en çok karşılaşılan türleri, gözle algıladığımız görünür ışık ve ısı şeklinde algıladığımız infrared (kırmızı ötesi) ışınlarıdır; x-ışınları, ultraviyole (mor ötesi), mikrodalga ve radyo ışınları ise elektromanyetik ışmanın diğer türleridir. Elektromanyetik ışmanın girişim (interferans) ve kırılma (difraksiyon) gibi davranışlarını tanımlamak için dalga özelliğinden yararlanır. Işma ile bir metal yüzeyinden elektronların koparılması (fotoelektrik olay) ve ışma enerjisinin bir madde tarafından

absorpsiyonu (soğurulması) ve emisyonu (yayılması) olaylarını açıklamak için ise dalga modeli yetersiz kalır. Bu olayları açıklamak için ışımının tanecik özelliklerini göz önüne almak, yani elektromanyetik ışımayı enerji taşıyan ve foton adı verilen tanecikler olarak düşünmek gerekir. Işımanın madde ile etkileşmelerini açıklayabilmek için bu iki model bir arada düşünülmelidir (26).

Vakumdan şeffaf bir madde ortamına giren ışın, maddenin atom veya molekülleriyle etkileşir. Etkileşme ışının elektriksel alanı ile maddenin bağ elektronları arasında olur ve maddenin yapısına bağlı olarak değişir.

Bu etkileşme sonucu başlıca şu olaylar meydana gelir:

- a-Işının geçmesi veya kırılması
- b-Işının yansımaları
- c-Işının dağılması
- d-Işının Raman saçılması
- e-Işının absorplanması

Spektrofotometri, ışın enerjisinin absorpsiyonuna dayalı bir yöntemdir. Işın ise elektromanyetik bir radyasyondur ve frekansı (ν) veya dalga boyu (λ) ile karakterize edilir. Frekans ve dalga boyu arasında;

$$c = \nu \lambda \quad (2-1)$$

bağıntısı vardır. Burada c ışımının yayılma hızıdır. Işımanın vakumdaki yayılma hızı, frekanstan bağımsız ve en yüksek değerindedir.

Enerji ise:

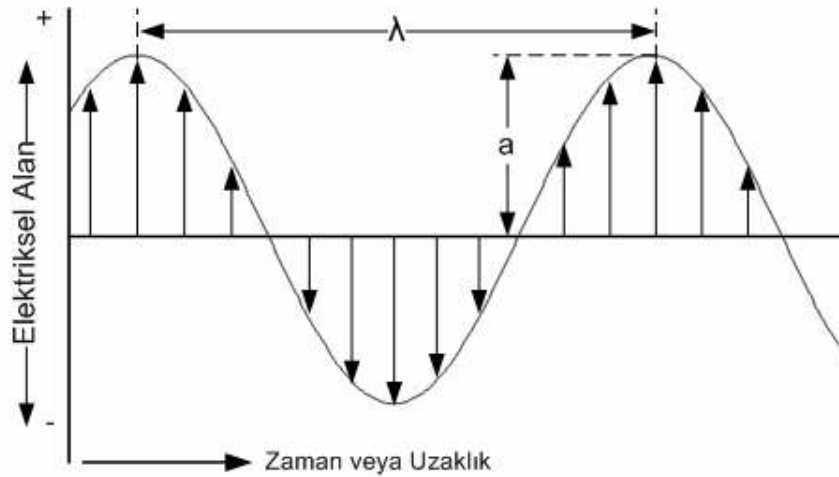
$$E = h\nu \quad (2-2)$$

veya

$$E = h \frac{c}{\lambda} \quad (2-3)$$

formülleriyle ifade edilir. Bu eşitlikte, h ; Plank sabiti ($= 6.62 \times 10^{-27}$ erg s ve vakumdaki hızı $c = 3 \times 10^{10}$ cm s⁻¹) dir. Bu eşitliklere göre, ışığın dalga boyu büyüdükçe enerjisinin azalmasına karşılık, dalga boyu küçüldükçe enerjisi artar.

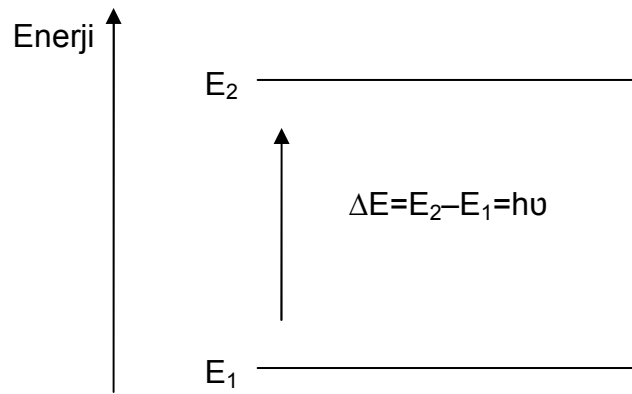
Elektromanyetik ışımanın dalga özelliği aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (Şekil 2-2).



Şekil 2-2 Elektromanyetik ışımanın dalga özelliği (a: genlik)

Işık; atom ve moleküller tarafından absorbe edilebilir. UV ve görünür alandaki ışığın absorpsiyonu molekülü oluşturan atomların bağ elektronları ile ilgilidir.

Absorbe edilen enerji kuantlıdır ve elektronların düşük enerjili orbitallerden (temel hal) daha yüksek enerjili orbitallere (uyarılmış hal) geçmesine neden olur. Ama her enerji absorbe edilemez; ancak iki enerji seviyesi arasındaki farka eşit bir enerji absorbe edilebilir (Şekil 2-3).

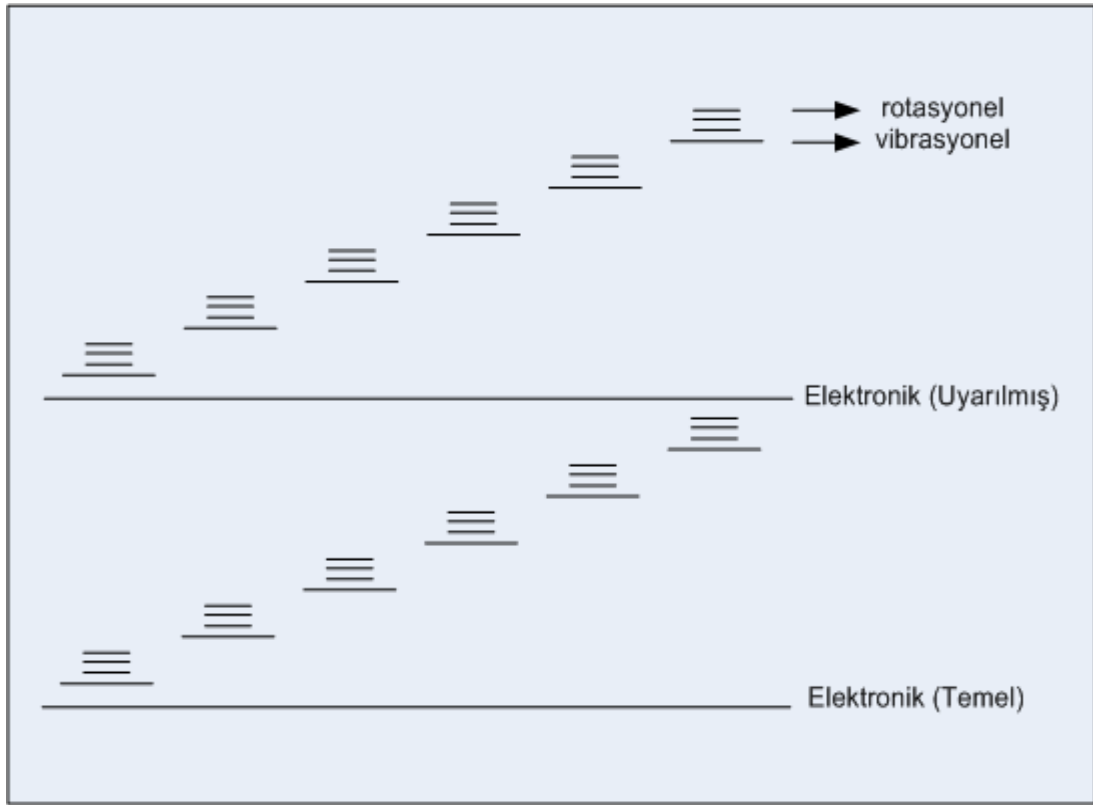


Şekil 2-3 Enerji seviyeleri arasındaki fark

UV ve görünür alandaki ışının absorpsiyonu aynı zamanda bir molekülün titreşim (vibrasyon) ve dönme (rotasyon) enerji seviyelerinde de değişikliğe neden olur; çünkü bir molekülün toplam enerjisi;

$$E_{\text{toplam}} = E_{\text{elektronik}} + E_{\text{titreşim}} + E_{\text{dönme}} + E_{\text{ötelenme}} \quad (2-4)$$

dir ve her bir elektronik enerji seviyesi çok sayıda titreşim ve dönme enerji seviyesinden meydana gelmiştir (Şekil 2-4).



Şekil 2-4 Moleküldeki enerji seviyeleri

Elektronik enerji diğer enerjilerden büyüktür. Bu nedenle, elektronik uyarılma sırasında titreşim ve dönme enerji seviyelerinde de değişme olur. Titreşim ve dönme enerjileri moleküldeki atomların titreşmesi ve molekülün dönmesi ile ilgilidir. Ötelenme enerjisi molekülün bütününün ötelenme hareketi ile ilgilidir ve en düşük enerjili harekettir.

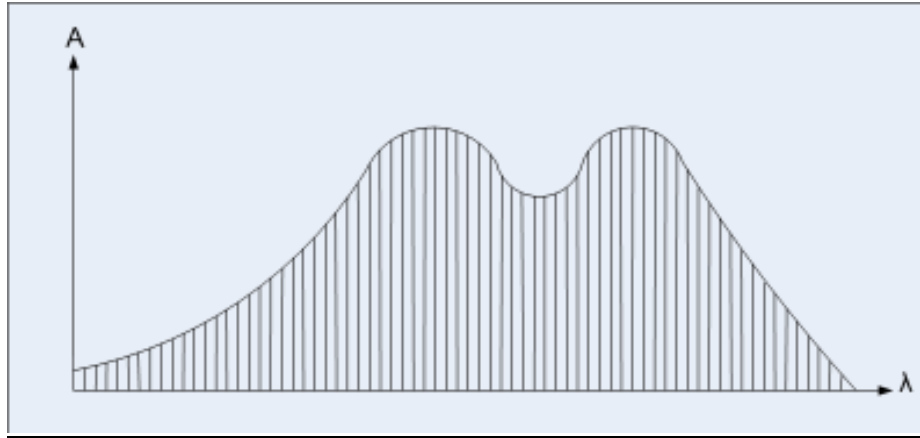
İki temel tip moleküler enerji çeşidi vardır:

- a- *Elektronik uyarılma*: $35\text{-}150 \text{ Kcal mol}^{-1}$, yani kimyasal bağlar seviyesinde bir enerji (200-800 nm'deki ışık) ile gerçekleşebilir. Bu olay sonucunda elektronlar daha yüksek enerjili orbitallere (antibağ orbitalleri) çıkarlar. Bu geçişler sırasında UV ve görünür alan spektrumu meydana gelir.
- b- *Nükleer titreşim*: $1\text{-}15 \text{ Kcal mol}^{-1}$ derecesinde bir enerji (2-25 μm ışık) ile gerçekleşebilir ve bu olay sonucunda infrared (IR) spektrumu meydana gelir.

Hangi spektrum bölgesinde olursa olsun belirli bir dalga boyundaki ışığın absorpsiyonu enerjiyi absorbe etme kapasitesine sahip bir yapının varlığının göstergesidir. Bu durum, dalga boyunun düzenli olarak değiştirilerek bir maddenin üzerine düşürülmesinden sonra, ışığın geçmeden önce ve geçtikten sonraki şiddetinin ölçülmesi ile belirlenir. Absorpsiyonun olduğu veya ışığın geçtiği dalga boyları kaydedilir. Absorpsiyon miktarının dalga boyunun bir fonksiyonu olarak kaydedilmesi sonucunda absorpsiyon spektrumu elde edilir.

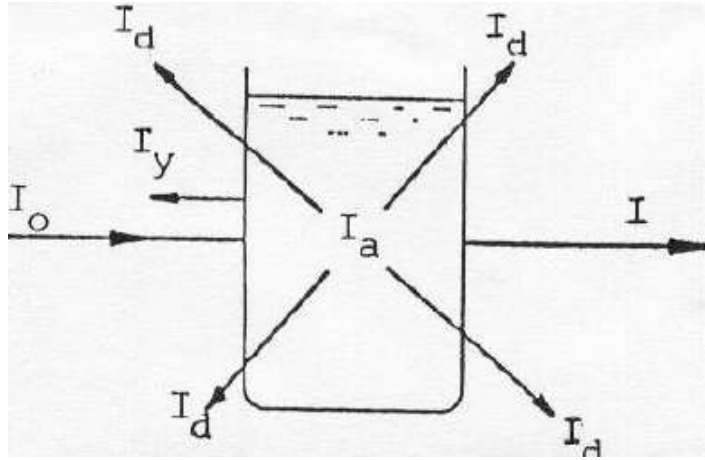
Atomların elektronik uyarılmaları sonucunda her bir yüksek enerjili atomik orbitale geçişe karşılık fotoğraf plağında bir çizgi gözlenir. Bir atomda da birden çok fazla sayıda atomik orbital olduğu için bu tür uyarılma için çok sayıda çizgiden meydana gelen “çizgi spektrumu” görülür (atomik absorpsiyon spektrofotometrisi).

Moleküllerde ise birden fazla sayıda atom içermeleri nedeni ile absorpsiyon sonucunda atomlar için gözlenen çizgilerin bir araya gelmesi söz konusudur ve bunun sonucunda “sürekli spektrum” meydana gelir (Şekil 2-5).



Şekil 2-5 Sürekli spektrum

Işık absorpsiyonu spektrofotometrelerde ölçülür. Bu ölçüm atom, iyon veya molekül üzerine gönderilen ışığın şiddeti (I_0) ile geçen ışığın şiddeti (I) arasındaki farkın ölçümü şeklindedir (Şekil 2-6). I_y yansıyan ışığın şiddeti, I_d ise dağılan ışığın şiddeti olarak gösterilir.



Şekil 2-6 Çözelti üzerine düşürülen bir ışın demetinde oluşabilecek olaylar

Işığın absorpsiyonu üzerine düştüğü atom, iyon veya molekülün derişimi ile orantılı olarak ilk kez Lambert ve Beer tarafından ortaya konulmuştur.

Beer'e göre aynı derinlikte bir çözeltiden geçen ve çözelti tarafından absorplanan monokromatik bir ışın demetinin şiddeti çözeltinin derişimiyle logaritmik, üstel veya geometrik olarak azalır. Bu gerçek;

$$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon C} \quad (2-5)$$

şeklinde verilir.

I_0 gelen ışının şiddeti, I çözeltiden çıkan ışının şiddeti, C ise çözeltinin derişimidir.

Lambert'e göre, bir çözeltiden geçen monokromatik bir ışın demetinin şiddeti, çözelti içinde aldığı yolla logaritmik, üstel veya geometrik olarak azalır. Bu gerçek;

$$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon b} \quad (2-6)$$

şeklinde gösterilir.

Yukarıda açıklanan iki kanun birleştirilerek,

$$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon \cdot b \cdot C} \quad (2-7)$$

denklemini elde edilir. Bu eşitlikte;

I : Numuneden çıkan ışığın şiddeti,

I_0 : Numune üzerine gönderilen ışığın şiddeti,

ϵ : Molar absorpsiyon katsayısı,

C : Absorpsiyon yapan numune derişimi (mol L^{-1}),

b : Işığın numune içerisinde aldığı yol (cm).

Eşitliğin eksi logaritması alınır,

$$\log \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot b \cdot C \quad (2-8)$$

olur.

$\log \frac{I_0}{I}$ 'ye absorbans denir ve A ile gösterilir. ϵ ise molar absorptivite

katsayısı olup, bu katsayı seçilen dalga boyuna göre değişir.

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot b \cdot C \quad (2-9)$$

Bu eşitlik kısaca,

$$A = \epsilon \cdot b \cdot C \quad (2-10)$$

şeklinde verilir ve bu eşitlikten derişim (C) hesaplanabilir. Bu bağıntıda, A değeri C 'ye karşı grafiğe geçirilirse eğimi $\epsilon \cdot b$ olan bir doğru elde edilir.

Derişim biriminin g L^{-1} alınması halinde A 'yı C 'ye bağlayan eşitlikte katsayı a ile gösterilir ve absorpsiyon katsayısı yada absorptivite adını alır.

$$A = a \cdot b \cdot C \quad (2-11)$$

A değeri C'ye karşı grafiğe geçirilirse doğru elde edilir ancak her zaman muntazam bir doğru elde edilemez diğer bir deyişle elde edilen eğrinin doğrusal olmadığı bölgeler vardır. Absorbans ışın yolu ile doğrusal değişir, bunun çok az istisnası vardır. Diğer taraftan, b sabit tutulurken, derişim ile ölçülen absorbans arasındaki doğrusal ilişkiden sapmalarla karşılaşılabilir. Bu sapmaların bazıları olayın doğasından ileri gelir ve Lambert-Beer kanununun gerçek sınırlamalarını gösterir. Diğerleri absorpsiyon ölçümlerinin yapılış tarzı veya derişim değıştikçe oluşan kimyasal değışim sonucu oluşmaktadır. Bunlar başlıca:

a-Cihazdan kaynaklanan sapmalar

b-Kimyasal maddelerden kaynaklanan sapmalar

c-Analizci hatasından ileri gelen sapmalar

dır (27).

a-Cihazdan Kaynaklanan Sapmalar

Bir sapmanın cihazdan gelip gelmediğini anlamak için, maksimum absorpsiyon dalga boyu ve absorpsiyon katsayısı bilinen saf bir maddenin uygun derişimde bir çözeltisi hazırlanır ve bu çözeltinin kalınlıkları farklı hücrelerdeki absorpsiyonları ölçülür. Bulunan absorbans değeri çözelti kalınlıklarına karşı grafiğe geçirilir. Cihazda bir hata yoksa elde edilen grafiğin bir doğru olması gerekir. Aksi halde cihazda bir hata var demektir. Bu hatalar; cihaza gelen potansiyelin düzgün olmaması, ışın kaynağının iyi çalışmaması, dedektör sisteminin iyi çalışmaması, kaçak ışınların olması, monokromatörün (dalgaboyu seçicisi) hatalı olması, slit ayarının uygun olmaması, vb. olabilir. Çift ışın demetli cihazlarda ilk üç kaynaktan gelen hatalar en aza indirilmiştir.

Işınlardan kaynaklanan sapmalar; polikromatik ışıktan kaynaklanan aletsel sapmalar ve kaçak ışıklardan kaynaklanan sapmalar olmak üzere iki grupta incelenebilir (27).

b-Kimyasal Maddelerden Kaynaklanan Sapmalar

Lambert- Beer kanununa göre derişim absorpsiyon bağıntısı koordinatlar sisteminin sıfır noktasından geçen bir doğrudur. Ama ölçüm yapılan çözeltide meydana gelen ayrışma (dissosyasyon), birleşme (assosyasyon), iyonlaşma, kompleks oluşumu, fosforesans ve fluoresans olayları, çözeltinin pH'sı ve ortam ısısı gibi olaylar nedeniyle sapmalar gözlenir.

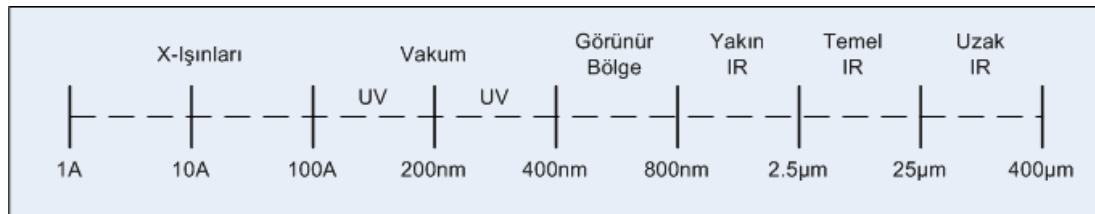
Örneğin; bir analit ayrıştığında, çeşitli türlerle birleştğinde veya çözücü ile farklı absorpsiyon spektrumu olan bir ürün vermek üzere tepkime verdiğinde, Lambert- Beer kanunundan belirgin sapmalar görülür (27).

c-Analizci Hatasından İleri Gelen Sapmalar

Analizcinin dikkatsizliğinden ve bilgisizliğinden ileri gelen sapmalar olabilir. Bunlar, uygun olmayan çözücülerle çalışmak, yüksek absorplama derişimlerinde çalışmak, çözelti içinde kabarcıklar ve asılı parçacıkların bulunması, çözeltinin ölçüldüğü kabın kirli ve çizik olması gibi sebeplerden ötürü oluşan sapmalardır (27, 28).

2.9. UV ve Görünür Bölge Spektrofotometrisi

Görünür ışık toplam elektromanyetik radyasyonun çok küçük bir bölümüdür (400-800 nm) ve insan gözü tarafından renk olarak algılanır. 400 nm olan alt ucunda mor renk vardır ve gökkuşağı renklerini takip ederek 800 nm olan üst sınıra geldiğinde kırmızı renk görülür. Görünür ışığın altındaki bölgeye (100-400 nm) UV bölgesi, üstündeki bölgeye ise (800 nm-25 μ m) IR bölgesi adı verilir (Şekil 2-7) (29).

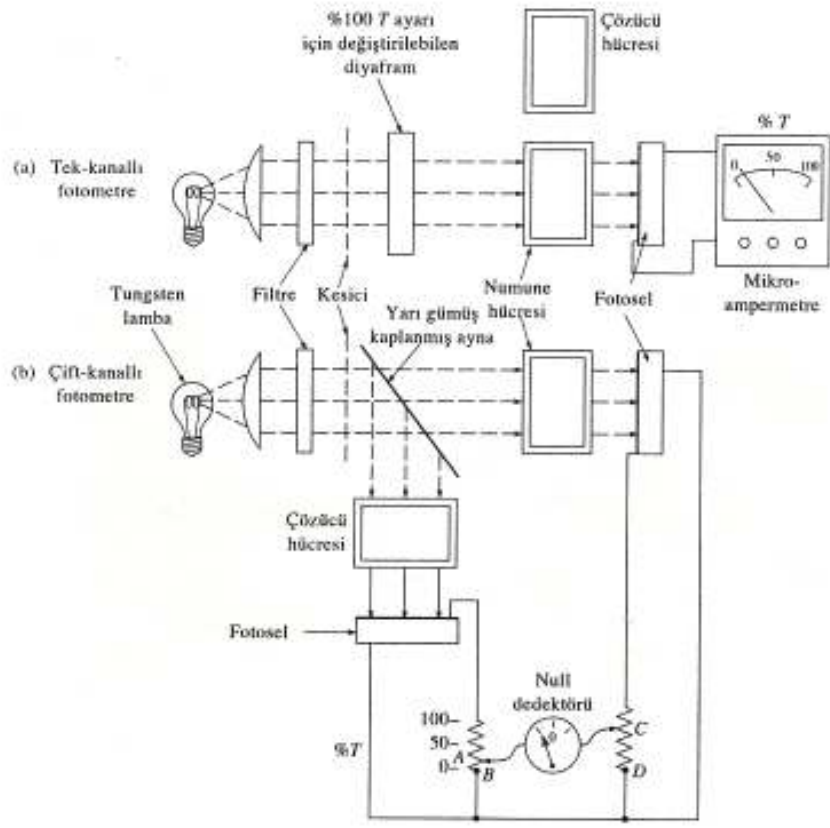


Şekil 2-7 Elektromanyetik radyasyonun spektral alanları

Moleküllerin elektromanyetik dalgalarla, özellikle UV, görünür bölge ve IR ışınları ile uyarılması sonucu meydana gelen absorpsiyondan, molekül hakkında nitel ve nicel bilgi edinmek mümkündür. UV ve görünür bölgedeki ışık kullanıldığında bileşiklerdeki atomların dış elektronları, cinslerine ve konumlarına göre bu ışığın belli dalga boylarını absorbe ederler ki bu özellik dış elektronların uyarılmasına dayandığından bu yöntem, görünür ve UV bölge spektroskopisi veya elektron spektroskopisi adını alır. Bu yöntemden maddelerin yapı aydınlatmalarında ve miktar tayinlerinde yararlanılır. UV ve GB absorpsiyon teknikleri, maddelerin yaklaşık 190-900 nm dalga boyları aralığında ışık absorplaması ölçümlerine dayanan analitik yöntemleri kapsar (26).

UV-GB absorpsiyon spektroskopisi, nicel amaçlarla en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Hem organik hem de inorganik maddelerin tayininde kullanılabilmesi, son gelişmelerle 10^{-6} - 10^{-7} M civarına kadar duyarlı olması bu yöntemi çekici hale getirmektedir. Yine bu yöntemle iyi bir kesinlik ve doğruluk sağlamak mümkündür. Zira yöntemin bağıl doğruluktan sapmasının %1-3 arasında olduğu, bazı tedbirler alınarak bu belirsizliğin çok daha aşağı düşürülebildiği belirtilmiştir. Bunlardan başka yöntemin kolay veri elde etmede fark edilir bir üstünlüğünün olduğunu belirtmek gerekir (30).

Tek ışın yollu ve çift ışın yollu spektrofotometreler bulunmaktadır (28) (Şekil 2-8).



Şekil 2-8 Tek ve çift ışın yollu spektrofotometrenin şeması

2.10. Türev Spektrofotometrisi

2.10.1. Giriş

Türev tekniğinin kuramsal temelleri ilk kez 1953 yılında Hammond ve Price tarafından ortaya konulmuş, bunu Morrison (1953), French (1954) ve Gieseif (1955)'in çalışmaları izlemiştir. İkinci ve daha yüksek türev dereceleri Martin tarafından (1959) tartışılmıştır. Daha ileri çalışmalar, O'Haver ve Green tarafından (1975-76) gerçekleştirilmiş ve tekniğin etkinliğinin yanı sıra yararları da açıklanmıştır (31).

Türev tekniği analitik spektrofotometri de artan bir kullanıma sahiptir. Bu yöntem, sadece UV-GB'de değil, aynı zamanda, IR, atomik absorpsiyon spektroskopisi (AAS), alev emisyon spektroskopisi ve fluorimetride de

uygulama alanları bulmuştur. Ancak, diğer türev spektrofotometrisi tekniklerine oranla türev spektrofotometrisi UV-GB çalışmalarında çok daha geniş bir alanda uygulanmaktadır. Bunun nedeni UV-GB spektrumlarında üst üste binen, yani çakışan bantlar daha geniş görülür ve ayırım gücü zayıftır. Bunun yanında sinyal/gürültü oranı da düşüktür. Türev uygulamaları bu sorunlara belli oranlarda çözüm getirmiş ve karakteristik pikleri az olan ve çözülmemiş bantları içeren spektrumların ayırım gücünü arttırmıştır.

Yöntemin sakıncaları ise, yüksek türev derecelerinde sinyal/gürültü oranının azalması ve pik şekillerinin bozulmasıdır. Bu nedenle uygulanacak türevin derecesi iyi seçilmelidir.

2.10.2. Teorik Temelleri

UV spektrumu, madde üzerine gönderilen ışığın dalga boylarına karşı absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile elde edilir. Orijinal spektrum veya 0. derece spektrumda $A = f(\lambda)$ fonksiyonudur. Bir fonksiyonu gösteren eğrinin herhangi bir noktasındaki teğetin eğimi, fonksiyonun bu noktadaki türevidir. Bu fonksiyonun her noktasındaki türevi $\left(\frac{dA}{d\lambda}\right)$ hesaplanabilir.

Eğer bu türev değerleri grafiğe geçirilecek olursa “Türev spektrumu” elde edilir ve türev 1’den n’e kadar derecede olabilir.

$$\frac{dA}{d\lambda}, \frac{d^2A}{d\lambda^2}, \dots, \frac{d^nA}{d\lambda^n} \quad (2-12)$$

Türev spektrofotometrisi türev spektrumlarının kullanılması esasına dayalı bir analiz yöntemidir.

1. Derece türev spektrumunda pik dönümlerinde ϵ ’nin bir birim değişimine karşılık A sıfır değişim göstereceğinden bu noktadaki teğetin eğimi sıfır olur yani apsise paralel olur. Sonuçta türev eğrisi sıfırdan geçer ve apsisi keser, Şekil 2-9’da görüldüğü gibi bir çan eğrisinin 1. derece türev eğrisi orijinal spektrumdaki eğrinin teğetlerinin eğimini göstermektedir ve iki dönüm noktası ($n + 1$, n: türev derecesi) tane pik gösterir. Böylece

türevlendirme ile spektrum daha ayrıntılı ve net bir görünüm kazanır.

$A = \epsilon b C$ eşitliğinin dalga boyuna göre 1.derece türevi şöyledir;

$$\frac{dA}{d\lambda} = - C b \frac{d\epsilon}{d\lambda} \quad (2-13)$$

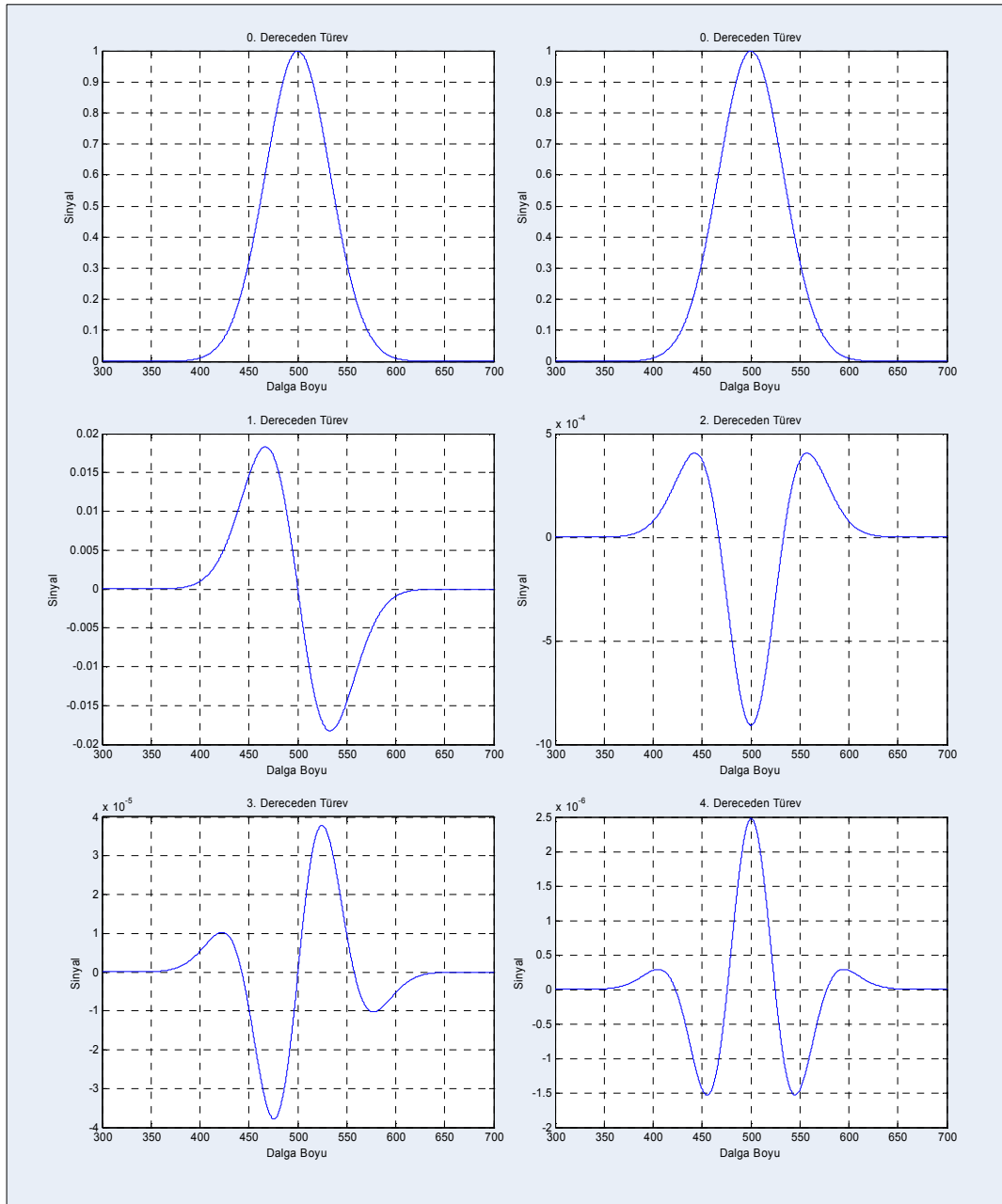
1. Derece türev, her ϵ 'da C ile doğrusal ilişkilidir. 1. Derece türev eğrisinde orijinal spektrumun maksimum noktası kaybolmuş buna karşılık orijinal spektrumda absorbansın yükseldiği kısımlar için pozitif, azaldığı kısımlar için negatif değerler almıştır. 1. Derece türev eğrisi orijinal spektrumdaki eğri üzerinde eğimin en büyük olduğu noktalara yani eğrinin yarı yüksekliğine karşılık bir maksimum ve bir minimum göstermekte, eğimin en düşük olduğu tepe noktasında ise sıfır olmaktadır. Bükülmenin olduğu yerde ölçüm daha duyarlıdır. Çünkü burada $\frac{d\epsilon}{d\lambda}$ 'nın daha yüksek değerleri vardır.

2. Derece türev için eşitlik aşağıdaki şekli alır;

$$\frac{d^2 A}{d\lambda^2} = C^2 b^2 \left(\frac{d\epsilon}{d\lambda} \right)^2 - C b \left(\frac{d^2 \epsilon}{d\lambda^2} \right) \quad (2-14)$$

ϵ 'nun 1. derece türevi $\frac{d\epsilon}{d\lambda}$ sıfıra eşitse, C ile doğrusal orantı gözlenir.

ϵ 'nun 2.derece türevi $\frac{d^2 \epsilon}{d\lambda^2}$ yüksek bir değere sahipse duyarlılık daha da artar.



Şekil 2-9 Absorbans ve türev spektrumları

2. Derece türev eğrisinde ise aynı işlemler sonucunda orijinal eğrinin maksimum noktasına karşılık gelen bir minimum görülmektedir. Ayrıca tek bir pik içinde kaybolmuş olan ve belli belirsiz omuzlar yapan iki veya üç pik daha net şekilde açığa çıkar. Bu nedenle ikinci türev uygulamada en çok kullanılan tekniktir.

3. Derece türevi;

$$\frac{d^3 A}{d\lambda^3} = -Cb \left(\frac{d^3 \varepsilon}{d\lambda^3} \right) + 3C^2 b^2 \left(\frac{d\varepsilon}{d\lambda} \right) \left(\frac{d^2 \varepsilon}{d\lambda^2} \right) - C^3 b^3 \left(\frac{d\varepsilon}{d\lambda} \right)^3 \quad (2-15)$$

şeklindedir. $\left(\frac{d\varepsilon}{d\lambda} \right)$ 'nın C ile doğrusal olması için sıfır olması gerekir.

3. Derece türev eğrisinde orijinal eğrinin maksimum noktasına aynen 1. derece türev eğrisinde olduğu gibi bir kesim noktası karşılık gelmektedir. Özellikle yüksek ölçüm duyarlılığı eğrinin küçük aralıklarında ve bükülme noktasına çizilen yatay tanjantlarla omuzlarda elde edilir.

4. Derece türev için eşitlik;

$$\frac{d^4 A}{d\lambda^4} = -Cb \left(\frac{d^4 \varepsilon}{d\lambda^4} \right) + 4C^2 b^2 \left(\frac{d\varepsilon}{d\lambda} \right) \left(\frac{d^3 \varepsilon}{d\lambda^3} \right) + 3C^2 b^2 \left(\frac{d^2 \varepsilon}{d\lambda^2} \right)^2 - C^4 b^4 \left(\frac{d\varepsilon}{d\lambda} \right)^4 \quad (2-16)$$

şeklindedir.

4. Derece türev eğrisinde orijinal eğrideki maksimum noktaya yine bir maksimum nokta karşılık gelmektedir. Bu nedenle miktar tayinlerinde 2. ve 4. türev eğrileri kullanılmaktadır.

Doğrusal orantı için $\left(\frac{d\varepsilon}{d\lambda} \right)$ ve $\left(\frac{d^2 \varepsilon}{d\lambda^2} \right)$ 'nin değerlerinin sıfıra eşit olması

gerekir.

Absorpsiyon bandı aynı zamanda analitik bant olarak da adlandırılarak Gauss veya Lorentz fonksiyonları ile açıklanabilir. Türev spektrofotometrisi iki veya daha çok Gauss veya Lorentz eğrisinin üst üste binmesiyle oluşan eğrilerin incelenmesinde de kullanılmaktadır. Gauss'a göre belli bir λ 'da bandın absorpsiyonu şöyledir.

$$A_{\lambda} = E_{\text{maks}} \cdot e^{-C\lambda^2} \quad (2-17)$$

E_{maks} = Maksimum absorpsiyon absorptivitesi

C = Derişim

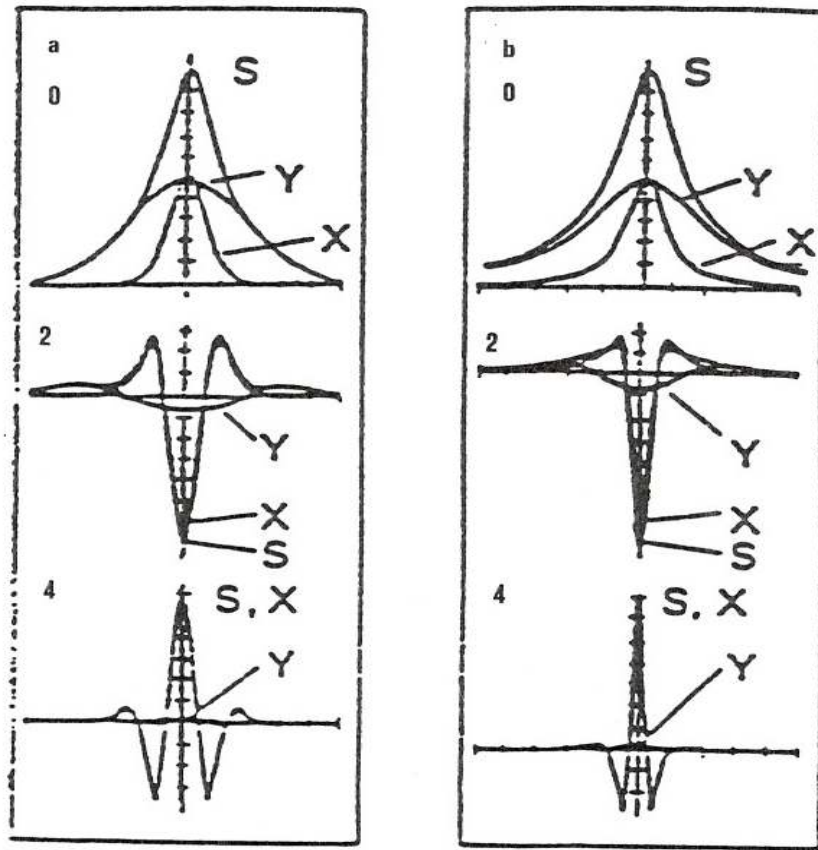
Türev almanın sağladığı bir yarar da türev derecesi arttıkça geniş bantların dar bantlara göre daha fazla baskılanmasıdır. n. Türevdeki sinyalin büyüklüğü (D_n), orijinal bandın genişliğinin (W) n. üssü ile ters orantılıdır.

$$D_n \propto \left(\frac{1}{W^n} \right) \quad (2-18)$$

Bu nedenle bir arada bulunan ve sinyalleri aynı olan (maksimum dalga boyu aynı merkezleri aynı), bant genişlikleri farklı olan iki banttan dar olanın (W_{dar}), n. türevdeki sinyali (D_n , dar) geniş olan bandın ($W_{\text{geniş}}$) sinyalinden (D_n , geniş) daha büyüktür ve türev derecesi artmasıyla bu yükseklik farkı da artacaktır (32-34).

$$\frac{D_{n, \text{dar}}}{D_{n, \text{geniş}}} = \left[\frac{W_{\text{geniş}}}{W_{\text{dar}}} \right]^n \quad (2-19)$$

Bu özellikten yararlanılarak numune matriksinden ileri gelen ve bozucu etki gösteren geniş bantlar elimine edilebilir. Bu da 2. ve 4. türevlerde nitel ve nicel olarak analiz yapılabilir (Şekil 2-10).



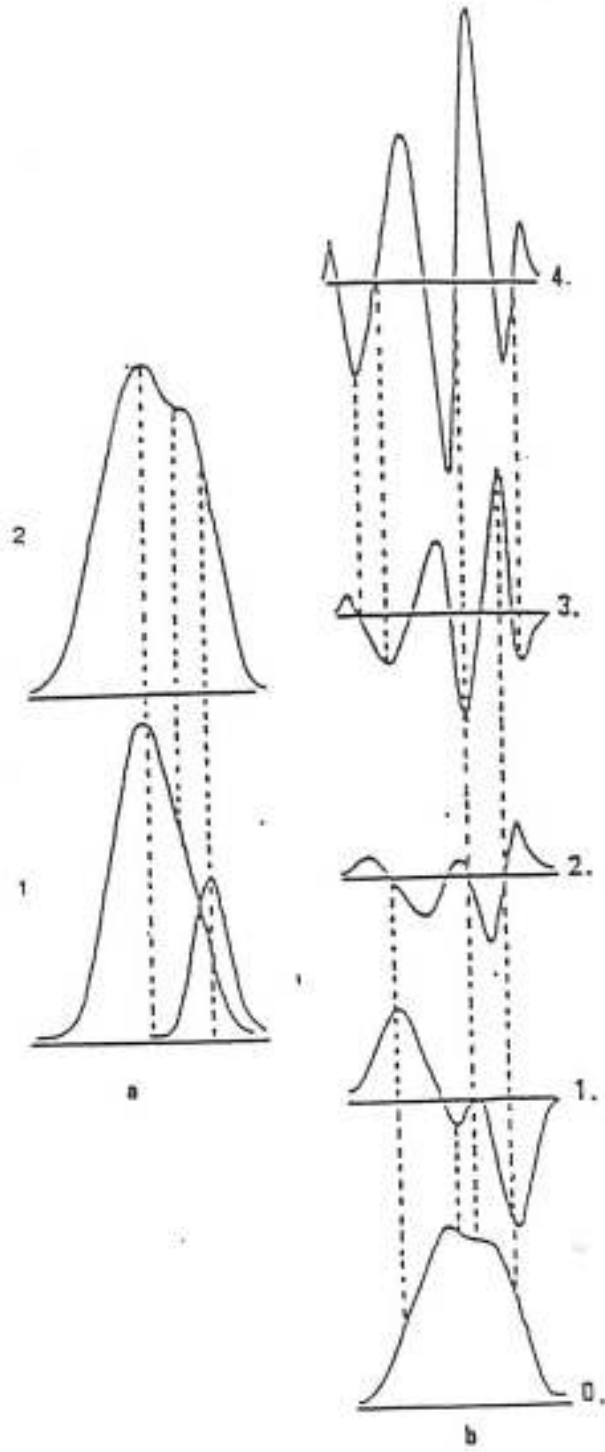
Şekil 2-10 Türev derecesi ile bant genişliğinin türev yüksekliğine etkisi

(X, Y: Madde, S: Karışım)

a) Gauss eğrisi 2. ve 4. derece türev eğrileri

b) Lorentz eğrisi 2. ve 4. derece türev eğrileri

Maksimum dalga boyları farklı olan Gauss eğrisinin tek tek ve karışım halindeki spektrumları Şekil 2-11.a'da görülmektedir. Maksimum dalga boyları farklı yani merkezleri aynı olmadığından karışım halinde alınan spektrumları bir omuz verir. Bu bantların türevleri alınarak omuzlar düz noktalar haline dönüştürülür (Şekil 2-11.b).



Şekil 2-11 a) Gauss eğrisinin 1. tek tek ve 2. karışım halindeki spektrumları
 b) Gauss eğrisinin karışım halindeki 1.-4. türev eğrileri

Orijinal Gauss eğrisi tipindeki bir pike karşılık n. türevde n+1 tane maksimum ve minimuma rastlanmaktadır. Yani 1. derece türev eğrisinde iki, 2. derece türev eğrisinde üç, 3. derece türev eğrisinde ise dört maksimum ve minimum nokta görülmektedir.

Önemli bir nokta ise türev eğrilerinin aynı dalga boyu aralığı içinde alınmasıyla türev derecesi ilerledikçe piklerin (merkez bandının) genişliğinin azalmasıdır. Bu azalma yaklaşık normal spektrumun birinci türevde yarısına, ikinci türevde % 53'üne, dördüncü türevde % 41'ine, altıncı türevde ise % 34'üne inmektedir. Bu olgu iki farklı bileşiğin üst üste binen bantlarının birbirinden ayrılmasını sağlayarak bileşiklerin analizine imkan verir. Fakat verilen yüzdelerden de anlaşıldığı gibi türev derecesi arttıkça bant daralması yavaşlamakta ayrıca temel pikin yanlarında oluşan uydu piklerin sayısı artacağından iki bandı birbirinden ayırmak zorlaşmaktadır.

Türev spektrumundan yararlanarak bir karışım içerisinde bulunan spesifik bir maddenin teşhis edilmesi mümkün olduğu gibi diğer bileşiklerin absorpsiyon yapmadığı bir dalga boyu bulunursa bileşiğin nicel analizi de yapılabilir.

Kuramsal olarak türev absorbansı ile bileşiğin derişimi arasında aşağıdaki bağıntı vardır:

$$0. \text{ derece türev } A = \epsilon b C \quad (2-20)$$

$$1. \text{ derece türev } \frac{dA}{d\lambda} = \frac{d\epsilon}{d\lambda} bC \quad (2-21)$$

$$n. \text{ derece türev } \frac{d^n A}{d\lambda^n} = \frac{d^n \epsilon}{d\lambda^n} bC \quad (2-22)$$

2.10.3. Dalga Boyu Aralığı ($\Delta\lambda$)

Türev spektrumu alınırken seçilen dalga boyu aralığının türev sinyaline, ayırıcılığa, sinyal/gürültü (S/N) oranına etkisi göz önüne alınır.

2.10.4. $\Delta\lambda$ ' nın Türev Sinyaline Etkisi

Belirli bir $\Delta\lambda$ değeri türev sinyalinin küçülmesi ve ayırıcılığın azalması şeklinde etki yapar. Gerçek türev spektrumuna (H_n) karşı; hesaplanan türevin eğrisi bir bozulma faktörü (F_n) kadar değişir. Yani gerçek pikte $\Delta\lambda.F_n$ kadar pik taban-tavan yüksekliğinde azalma olur.

$$F_n \Delta\lambda = H_n \frac{\Delta\lambda}{H_n} (d\lambda) \quad (2-23)$$

$\Delta\lambda$ ve türev derecesi (n) büyüdükçe sinyal büyür ve pikin taban-tavan uzaklığı artar. Buna karşılık gürültü sinyalinin büyüklüğü orijinal spektrumda N_0 ise;

1. derece türevde gürültü düzeyi (N):

$$N_1 = \sqrt{N_0^2 + N_0^2} = \sqrt{2} N_0^2 \quad (2-24)$$

veya $N_1 = 0$ olurken,

2. derece türevde;

$$N_2 = \sqrt{N_0^2 + (2N_0)^2 + N_0^2} = \sqrt{6} N_0^2 \quad (2-25)$$

3. derece türevde;

$$N_3 = \sqrt{20} N_0 \quad (2-26)$$

4. derece türevde;

$$N_4 = \sqrt{70} N_0^2 \quad (2-27)$$

Yani gürültü düzeyi (N), $\Delta\lambda$ 'dan bağımsız, sinyal ise bağımlı bir değişkendir. S/N oranı $\Delta\lambda$ ile büyür. Türev derecesi büyüdükçe gürültü sinyali de büyüyecek ve S/N oranı küçülecektir. Çeşitli nedenlerle ortaya çıkan gürültü sinyalleri tekrarlanan spektrumların ortalamaları alınarak ortadan kaldırılabilir. Çeşitli derecelerdeki pratik türev tekniklerinde düzeltme (*smoothing*) ya da düşük geçiş filtresi (*low-pass filtering*) ile gürültünün artışı kontrol edilmiştir (35). 'Smoothing' etkisi iki değişkene bağlıdır.

- 1- 'Smoothing' oranı: Maksimumun yarısında tam pik genişliğine bağlı çizilen teğet sayısı (M) ile 'smoothing' yapılan pik genişliği oranıdır.
- 2- 'Smoothing'ın kaç kez yapıldığı.

Zamana bağlı türev hesabında $\Delta\lambda$ 'nın büyüklüğü doğrudan tarama hızına (T) bağlı olarak değişir. 1. Derece türevde $\Delta\lambda = \frac{T}{n}$ olarak alınmalı, 2. derece türevde bu değer bir kat büyük olmalıdır ki S/N oranı aynı oranda tutulabilsin ve ayırıcılık gücü yeterli olsun.

$$4. \text{ derece türevde } \Delta\lambda = \frac{T}{4} \text{ ise, elde edilen türev değeri } \Delta\lambda = \frac{T}{2} \text{ olduğu}$$

durumdakinden bir kat daha büyük olur. Sinyalin bu şekilde düşmesi zemin girişiminin etki oranını artırır.

2.10.5. Türev Derecesi (n)

İki pikin yükseklikleri Y_0^A ve Y_0^B , taban genişlikleri T_A ve T_B ise, n. dereceden türevlerinde maksimum pik tavan-taban yükseklik farkları Y_n^A ve Y_n^B ise, bunların oranı;

$$\frac{Y_n^A}{Y_n^B} = \left(\frac{Y_0^A}{Y_0^B} \right) \left(\frac{T_B}{T_A} \right)^n \quad (2-28)$$

olur. Türev derecesinin artması ile geniş pik küçülür ve dar pik belirginleşir. Gürültü pikleri de dar, sivri olduğundan belirginleşir.

2.10.6. Ayırıcılıkta Artış

Türev derecesi arttıkça sinyalin küçülmesi zemin girişiminin etkisini artırır. Zemin girişimlerinin giderilmesi ile de ayırıcılık artar. Zemin girişimi n.dereceden bir polinomla ifade edilebilir (32).

$$P = a_0 + a_1\lambda + a_2\lambda^2 + a_3\lambda^3 + \dots + a_n\lambda^n \quad (2-29)$$

$$\frac{d^n P}{d\lambda^n} = n!a_n \quad (2-30)$$

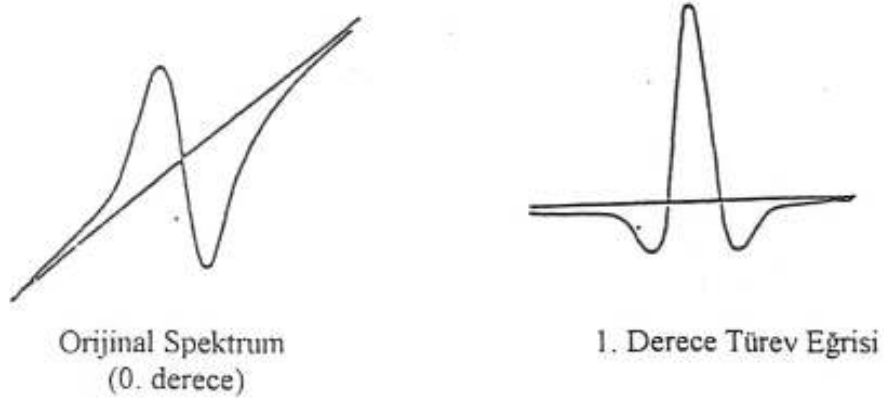
dir.

Eğer eşitliğin n. derece türevi alınırsa a_0 yok olur (a_0 'ın türevi sıfırdır) ve doğrusal terim $a_1\lambda$ sabit hale gelir. Eğer eşitliğin 1.derece türevi alınırsa:

$$\frac{dp}{d\lambda} = a_1 + 2a_2\lambda + 3a_3\lambda^2 + \dots + na_n\lambda^{n-1} \quad (2-31)$$

$$\frac{dp}{d\lambda} = a_1 \quad (2-32)$$

dir. Pratikte bunun anlamı, doğrusal zemin değerinin ($y = ax$) ekstrapolasyonudur (Şekil 2-12).



Şekil 2-12 Doğrusal geri zemin fonksiyonunun türevlendirme ile uzaklaştırılması

Esas fonksiyonun 2.derece türevi alınırsa;

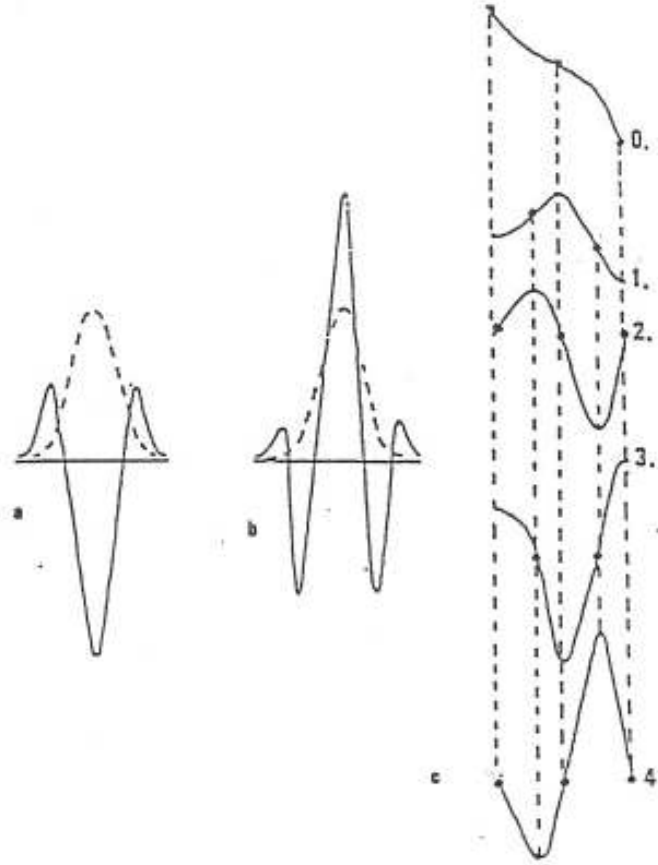
$$\frac{d^2 P}{d\lambda^2} = 2a_2 + ba_3\lambda + \dots + n(n-1)a_n\lambda^{n-2} \quad (2-33)$$

$$\frac{d^2 p}{d\lambda^2} = 2a_2 \quad (2-34)$$

$a_0 + a_1\lambda$ terimi kaybolur. Parabolik geri zemin fonksiyonunu $a_2\lambda^2$ ise bir sabite dönüştür.

Esas fonksiyonun yüksek dereceden türevleri alınarak, yüksek derecedeki geri zemin fonksiyonları bir sabite dönüştürülebilir. Bu sabit tüm türev spektrumuna rehberlik eder.

Türev spektrofotometrisinde ayırıcılık, keskin sinyallerle artırılır. Genellikle $2n$ ($n=1, 2, \dots$)'den büyük türev derecesi kullanıldığında uç değerler birbirleri ile karşılaşırlar (Şekil 2-13.a-b). Orijinal spektrumdaki omuzlar, türev alınarak daha keskin ve belirgin sinyaller haline dönüşürler (Şekil 2-13. c). Sonuçta geri zemin sinyallerinin yok edilmesi ve omuzların belirgin hale getirilip sinyallerin keskinleştirilmesi ile ayırıcılık artırılır.



Şekil 2-13 Maksimum türevlendirme ile sinyallerin keskinleştirilmesi ve ayırcılığın artması

- a- Orijinal spektrum (----) ve 2. derece türevi (—),
- b- Orijinal spektrum (----) ve 4. derece türevi (—),
- c- Omuzların türevlendirme ile keskinleştirilmesi. Orijinal spektrum ve 1.-4. derece türevleri.

Bir ortamda, ışının saçılması bir zemin absorbandsının nedenidir ki bu dalga boyuna bağlıdır. Spektrumun görünür bölümünde zemin yavaş değişir ve zemin sabit olmaya kapalıdır. Her zaman bir miktar gürültü vardır. UV kısmında zemin, dalga boyunun azalmasıyla artar.

1. Derece türev alınınca saçılma etkisi neredeyse tamamen uzaklaştırılmıştır. Geniş bir dalga boyu aralığı üzerinde sabit bir eğim ile bir zemin absorbandsı hat'a düşen üç nokta veya daha yüksek dereceden türevlerle elimine edilebilir.

Özellikle biyokimyasal analizlerde bu işlem saflık kriteri olarak iki dalga boyundaki absorpsiyon oranının oluşması açısından önemli olup tanıma ve saflaştırma testlerinde üstünlük sağlar.

Türev spektrofotometrisinde orijinal spektrumdan elde edilen bilgi genellikle değişmez fakat geri zemin sinyallerinin yok edilmesinden dolayı ayıricılık artar. Bu da maskelenmiş daha zayıf bantların belirlenmesi ile nitel ve nicel olarak analiz kolaylığı sağlar.

2.10.7. Türev Spektrumun Alınması ve Türev Spektrumlarına Etki Eden Faktörler

Türev spektrumlarının elde edilmesinde en fazla kullanılan yöntemler şunlardır:

a- Sinyalin elektronik veya sayısal olarak türevinin alınması veya elektronik takometrelerle işleme tabi tutulmasıyla;

b- Çift dalga boylu sinyal farkı taraması veya dalga boyu modülasyonu yapabilen özel optik sistemi olan spektrofotometrelerin kullanılması ile optik türev spektrumları elde edilebilir.

Çift dalga boylu spektrofotometre en çok kullanılan alettir ve türevlendirme optik olarak yapılır. Işın iki monokromatör arasına bölünür, şiddetleri ise foto çoğaltıcı ile ölçülür. Elektronik farklılaştırma ile türev alan ve istenilen dereceden türevi anında verebilen aletlerdir. Yöntemde N ve spektrumun uygulandığı $\Delta\lambda$ gibi iki değişken yer alır. Eğer dalga boyları arasındaki fark oldukça küçük ise (1-2 nm) dalga boyuna göre 1.derece türev elde edilir. Bu yöntem biyokimya, klinik, çevre ve ilaç analizlerinde sıvı örnekler için uygundur.

Dijital türevlendirmede spektrofotometrenin çıkış sinyali öncelikle dijital değiştiriciyi beslemelidir. Üretkenliği arttırmak için her bir dalga boyundaki sinyaller toplanır ve düzeltilir, daha sonra ortalama değer elde edilir. Bundan sonraki işlemlerde ise eğriler en küçük kareler yöntemi ile elde edilir. Ölçümdeki dalga boyu farkı genellikle 0.1-1.0 nm'dir.

Elektronik olarak türev almada, optik sistemde bir değişme yapılmaz. Yükselticilerin kullanımından kaçınılır, ölçüm işlemi üzerine geri besleme kolaydır. Filtreleme ve düzeltme işlemi söz konusudur. Daha yüksek derece

türevler daha basit olarak elde edilebilir ve bozulma riski oldukça azdır. Bu yöntemde tarama hızı ve türev zaman sabitine bağlı olarak sinyallerde kaymalar olmaktadır. Bu nedenle yöntem, otomatik olarak uygulanan yarıkların bulunduğu spektrofotometreler için uygun değildir.

Türev uygulaması gerçek bir optik-elektronik spektrum üzerinde yapılmalı ve oluşacak pik kayması ile şekil bozulmaları göz önüne alınmalıdır. Ordinat değerleri absorpsiyon değerleri ile değil absorpsiyon değişimleri ile orantılıdır.

Optik ve elektronik gürültü pikleri, gerçek piklere benzer ve spektrumun ayrıntılandırılması ile bağlı olarak büyür. Bu nedenle yanlış değerlendirmelere neden olabilir. Gürültü pikleri spektrum ortalamalarının alınması ile yok edilebilir.

Birinci derece türev eğrisi doğrudan olarak elde edilir, diğer türevler ise, bu veya orijinal spektrumdan elektronik olarak elde edilir. Bu nedenle ikinci derece ve daha yüksek türev derecelerinde absorbansın dalga boyuna karşı değil, zamana (t) karşı türevi alınır.

$$\frac{dA}{dt}, \frac{d^2 A}{dt^2}, \frac{d^3 A}{dt^3} \dots \quad (2-35)$$

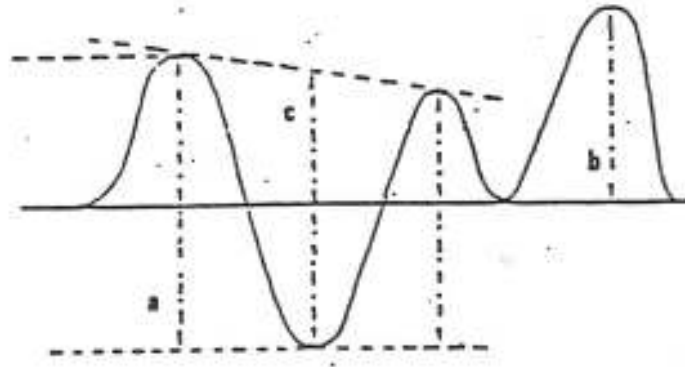
Bu nedenle spektrofotometrenin tarama hızına göre şiddeti değişen bir türev spektrumu elde edilir. Tarama hızlandıkça orijinal spektrumda eğrilerin keskinleşmesi ve eğimlerin artması söz konusudur. Uygulama amacına göre tarama hızı değiştirilebilir. Aynı cihaz programında ikinci türev derecesine göre daha detaylı bilgi ve daha iyi duyarlılık ile ayırım gücü sağlar. Buna karşılık sinyal-türev derecesi artışı ile gürültü oranı azalışı ve bant kayması oluşur. Genelde geniş tabanlı pikler için hızlı, dar tabanlı pikler için ise yavaş tarama hızı seçilmelidir.

1. Derece türevde, zaman sabitinin bir basamak artması sinyalin iki kat artmasına neden olurken, 2. derece türevde duyarlılık üstel olarak artar. Türev derecesi yanında dalga boyu tarama hızı ordinat sinyal büyüklüğünü etkilerse de bu etkinin oranı ve yönü konusunda genelleme yapmak zordur.

Yalnız 2. derece türevde zaman sabiti aynı tutulduğunda 1. derece türeve göre daha yüksek duyarlılık ve ayrıntılı bilgi elde edilir. Ayrıca optik yarık genişliğinin azalması da piklerin ayırıcılık ve şiddetini artırır.

2.10.8. Türev Spektrumlarının Değerlendirilmesi

Genel olarak absorbandsın türevi derişimle doğru orantılıdır. 1. ve 2. derece türev spektrumlarında ordinat değışimleri, orijinal spektrumun ordinat değeriinin büyüklüğü ile değil, eğim değışimi ile ilişkilidir. Bu nedenle türev eğrisinin apsisteki konumu ile dönüm noktalarının birbirine karşı durumları karakteristiktir. Türev spektrumlarının değerlendirilmesinde üç yöntem vardır (Şekil 2-14) (36).



Şekil 2-14 Türev spektrumlarının değerlendirilmesi

- a) Pikten pike ölçüm
- b) Pikten sıfıra ölçüm
- c) Teğet yöntemi ile ölçüm

a- Pikten Pike Ölçüm

Bir spektrumda ardarda gelen maksimum ve minimum noktalar alınarak, bu iki noktanın mutlak değer olarak farkı ölçülür. Birkaç nokta var ise, ordinat farkının en büyük olduğu bir bitişik çift seçilir (Şekil 2-14.a). Bu ölçüm genelde çok bileşenli nicel analizlerde kullanılır.

b- Pikten Sıfıra Ölçüm

Ölçümü yapılacak pikin maksimumu ya da minimumu ile sıfır arasındaki uzaklık ölçülür (Şekil 2-14.b). Özellikle apsise göre simetrik sinyaller içeren yüksek derece türevler için ve üst üste çakışan eğrilerden biri sıfırdan geçtiğinde kullanılır.

c- Teğet Yöntemi ile Ölçüm

Bir spektrumda ardarda gelen iki maksimum üzerinden geçirilen teğetin aşağıdaki minimuma izdüşüm uzaklığı veya iki minimumdan geçen teğetin aradaki maksimuma izdüşüm uzaklığı ölçülür (Şekil 2-14.c). Bu yöntem doğrusal geri zemine çok rahat uygulanabilir. Özellikle zemin absorpsiyonunun belirlenemediği bulanık örnekler için uygulanır. Bulanık örneklerde, bulanıklık arttıkça spektrum daha kısa dalga boyuna kayar. 1. ve 2. derece türevleri alınarak bu etki ortadan kaldırılabilir.

Türev spektrofotometrisi; ilaç (37), aynı spektral bölgede absorpsiyon yapan ilaç karışımları (38), etkin maddenin bozulma ürünü varlığında (39) ve etkin maddenin bozucu etki yapan matriks bileşenlerinin tayininde (40) rahatlıkla uygulanabilir.

2.11. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Bir karışımdaki iki veya daha fazla bileşenin, biri sabit diğeri hareketli iki faz arasındaki etkileşimlere dayanarak ayrılımlarına kromatografi denir.

Sıvı kromatografisi yöntemlerinde sabit fazın, dolgu maddesi üzerinde bir sıvı film tabakası gibi kaplandığı durumda yöntem sıvı-sıvı kromatografisi halini alır. Bu yöntemde bileşenler sabit ve hareketli sıvı fazlar arasındaki farklı dağılım eğilimlerinden dolayı birbirinden ayrılırlar. Birbiri ile karışmayan iki sıvı sabit ve hareketli faz olarak kullanılır. Sabit faz olarak polar sıvı ve

hareketli faz olarak apolar bir sıvı kullanıldığında normal faz sıvı-sıvı kromatografisi, apolar bir sıvı sabit faz ve polar bir sıvı hareketli faz olarak kullanıldığında ters faz sıvı-sıvı kromatografisi oluşur.

Sıvı kromatografisinde dolgu maddesinin tanecik çapının küçük ve kolon boyunun uzun olması kromatografik ayırıcılığı artırır. Küçük tanecikli (5-10 μm) ve küçük çaplı (1-3 mm) kolonlar kullanıldığında hareketli fazın basınç uygulayarak kolon içinde ilerletilmesi gerekir. Bu tür kolonlarda yüksek basınç altında (100-200 atm) gerçekleştirilen sıvı-sıvı kromatografisi yöntemine yüksek performanslı sıvı kromatografisi adı verilir. Bu yöntemde, çözücü yani hareketli faz sıvısı kolondan bir pompa ile geçirilir. Örnek, pompa ile kolon girişi arasında bir enjektör yardımıyla sisteme verilir. Kolondan çıkan madde sinyali kolon çıkışına yerleştirilen uygun bir dedektör ile ölçülür. En çok kullanılan sıvı kromatografisi dedektörleri, UV-görünür bölge, fotodiyot aralık, fluoresans, elektrokimyasal, refraktometri dedektörler ile kütle spektrometrisidir (28).

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi analitik ayırma teknikleri arasında en yaygın kullanılanıdır. Yöntemin bu kadar yaygın olmasının sebepleri, duyarlılığı, miktar tayinine kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen türlerin ayrılmasına uygun olması, sanayinin, birçok bilim dalının ve halkın birinci derecede ilgilendiği maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir. Üstünlükleri ise;

a- Kolon ayırıcılığı yüksektir.

b- İşlem kullanıcıya diğer yöntemlerde olduğundan daha az bağımlıdır ve bu nedenle tekrarlanabilirlik artmıştır.

c- Otomasyona ve nicel analize uygundur.

d- Analiz süresi genellikle diğer kromatografi yöntemlerinden daha kısadır.

e- Geniş aralıkta çalışma olanağı sağlayacak esnekliktedir.

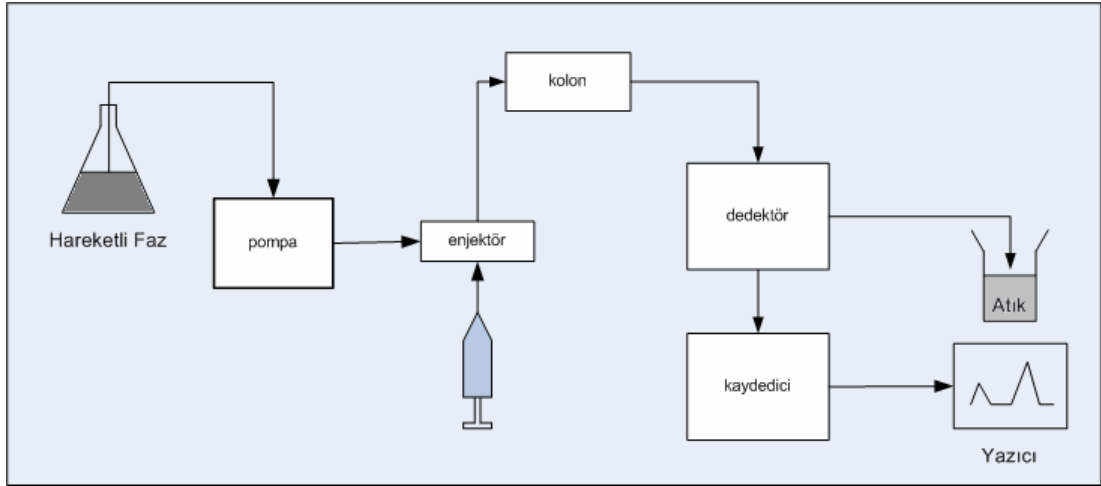
f- Düşük sıcaklıkta uygulanır.

g- Kromatografik etkileşme için yarışan iki faz bulunur, bunlar; sabit ve hareketli fazıdır.

h- Geniş aralıkta dedektör seçme olanağı vardır.

ı- Maddenin geri kazanılması kolaydır.

Bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi sisteminde bulunması gerekli kısımlar şunlardır (Şekil 2-15).



Şekil 2-15 HPLC cihazının şematik gösterimi

- a- Hareketli faz haznesi
- b- Bağlantı ekipmanlar ve hareketli faz uygulama sistemi
- c- Hareketli faz pompası
- d- Enjeksiyon bloğu
- e- Kolon
- f- Dedektör
- g- Kayıt cihazı

Karşılaştırma yöntemi olarak seçilen HPLC'de kullanılan elektrokimyasal dedektör duyarlılık, seçicilik, kullanışlılık ve yaygın kullanım alanı gibi birçok yönden üstünlükler sunmaktadır. 10^{-11} g mL⁻¹ değerindeki gözlenebilme sınırına erişebilen bir sıvı kromatografi dedektörüdür. Bu dedektörün kullanılabilmesi için analitin yükseltgenme-indirgenme tepkimesi verebilmesi gerekir. Elektroaktif olmayan maddelerin analizi mümkün değildir.

Elektrokimyasal dedektörler, amperometri, polarografi, kulometri ve kondüktometri ilkelerine göre çalışan oldukça duyarlı ve seçici dedektörlerdir. Çok düşük düzeydeki maddelerin saptanmasına dahi olanak sağlayabilirler. Kullanımları optik dedektörler kadar kolay değildir.

Genellikle yükseltgenme tepkimesi üzerinden tayin yapılır. Elüe edilen maddeler camısı-karbon çalışma elektrodu içeren dedektör ile karbon/polimer elektrotta, sabit potansiyel altında yükseltgenmeye maruz bırakılır. Referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrot kullanılır. Elektrot akımı örnek derişimi ile doğru orantılıdır. Akım voltaj çıkışı olarak dönüştürölür ve zamanın fonksiyonu olarak gözlemlenir. Hareketli fazın iletken olması gerekir ve genel olarak pg düzeyinde tayin yapılabilir (28).

Elektrokimyasal dedektör ile yükseltgenme yapılarak; hidrokarbonlar, azinler, amidler, fenoller, aromatik hidrosiller ve kinolinler, indirgenme yapılarak; olefinler, esterler, ketonlar, aldehytler, konjüge esterler, eterler, diazo bileşikler, nitro bileşikler ve halojenlerin tayini yapılabilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Gereçler

3.1.1. Cihazlar

UV-DAD Spektrofotometresi	: Agilent 8453
UV yazıcı	: Hewlett Packard Deskjet 840 C
UV-GB spektrofotometresi	: Spektro UV-VIS Double Beam PC
Hassas terazi	: Mettler Toledo AG 285
Vorteks karıştırıcı	: Nüve NM 110
Otomatik mikropipet	: Biohit (10-100 µL ve 100-1000 µL)
Su saflaştırıcı	: Milli-Q Water purification system
Ultrasonik banyo	: Bandalin Sonorex RK 514 BH
pH metre	: Mettler Toledo MA 235
Erime noktası tayin cihazı	: Thomas Hoover Capillary Helting Point
Santrifüj	: EBA 20 Hettich Zentrifugen
HPLC Cihazı	: Shimadzu SCL-10AVP
Elektrokimyasal dedektör	: Decade
Membran filtre	: Titan 0.45µm

3.1.2. Kimyasal Maddeler

Kabergolin	: Pharmacia Sağlık Ürünleri San ve Tic. Ltd. Şti.
Etanol	: Damıtılmış, % 99.5, Tekel
Kloroform	: Analitik saflıkta, Merck
Hidroklorik asit	: Analitik saflıkta, Merck
Metanol	: Analitik saflıkta, Merck
Fosforik asit	: Analitik saflıkta, Merck
Asetonitril	: Analitik saflıkta, Merck

3.1.3. Cam Malzemeler ve Diğer Sarf Malzemeleri

Havan	: Cam
Balon joje	: 5-1000 mL, Pyrex®
Spatül	: Metal

Tartım kabı	: Cam
Cam pipet	: 1-10 mL, Pyrex®
Huni	: Çeşitli çaplarda, Pyrex®
Santrifüj tüpü	: Cam

3.1.4. Farmasötik Preparatlar

Geliştirilen analiz yöntemleri, aşağıda belirtilen farmasötik preparatlara uygulanmıştır:

Dostinex® tablet (0.5 mg Kabergolin, Pharmacia Sağlık Ürünleri San ve Tic. Ltd. Şti, Pfizer İlaç Fabrikası A.Ş.)

Cabaser® tablet (1, 2 ve 4 mg Kabergolin, Pharmacia Sağlık Ürünleri San ve Tic. Ltd. Şti, Pfizer İlaç Fabrikası A.Ş.)

3.2. Deney İçin Gerekli Hazırlıklar

3.2.1. Etkin Maddenin Saflığı

Kabergolin üretici firma Pharmacia tarafından analiz sertifikası ile birlikte sağlanmıştır (Analiz Sertifika Numarası: 1008816, Analiz Tarihi: 22.12.2004). Ayrıca, etkin maddenin saflığının kontrol edilmesi amacıyla erime noktası tayini de yapılmıştır.

3.2.2. Çözeltilerin Hazırlanması

Kabergolin stok ve standart çözeltilerinin hazırlanması: 10.0 mg Kabergolin analitik tartım kabının içinde hassas olarak tartılıp 10 mL balon jojeye aktarılır. Balon jojeye 5 mL metanol eklenip ultrasonik banyoda tamamen çözünmesi sağlandıktan sonra metanol ile 10 mL'ye tamamlanır. Sonuç olarak, Kabergolin'in $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ derişimindeki stok çözeltisi hazırlanmış olur. Stok çözelti, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanır ve kullanılacağı zaman laboratuvar sıcaklığına ulaşması beklenir. Standart Kabergolin çözeltileri, bu stok çözeltiden istenilen derişime su ile seyreltilerek günlük hazırlanmıştır. Çözücü seçimi için yapılan etanol, metanol, kloroform, 0.1N HCl ve 0.1N NaOH kullanımında ise stok çözeltiden alınan miktarlar bu çözücülerle tamamlanarak hazırlanmıştır.

Sodyum hidroksit çözeltisi (1.0 F): 40.0 g NaOH tartılarak 1 L'lik balon

jojede su ile çözölüp 1 L'ye tamamlanır. 0.1 N sodyum hidroksit çözeltisi bu çözeltiden seyreltilerek hazırlanmıştır.

Hidroklorik asit çözeltisi (0.1 F): Balon joje içersine bir miktar su konulduktan sonra üzerine 8.44 mL derişik (% 37.5'lik) HCl çözeltisi eklenmiş ve su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.

Asetonitril/fosfat tamponu: 500 mL hazırlamak için 4.08 g KH_2PO_4 tartılmış, su ile çözölmüş, üzerine 100 mL asetonitril eklenerek hacmi su ile tamamlanmış ve fosforik asitle son pH 3'e ayarlanmıştır.

3.2.3. Farmasötik Preparatların Analize Hazırlanması

Tabletler tartılarak havanda toz haline getirilir. Bir tablete eşdeğer ağırlıkta tablet tozu tartılarak 25 mL'lik balon jojeye alınır. 20 mL metanol eklenerek iyice karıştırılır ve ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilir. Metanol ile hacim 25 mL'ye tamamlanır. Bu çözeltiden bir miktarı santrifüj tüpüne alınarak santrifüj edildikten sonra, berrak çözeltiden otomatik pipetle istenilen miktarda çözelti alınarak analiz edilir ve bu işlem her bir tablet dozaj formu için tekrarlanır.

3.2.4. Sentetik Preparatların Hazırlanması

Sentetik tablet, etkin ve yardımcı maddeler eklenerek hazırlanmış ve tablet içeriği kaynaklardan bulunmuştur (21). Sentetik tabletler; 0.5 mg Kabergolin, 3.94 mg lösin ve 51.22 mg laktoz veya 1 mg Kabergolin, 8.07 mg lösin ve 104.91 mg laktoz veya 4 mg Kabergolin, 15.88 mg lösin ve 206.50 mg laktoz içerecek biçimde hazırlanmıştır.

Plasebo, Kabergolin konulmadan, yardımcı maddeler yukarıda belirtilen miktarlarda karıştırılarak hazırlanmıştır.

3.2.5. Cam Malzemelerin Temizliğı

Kullanılan cam malzemeler, sıcak çeşme suyu ve deterjanlı su ile fırçalanarak yıkandıktan sonra, çeşme suyu ile durulanmıştır. Ardından 2 F nitrik asit çözeltisi içine konulup en az bir gece bekletilmiştir. Asitte bekletildikten sonra damıtık su ile 3 kez yıkanarak oda sıcaklığında kurutulmuştur.

3.2.6. Spektrofotometre Küvetlerinin Temizlenmesi

Küvetler damıtık su, metanol ve damıtık su ile yıkanarak temizlenmiştir.

3.2.7. HPLC Kolonunun Temizlenmesi

HPLC sisteminde kullanılan kolondan çalışma öncesi 30 dakika HPLC saflıkta su geçirildikten sonra sistemden hareketli faz geçirilmiştir. Çalışma sonrasında ise kolondan 30 dakika HPLC saflıkta su ve 30 dakika metanol geçirilmiştir. Bu aşamalarda akış hızları 1 mL dak⁻¹'dir.

3.2.8. Ortam Şartlarının ve Türev Derecesinin Seçimi

Kabergolin'in sulu ortamda, 0.1 F hidroklorik asit, 0.1 F sodyum hidroksit, etanol, metanol ve kloroform içindeki çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltilerin UV-GB spektrumları ve 1., 2., 3. ve 4. derece türev spektrumları 200-400 nm arasında kaydedilmiştir.

3.3. Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi

3.3.1. UV-GB Spektrofotometrisi

3.3.1.1. Kalibrasyon Eğrisi Yöntemi

Kabergolin'in 1-125 µg mL⁻¹ derişimleri arasındaki çözeltileri sulu ortamda hazırlanıp suya karşı spektrumları alınmış, 280 nm'de ölçülen absorbans değerleri Kabergolin derişimlerine karşı grafiğe geçirilmiştir.

3.3.1.2. Standart Ekleme Yöntemi

Sentetik tablet numunesi çözeltisi (1 mL) 5 ayrı 5 mL'lik balon jöjeye konulmuş, birinci balon jöje su ile hacmine tamamlanmıştır. Diğerlerine, sırasıyla 10, 20, 30, 40 µg mL⁻¹ şeklinde artan derişimlerde Kabergolin standart çözeltisinden eklenerek su ile tamamlanmıştır. Her bir çözelti için 280 nm'de okunan absorbans değerleri eklenen Kabergolin derişimlerine karşı grafiğe geçirilmiş ve elde edilen doğrunun x eksenini kestiği noktadan Kabergolin derişimi bulunmuştur.

3.3.2. 2. Dereceden Türev Spektrofotometrisi

3.3.2.1. Kalibrasyon Eğrisi Yöntemi

Türev spektrofotometrisinde ise Kabergolin'in sulu ortamda 1-125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ arasındaki çözeltileri hazırlanıp suya karşı 2. derece türev spektrumu alınmış, pikten pike (227-232 nm) ve pikten sıfıra (232 nm) ölçüm ile değerlendirilerek bulunan $d^2A/d\lambda^2$ değerleri Kabergolin derişimlerine karşı grafiğe geçirilmiştir.

3.3.2.2. Standart Ekleme Yöntemi

Türev spektrofotometrisinde ise 5 ayrı 5 mL'lik balonjojeye 1 mL sentetik tablet numune çözeltisi konulmuş, birinci balon joje su ile tamamlanmıştır. Diğerlerine sırasıyla 10, 20, 30, 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ şeklinde artan derişimlerde Kabergolin standart çözeltisinden eklenerek 5 mL'ye su ile tamamlanmıştır. Pikten pike (227-232 nm) ve pikten sıfıra (232 nm) ölçüm ile değerlendirilerek bulunan $d^2A/d\lambda^2$ değerleri eklenen Kabergolin derişimlerine karşı grafiğe geçirilmiş ve elde edilen doğrunun x eksenini kestiği noktadan derişim bulunmuştur.

3.4. Analitik Yöntem Validasyonu

Geliştirilen yöntemler geçerliliklerinin kanıtlanması için analit çözeltilerinin kararlılığı, özgünlük, doğrusalılık, doğruluk ve kesinlik, duyarlılık, geri kazanım, tekrarlanabilirlik, sağlamlık ve tutarlılık gibi analitik validasyon parametreleri test edilmiş (41) ve elde edilen sonuçlar gerektiğinde istatistiksel (42) yöntemlerle değerlendirilerek kabul kriterlerine uygunlukları araştırılmıştır (43-49).

3.4.1. Analit Çözeltilerinin Kararlılığı

Analit çözeltilerinin, tanımlanan koşullarda ve tanımlanan zaman aralıklarında elde edilen cevabı ile taze hazırlanmış çözeltisinin cevabı arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamsız olması analitin kararlılığını tanımlar.

Kararlılık testinin amacı; analit veya analitlerle ilgili olarak örnek toplama süresince, analiz işlemleri süresince, depolama esnasında, örnek hazırlanması ve analit analizi esnasında oluşabilecek herhangi bir

bozunmanın saptanmasıdır. Bütün bu işlemler analitik yöntemin validasyonu sırasında yapılır (41).

Kabergolin'in sulu ortamdaki kararlılığının incelenmesinde $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ derişimindeki çözeltileri kullanılmıştır. Kabergolin standart çözeltisi için belirli sürelerde (3, 6, 12 ve 24 saat) karanlıkta ve aydınlıkta (gün ışığı) bekletilmesi sonrasında Kabergolin cevabındaki değışiklikler izlenmiştir. Karanlıkta ve ışııkta bekletme işlemi oda sıcaklığında ($22-25^{\circ}\text{C}$) yapılmıştır. Uzun dönem kararlılık testi için 2 ay boyunca $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan Kabergolin çözeltileri kullanılmış ve bu çözeltilerin absorbens değeri her analiz gününde ölçülmüştür.

Kararlılık testinde sınanan bütün koşullarda elde edilen Kabergolin absorbens değeri, aynı derişimde ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) taze hazırlanmış Kabergolin çözeltilerinin absorbens değeri ile karşılaştırılmış ve Kabergolin çözeltisinin kararlılık koşulları belirlenmiştir. İstatistiksel değlendirmeler için Friedman iki yönlü varyans analizi kullanılmıştır.

3.4.2. Özgünlük

Yöntemin özgünlüğünün belirlenmesinde, etkin madde Kabergolin (0.5mg) ile Bölüm 3.2.4. 'de anlatıldığı gibi hazırlanan plasebo içeren sentetik preparatların geliştirilen yöntemlerle analizleri yapılmış, elde edilen orijinal ve 2. derece türev spektrumları karşılaştırılarak matriks girişiminin olup olmadığı değlendirilmiştir.

Ayrıca yöntemin özgünlüğünü göstermek amacıyla sentetik ve farmasötik preparatlar standart ekleme yöntemi uygulanarak da analiz edilmiştir.

3.4.3. Aralık ve Kalibrasyon Aralığı

1, 2, 5, 10, 20, 25, 50, 75, 100 ve $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ Kabergolin içeren çözeltiler; Kabergolin'in stok çözeltisinden ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) gerekli miktarlar 5mL'lik balon jöjeye aktarılıp su ile hacmine tamamlanarak hazırlanmıştır. Doğrusallık ve aralığın saptanması için artan derişimlerdeki standart çözeltilerin UV-GB spektrofotometrisinde 280 nm'deki absorbens değeri derişime karşı işaretlenerek, 2. dereceden türev spektrofotometrisinde ise

227-232 nm aralığında pikten pike ölçüm ile saptanan $d^2A/d\lambda^2$ değerleri Kabergolin derişimlerine karşı grafiklenerek her yönteme ait kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrisine ait regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı hesaplanmıştır. Kalibrasyon eğrisinin doğrusallıktan ayrılış ve korelasyon katsayısı önem kontrolüne ait istatistiksel değerlendirmeler yapılmıştır (Bkz. EK 2).

3.4.4. Doğruluk ve Kesinlik

Gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik çalışmaları 10, 50 ve 100 µg mL⁻¹ olmak üzere 3 farklı Kabergolin derişimindeki çözeltilerde yapılmış ve doğruluk değerleri % bağıl hata, kesinlik değerleri bağıl standart sapma ile verilmiştir (Bkz. EK 1). Gün içi çalışmalarda, doğrusallık aralığına giren 3 farklı derişim seviyesinde bağımsız çözeltiler hazırlanmış (n=7) ve bu çözeltiler aynı gün içinde analiz edilmiştir. Günler arası çalışmalarda ise 7 farklı günde ve 3 farklı derişim seviyesinde hazırlanan bağımsız çözeltilerin analizleri yapılmıştır.

3.4.5. Duyarlılık

Yöntemin gözlenebilme sınırının hesaplanması için aşağıda verilen formül kullanılmıştır (41).

$$LOD = 3.3 \left(\frac{SS}{S} \right) \quad (3-1)$$

Bu eşitlikte, SS, oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin y-kestiriminin standart sapması, S ise oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin eğimlerinin ortalamasıdır.

Tayin alt sınırının hesaplanması için aşağıdaki verilen formül kullanılmıştır (41).

$$LOQ = 10 \left(\frac{SS}{S} \right) \quad (3-2)$$

3.4.6. Geri Kazanım

Plasebo üzerine belli miktarlarda etkin madde eklenerek Bölüm 3.2.4. 'de anlatıldığı gibi hazırlanan sentetik numune çözeltilerinin (n=7) analizleri UV-GB spektrofotometrisi ve 2.dereceden türev spektrofotometrisi ile yapılmıştır ve geri kazanım değerleri hesaplanmıştır (Bkz. EK 1).

3.4.7. Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik çalışması için geliştirilen yöntemlerde doğrusallık aralığına giren bir derişim seviyesinde (UV-GB spektrofotometrisi ve 2.dereceden türev spektrofotometrisi için $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ eklenen) on beş ayrı çözelti hazırlanmış ve bunların aynı gün içinde tekrarlı analizleri yapılmıştır. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Kabergolin'in UV-GB spektrofotometrisi ve 2.dereceden türev spektrofotometrisi ile analizinde cihaz tekrarlanabilirliği, $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ Kabergolin içeren çözeltinin 6 ayrı kez spektrumlarının alınmasıyla elde edilen A ve $d^2A/d\lambda^2$ değerlerinin değışkenliği hesaplanarak bulunmuştur.

3.4.8. Sağlamlık ve Tutarlılık

Yöntemlerin sağlamlığının testi için, yöntem parametrelerdeki küçük değışimlerin sonucu ne kadar etkilediğı belirlenen optimum deney koşullarında küçük değışiklikler yapılarak analiz sonuçlarına etkisi incelenmiştir. Her seferinde bir parametrede değışiklik yapılarak doğrusallık aralığına giren bir derişimde miktar tayini yapılmış ve bulgular optimum koşullardaki sonuçlarla karşılaştırılmıştır.

Tutarlılık çalışmalarında ise farklı cihaz ve farklı analizci ile tablet çözeltilerinin analizleri yapılmıştır. Bunun için geliştirilen yöntemlerle doğrusallık aralığına giren bir derişim seviyesinde (0.5 mg Kabergolin içeren tablet formülasyonu için) hazırlanan 6 ayrı çözeltinin aynı gün içinde analizleri yapılmıştır. Farklı cihaz ve farklı analizci tarafından elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilerek aralarında fark olup olmadığı araştırılmıştır.

3.5. Farmasötik Preparatlara Uygulama

Geliştirilen UV-GB spektrofotometrisi ve 2.dereceden türev spektrofotometrisi yöntemleri Türkiye piyasasında bulunan Kabergolin içeren Dostinex® 0.5 mg, Cabaser® 1 mg, 2 mg ve 4 mg tablet formlarına uygulanmıştır.

3.5.1. Kalibrasyon Eğrisi Yöntemi ile Analiz

Yukarıda verilen tablet farklı dozaj şekilleri; analize hazırlanıp (Bölüm 3.2.3.), Bölüm 3.3.1. ve 3.3.2. 'deki belirtilen yöntemler uygulanarak analiz edilmiştir. Tabletlerdeki Kabergolin miktarı UV-GB spektrofotometrisinde absorbans değerleri ve 2.dereceden türev spektrofotometrisinde ise $d^2A/d\lambda^2$ değerleri kullanılarak hesaplanmıştır.

3.5.2. Standart Ekleme Yöntemi ile Analiz

Kabergolin'in farklı tablet dozaj şekilleri; analize hazırlanıp (Bölüm 3.2.3.), Bölüm 3.3.1. ve 3.3.2. 'de açıklanan yöntemler uygulanarak analiz edilmiştir.

Geliştirilen UV-GB spektrofotometrisi ve 2.dereceden türev spektrofotometrisi ile karşılaştırma yönteminin (HPLC-ECD) farmasötik preparatlara uygulanması sonucu elde edilen değerler istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve fark olup olmadığı tespit edilmiştir (Bkz. EK 1). Ayrıca geliştirilen yöntemlerin farmasötik preparatlara uygulanması sonucu elde edilen değerlerin birbirleri ile de istatistiksel olarak karşılaştırması yapılmış fark olup olmadığı tespit edilmiştir (Bkz. EK 2).

3.5.3. Karşılaştırma Yöntemi (HPLC-ECD) ile Analiz

Karşılaştırma yöntemi olarak, kaynaklarda bildirilmiş olan HPLC-ECD yöntemi kullanılmıştır (3). Kabergolin'in plazma ve idrardan elektrokimyasal dedektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC-ECD) ile analizi üzerine çalışmışlardır. Çalışmamızda, Kabergolin'in farmasötik preparattan analizi kaynakta belirtilen hareketli faz bileşimi, pH'sı ve akış hızı değiştirilmeden ancak Nucleosil C₁₈ (250 mm x 4 mm i.ç., tanecik büyüklüğü 5 µm) yerine Inertsil C₁₈ (250 mm x 4.6 mm i.ç., tanecik büyüklüğü 5 µm) kolon kullanılarak uygulanmıştır. Bu nedenle, kısmi validasyon çalışması

(doğrusallık, doğruluk, kesinlik, geri kazanım) yapılarak kaynaklarda bildirilen yöntemin laboratuvar koşullarımızda uygulanabilirliği sınanmıştır.

Kabergolin, HPLC sisteminde Inertsil C₁₈ (250 mm x 4.6 mm i. ç., tanecik büyüklüğü 5 µm) çelik kolon ve 75 mM asetonitril/fosfat tamponu (20:80, h/h, pH=3) oluşan hareketli faz kullanılarak tayin edilmiştir. Hareketli faz akış hızı 0.6 mL dak⁻¹ olup kolon oda sıcaklığındadır (22±2°C). Enjeksiyon hacmi 20 µL'dir. Hareketli faz vakum altında 0.22 µm filtreden geçirilmiş ve çözünmüş gazlar sonikatörde 30 dak bekletilerek uzaklaştırılmıştır.

4. BULGULAR

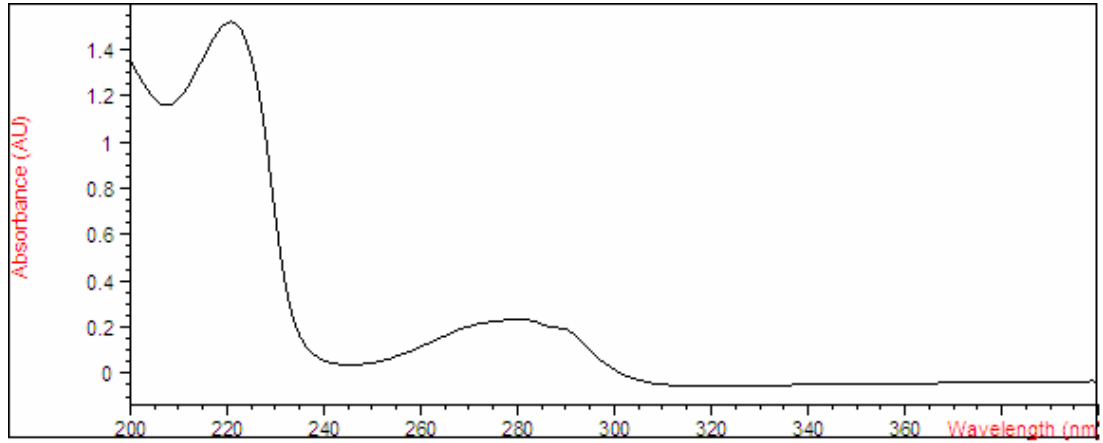
4.1. Etkin Madde Saflık Kontrolü

4.1.1. Erime Noktası

Analiz sonucunda Kabergolin'in erime noktasının 102°C olduğu gözlenmiştir.

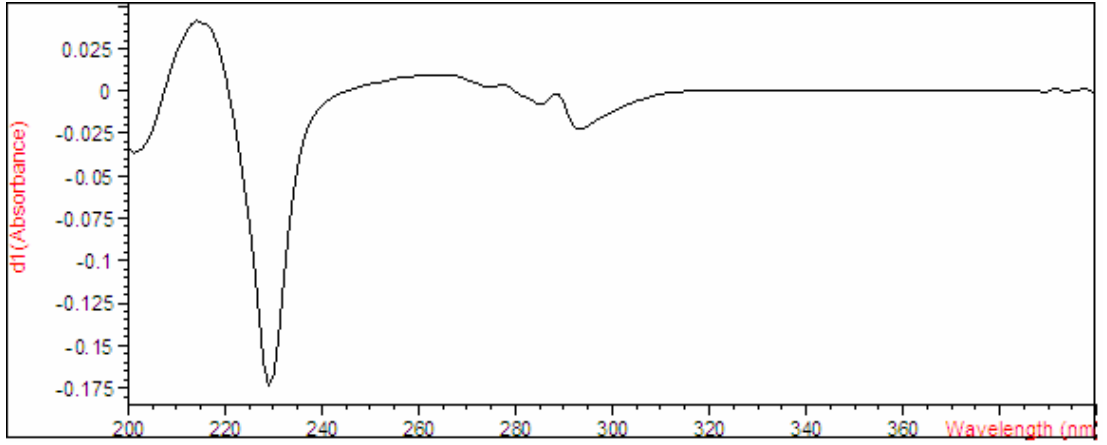
4.2. Spektrofotometrik Yöntem Bulguları

Kabergolin için çözücü seçiminde Kabergolin'in sulu ortam ve etanol, metanol, kloroform, 0.1 N HCl, 0.1 N NaOH'deki 20 µg mL⁻¹'lik çözeltilerinin spektrumları alınmış ve sulu ortamın en uygun olduğu belirlenmiştir. Kabergolin'in sulu ortamdaki 20 µg mL⁻¹'lik çözeltisinin 200 ile 400 nm dalga boyu arasındaki UV-GB spektrumunda 219 ve 280 nm dalga boylarında iki maksimumu olduğu saptanmıştır (Şekil 4-1).

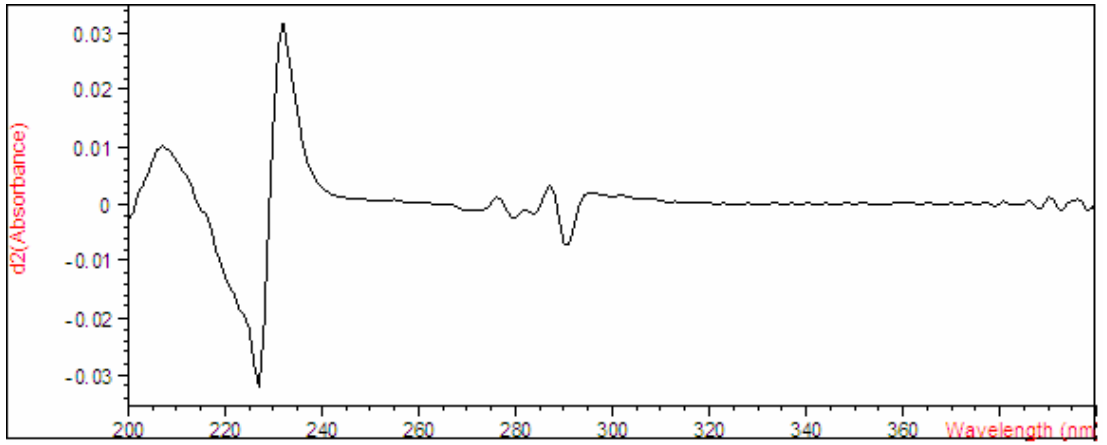


Şekil 4-1 Kabergolin'in UV-GB spektrumu

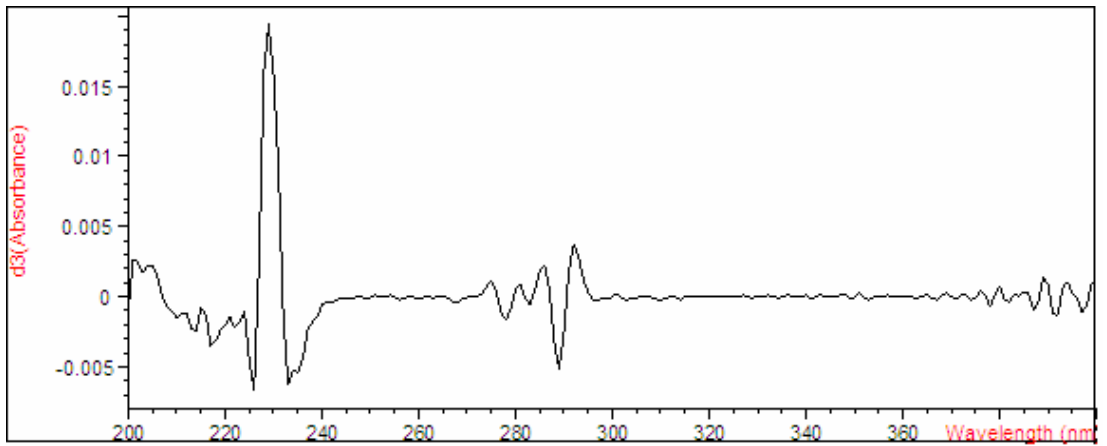
Kabergolin'in sulu ortamdaki 20 µg mL⁻¹'lik çözeltisinin 1, 2, 3, 4. derece türev spektrumları sırasıyla Şekil 4-2, Şekil 4-3, Şekil 4-4 ve Şekil 4-5'de verilmiştir.



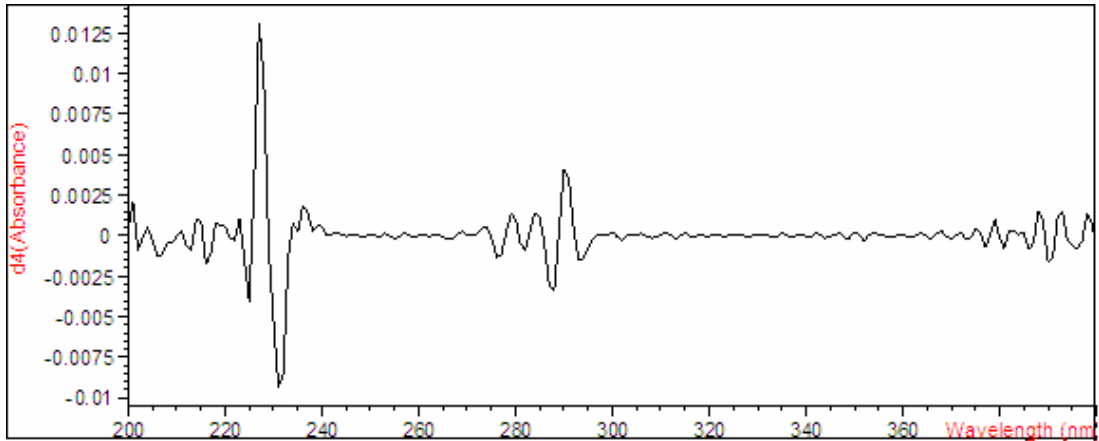
Şekil 4-2 Kabergolin'in 1.dereceden türev spektrumu



Şekil 4-3 Kabergolin'in 2.dereceden türev spektrumu



Şekil 4-4 Kabergolin'in 3.dereceden türev spektrumu



Şekil 4-5 Kabergolin'in 4.dereceden türev spektrumu

4.3. Spektrofotometrik Yöntemlerin Validasyonu

4.3.1. Analit Çözeltilerinin Kararlılığı

Kabergolin'in çözelti kararlılığının belirlenmesi için Bölüm 3.4.1. 'de verilen koşullarda bekletilen Kabergolin çözeltilerinin UV spektrumları ve 280 nm'deki absorbans değerleri aynı derişimdeki taze çözelti ile karşılaştırılmıştır. Kabergolin sulu ortamdaki çözeltisinin ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) oda sıcaklığında; aydınlıkta, karanlıkta ve $+4^\circ\text{C}$ 'da farklı zaman dilimlerine ait kararlılık bulguları Tablo 4-1'de verilmiştir (Friedman testi, $p>0.05$).

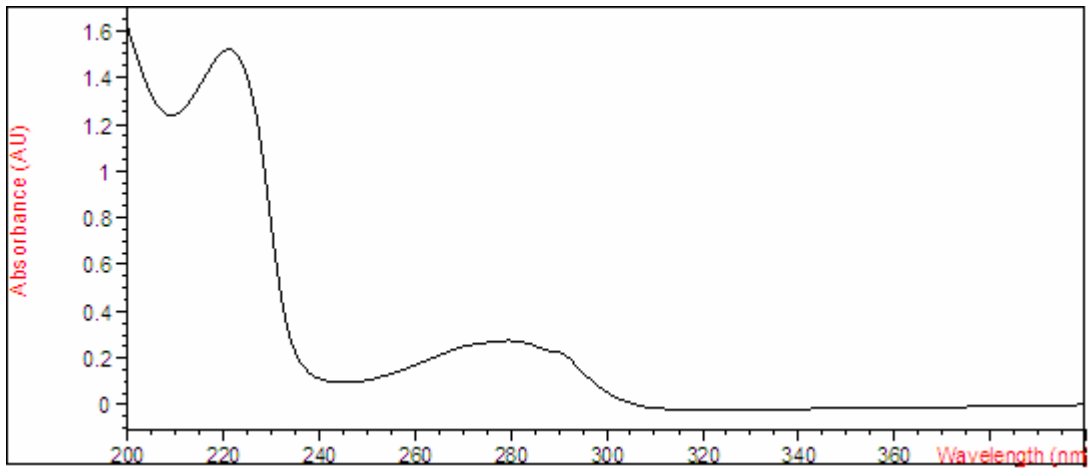
Tablo 4-1 Kabergolin'in kararlılık testi bulguları

Zaman (saat)	Aydınlık	Karanlık	Depolama
	% Kalan	% Kalan	$+4^\circ\text{C}$
0	100.00	100.00	1. Ayda
3	99.56	99.89	99.85
6	97.21	99.72	
12	95.31	99.67	2.Ayda
24	90.27	99.58	99.78

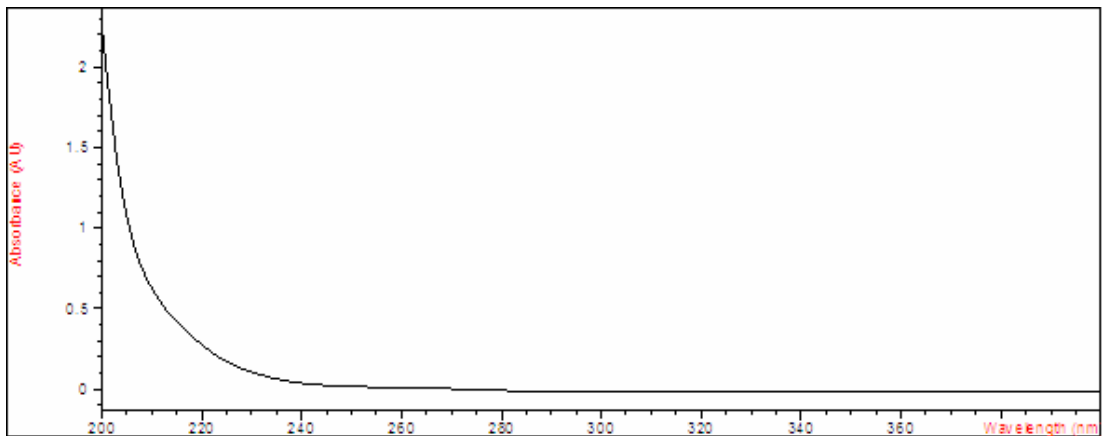
Sonuçlar Friedman iki yönlü varyans analizine göre test edilmiştir. Bkz. EK 2

4.3.2. Özgünlük

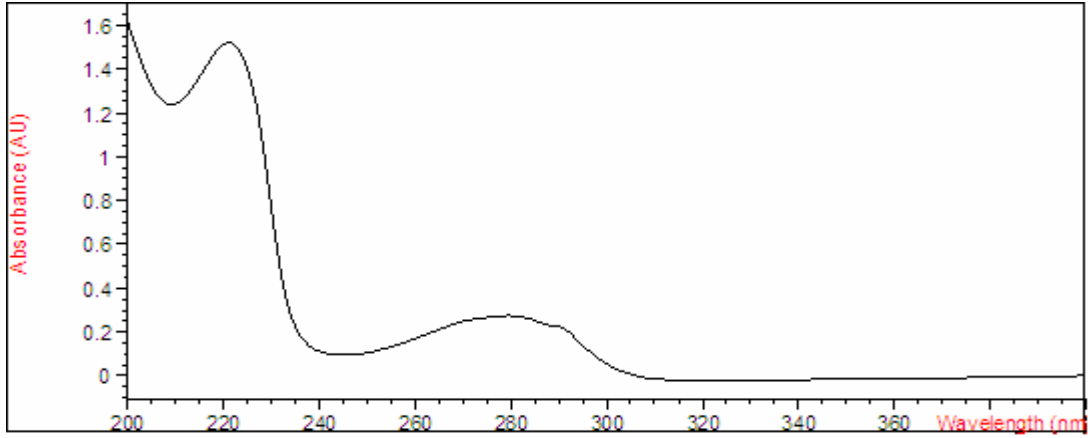
Özgünlük, yöntemin analizi yapılan maddeyi diğer maddelerin varlığından etkilenmeden tayin edebilme yeteneğidir. UV-GB spektrofotometrisi ile elde edilen Kabergolin standardı, plasebo, 0.5 mg Kabergolin eklenmiş plasebo (sentetik numune) ve tablet örneklerine ait spektrumlar kayıt edilmiş ve karşılaştırılmıştır (Şekil 4-6, Şekil 4-7, Şekil 4-8 ve Şekil 4-9).



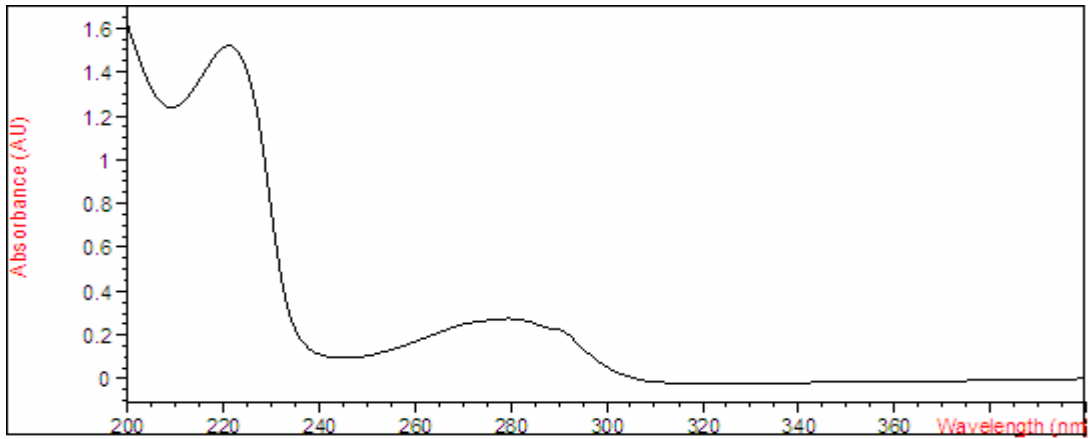
Şekil 4-6 Kabergolin standardının ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) UV-GB spektrumu



Şekil 4-7 Plasebo örneğinin UV-GB spektrumu

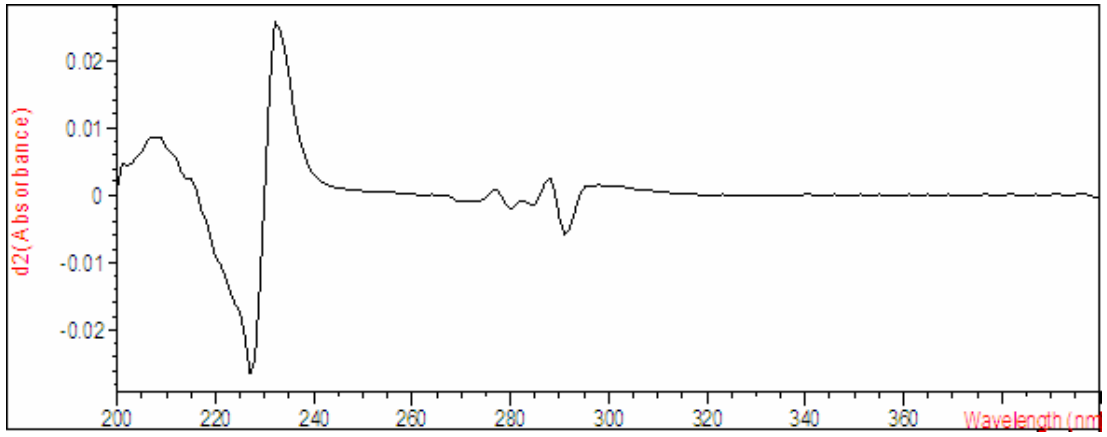


Şekil 4-8 Plasebo+0.5 mg Kabergolin içeren örneğinin UV-GB spektrumu

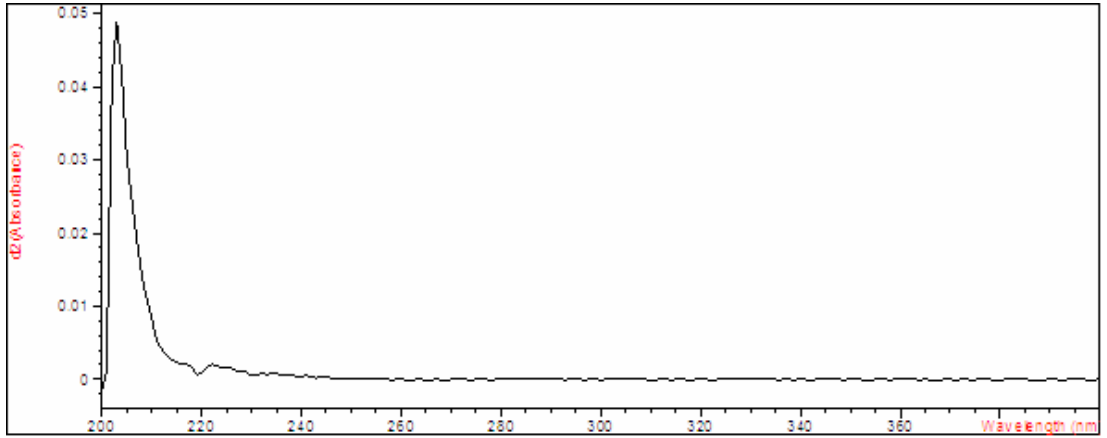


Şekil 4-9 Kabergolin içeren (0.5 mg) tablet örneğinin UV-GB spektrumu

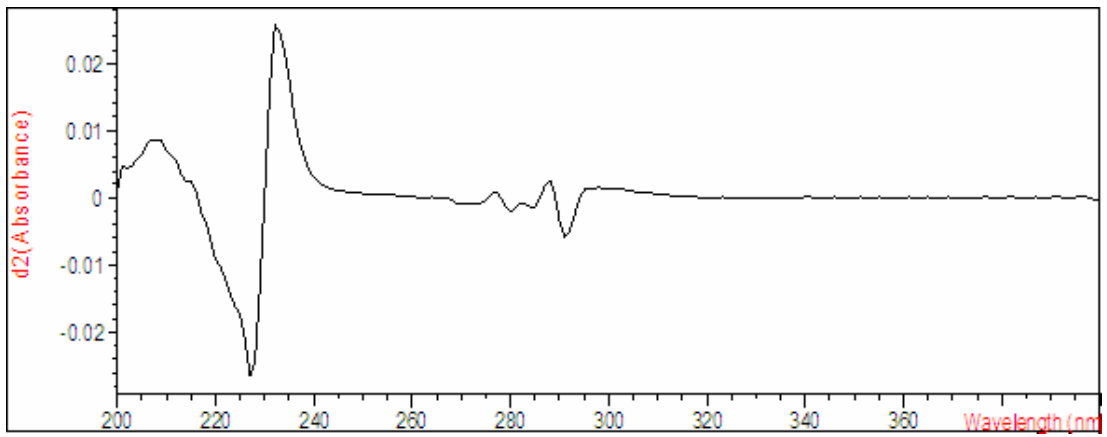
Kabergolin standardı, plasebo, 0.5 mg Kabergolin eklenmiş plasebo (sentetik numune) ve tablet için 2. dereceden türev spektrofotometrisi ile elde edilen spektrumlar karşılaştırılmıştır (Şekil 4-10, Şekil 4-11, Şekil 4-12 ve Şekil 4-13).



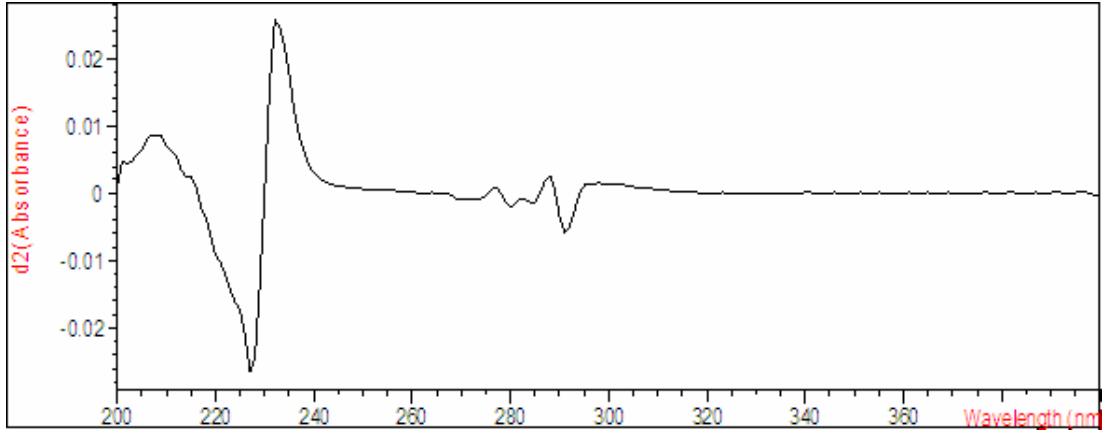
Şekil 4-10 Kabergolin standardının ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) 2.dereceden türev spektrumu



Şekil 4-11 Plasebo örneğinin 2.dereceden türev spektrumu



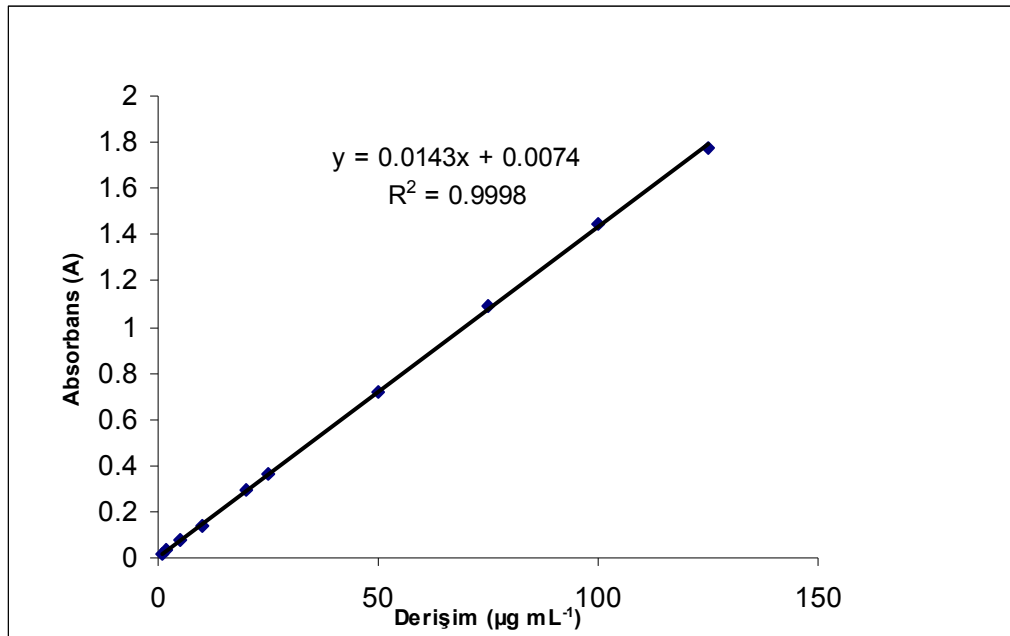
Şekil 4-12 Plasebo+0.5 mg Kabergolin içeren örneğinin 2.dereceden türev spektrumu



Şekil 4-13 Kabergolin içeren (0.5 mg) tablet örneğinin 2.dereceden türev spektrumu

4.3.3. Kalibrasyon Eğrileri ve Doğrusallık Aralıkları

UV-GB spektrofotometrisi kalibrasyon eğrileri, orijinal spektrumdan 280 nm’de elde edilen absorbans değerlerinin Kabergolin derişimine karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilmiştir (Şekil 4-14).



Şekil 4-14 Kabergolin’in UV-GB spektrofotometrisi kalibrasyon eğrisi

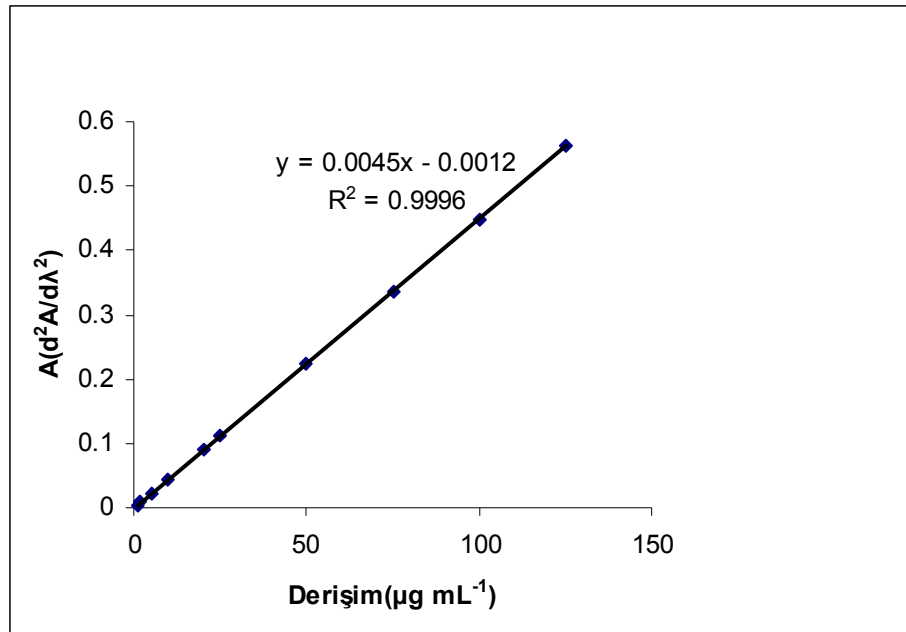
Bu eğrinin doğrusallıktan ayrılış ve korelasyon katsayısının önem kontrolüne ait istatistiksel değerlendirme sonuçları Tablo 4-2’de verilmiştir.

Tablo 4-2 Kabergolin’in UV-GB spektrofotometrisi ile analizinden elde edilen kalibrasyon eğrisinin doğrusallıktan ayrılış ve korelasyon katsayısının önem kontrolü

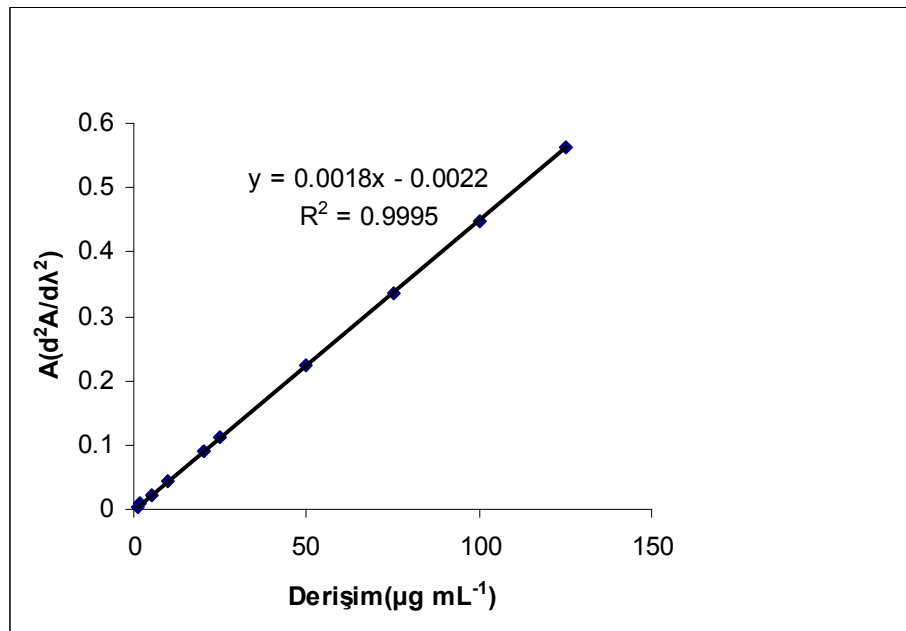
Korelasyon Katsayısının Önem Kontrolü						
N	R	S_r	t_H	t_T		
22	0.9998	4.47×10^{-3}	223.573	2.08		
Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü						
RKT	YOAKT	RAKT	RAKO	RKO	F_H	F_T
5.5696	5.5705	9×10^{-4}	4.5×10^{-5}	5.5696	123768.9	4.35

İstatistiksel terimler ve hesaplamalar için Bkz. EK 2

2.Dereceden türev spektrofotometrisi kalibrasyon eğrileri, Kabergolin derişimine karşı 227-232 nm aralığındaki $d^2A/d\lambda^2$ değerleri grafiğe geçirilerek elde edilmiştir (Şekil 4-15 ve Şekil 4-16). $d^2A/d\lambda^2$ ölçümleri pikten pike (227-232nm) ve pikten sıfıra (232nm) teknikleriyle yapılmıştır.



Şekil 4-15 Kabergolin'in pikten pike ölçüm ile elde edilen 2.dereceden türev spektrofotometrisi kalibrasyon eğrisi ($\lambda = 227-232nm$)



Şekil 4-16 Kabergolin'in pikten sıfıra ölçüm ile elde edilen 2.dereceden türev spektrofotometrisi kalibrasyon eğrisi ($\lambda = 232nm$)

Önerilen yöntemlere ait eğrilerin özellikleri Tablo 4-3'de verilmiştir.

Tablo 4-3.Önerilen yöntemlere ait kalibrasyon eğrilerinin özellikleri

	UV-GB Spektrofotometrisi	2.Dereceden Türev Spektrofotometrisi	
		Pikten pike	Pikten sıfıra
Regresyon Denklemi*	$y=0.0143x+0.0074$	$y=0.0045x-0.0012$	$y=0.0018x-0.0022$
Eğimin standart hatası	0.0010	0.0014	0.0009
Kestirimin standart hatası	0.0020	0.0011	0.0019
Korelasyon katsayısı (r)	0.9998	0.9997	0.9997
Tanımlayıcılık katsayısı (r^2)	0.9998	0.9996	0.9995
Doğrusallık aralığı ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1-125	1-125	1-125
Gözlenebilme sınırı ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.2076	0.0249	0.0624
Tayin alt sınırı ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.6293	0.0756	0.1891

* $y = a + bx$; x: $\mu\text{g mL}^{-1}$ biriminde derişim, y: Sinyal, a: Kestirim, b: Eğim.

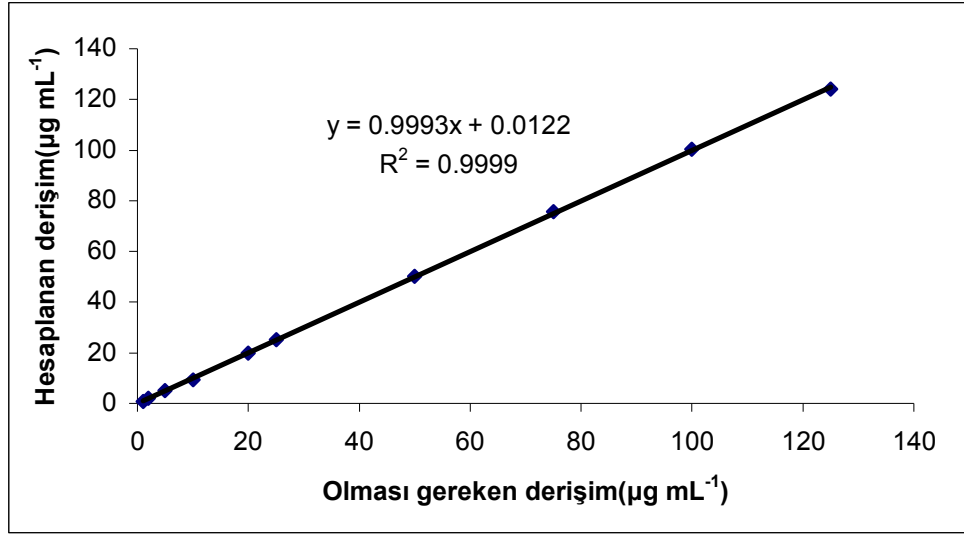
Kabergolin'in sulu ortamdaki çözeltilerinde 2. dereceden türev spektrumlarının değerlendirilmesi için pikten pike ve pikten sıfıra ölçümler yapılarak kalibrasyon eğrileri çizilmiş ve çalışmamızın türev spektrofotometrisi sonuçlarının pikten pike ölçüm ile değerlendirilmesine karar verilmiştir. Bu eğrinin doğrusallıktan ayrılış ve korelasyon katsayılarının önem kontrolüne ait istatistiksel değerlendirme sonuçları ise Tablo 4-4'de verilmiştir.

Tablo 4-4 Kabergolin'in 2.dereceden türev spektrofotometrisi ile analizinden elde edilen kalibrasyon eğrisinin pikten pike ölçüm ile korelasyon katsayısı ve doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü

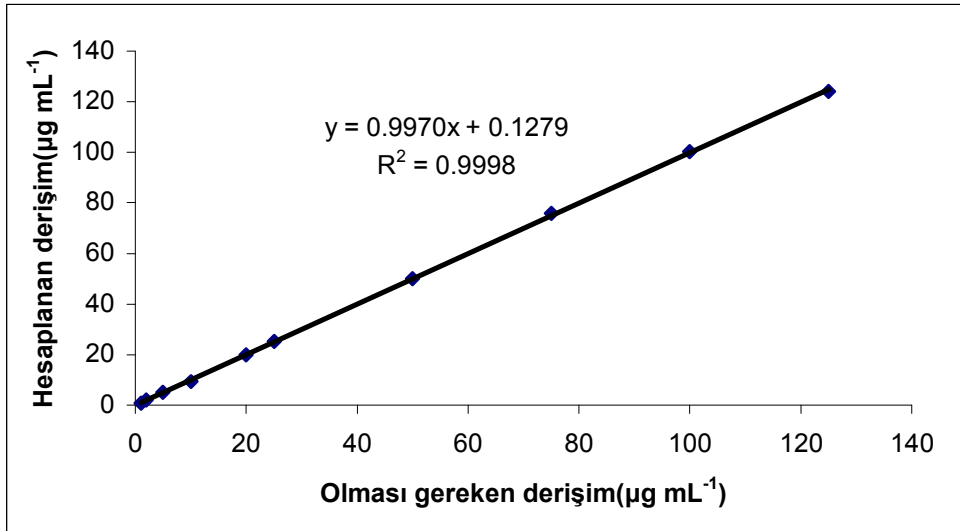
Korelasyon Katsayısının Önem Kontrolü						
N	R	S_r	t_H	t_T		
22	0.9996	6.32×10^{-3}	158.06	2.08		
Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü						
RKT	YOAKT	RAKT	RAKO	RKO	F_H	F_T
5.925×10^{-3}	5.929×10^{-3}	4.68×10^{-6}	2.34×10^{-7}	5.925×10^{-3}	25307.45	4.35

İstatistiksel terimler ve hesaplamalar için Bkz. EK 2

Yöntemlerin doğrusallığının kontrolü için kalibrasyon eğrilerini oluşturan derişimlerde hazırlanan standart çözeltilerin analizleri yapıp, kalibrasyon eğrilerinin denklemleri ile hesaplanan derişim değerleri olması gereken (nominal) derişimlere karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4-17 ve Şekil 4-18).



Şekil 4-17 Kabergolin'in UV-GB spektrofotometrisine ait yöntem doğruluk grafiği



Şekil 4-18 Kabergolin'in 2.dereceden türev spektrofotometrisine ait yöntem doğruluk grafiği

4.3.4. Doğruluk ve Kesinlik

Geliştirilen yöntemlerin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik çalışmaları üç farklı derişimde 7 bağımsız çözeltiyle yapılmış olup bulgular Tablo 4-5 ve Tablo 4-6'da verilmiştir.

Tablo 4-5 UV-GB spektrofotometrisi ile gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk analiz bulguları

Kabergolin Miktarı ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Günler arası ⁽¹⁾		Gün İçi ⁽²⁾	
	Bulunan Miktar	% Bağlı Hata	Bulunan Miktar	% Bağlı Hata
10	9.99	0.10	9.89	1.10
	10.07	-0.70	9.95	0.50
	9.95	0.50	10.01	-0.10
	9.89	1.10	9.98	0.20
	10.02	-0.20	9.97	0.30
	9.95	0.50	10.06	-0.60
	9.91	0.90	10.04	-0.40
	$\bar{X}=9.95\pm0.02$ SS=0.06 BSS=% 0.63		$\bar{X}=9.98\pm0.02$ SS=0.05 BSS=% 0.57	
50	49.83	0.34	50.35	-0.70
	49.52	0.96	50.08	-0.16
	50.09	-0.18	50.46	-0.92
	50.16	-0.32	49.90	0.20
	50.04	-0.08	49.77	0.46
	49.85	0.30	50.18	-0.36
	50.48	-0.96	49.88	0.24
	$\bar{X}=50.04\pm0.11$ SS=0.30 BSS=% 0.60		$\bar{X}=50.08\pm0.09$ SS=0.25 BSS=% 0.51	
100	100.90	-0.90	100.88	-0.88
	100.66	-0.66	100.53	-0.53
	99.89	0.11	100.49	-0.49
	100.38	-0.38	99.87	0.13
	99.08	0.92	99.72	0.28
	100.28	-0.28	100.22	-0.22
	100.31	-0.31	100.19	-0.19
	$\bar{X}=100.31\pm0.22$ SS=0.59 BSS=% 0.59		$\bar{X}=100.22\pm0.15$ SS=0.39 BSS=% 0.39	

¹Günler arası çalışmalar; üç derişim seviyesinde yedi ayrı çözelti kullanılarak 7 ayrı günde yapılmıştır.

²Gün içi çalışmalar; üç derişim seviyesinde yedi ayrı çözelti kullanılarak aynı günde yapılmıştır.

$\bar{X}$: Ortalama $\pm$ Standart hata, SS:Standart sapma, BSS:Bağıl standart sapma (İstatistiksel hesaplamalar için Bkz. EK 1).

Tablo 4-6 2.Dereceden türev spektrofotometrisi ile gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk analiz bulguları

Kabergolin Miktarı ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Günler arası ⁽¹⁾		Gün içi ⁽²⁾	
	Bulunan Miktar	% Bağıl Hata	Bulunan Miktar	% Bağıl Hata
10	9.96	0.40	9.93	0.70
	9.90	1.00	10.03	-0.30
	9.89	1.10	9.94	0.60
	9.94	0.60	9.97	0.30
	10.05	-0.50	9.98	0.20
	9.94	0.60	9.92	0.80
	10.07	-0.70	10.10	-1.00
	$\bar{X}=9.94\pm0.03$ SS=0.06 BSS=% 0.70		$\bar{X}=9.97\pm0.02$ SS=0.06 BSS=% 0.64	
50	49.83	0.34	50.31	-0.62
	49.52	0.96	50.14	-0.28
	50.11	-0.22	50.42	-0.84
	50.52	-1.04	49.83	0.34
	50.21	-0.42	50.19	-0.38
	49.79	0.42	50.09	-0.18
	50.09	-0.18	49.64	0.72
	$\bar{X}=50.09\pm0.12$ SS=0.32 BSS=% 0.65		$\bar{X}=50.14\pm0.10$ SS=0.27 BSS=% 0.54	
100	100.65	-0.65	100.87	-0.87
	101.01	-1.01	100.52	-0.52
	99.45	0.55	100.12	-0.12
	99.79	0.21	99.42	0.58
	99.31	0.69	99.96	0.04
	100.08	-0.08	99.81	0.19
	100.32	-0.32	100.57	-0.57
	$\bar{X}=100.08\pm0.24$ SS=0.62 BSS=% 0.62		$\bar{X}=100.12\pm0.19$ SS=0.50 BSS=% 0.50	

¹Günler arası çalışmalar; üç derişim seviyesinde yedi ayrı çözelti kullanılarak 7 ayrı günde yapılmıştır.

²Gün içi çalışmalar; üç derişim seviyesinde yedi ayrı çözelti kullanılarak aynı günde yapılmıştır.

$\bar{X}$: Ortalama $\pm$ Standart hata, SS:Standart sapma, BSS:Bağıl standart sapma (İstatistiksel hesaplamalar için Bkz. EK 1).

4.3.5. Duyarlılık

Kabergolin'in UV-GB spektrofotometrisi ve 2.dereceden türev spektrofotometrisi ile analiz yöntemlerine ait gözlenebilir sınırları (LOD) sırasıyla 0.2076 ve 0.0249 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ve tayin alt sınırları (LOQ) değerleri ise sırasıyla 0.6293 ve 0.0756 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır (Bkz. Tablo 4-3).

4.3.6. Geri Kazanım

0.5, 2 ve 4 mg Kabergolin içeren sentetik tablet çözeltisine ait UV-GB spektrofotometrisi ve 2.dereceden türev spektrofotometrisi yöntemleri için geri kazanım değerleri sırasıyla Tablo 4-7 ve Tablo 4-8'de verilmiştir.

Tablo 4-7 Sentetik tablet preparatlarının UV-GB spektrofotometrisi ile analiz bulguları

	Eklenen 0.5 mg		Eklenen 2 mg		Eklenen 4 mg	
	Bulunan (mg)	%Geri Kazanım	Bulunan (mg)	%Geri Kazanım	Bulunan (mg)	%Geri Kazanım
	0.5003	100.06	2.0221	101.10	4.0201	100.50
	0.4998	99.96	2.0092	100.46	4.0012	100.03
	0.5015	100.30	2.0156	100.78	3.9996	99.99
	0.4908	98.16	1.9982	99.91	4.0007	100.01
	0.5009	100.18	2.0187	100.93	4.0118	100.29
	0.5012	100.24	2.0051	100.25	3.9886	99.71
	0.5023	100.46	2.0088	100.44	4.0019	100.04
$\bar{X} =$	0.5009±0.0014	100.18	2.0092±0.0030	100.46	4.0012±0.0037	100.03
SS=	0.0039	0.7878	0.0082	0.4122	0.0099	0.2498
BSS=	% 0.78	0.78	% 0.41	0.41	% 0.24	0.24
GA=	0.4972-0.5046		2.0025-2.0158		3.9920-4.0103	

$\bar{X}$: Ortalama±standart hata. SS: Standart Sapma. BSS: Bağıl Standart Sapma. GA: Güven Aralığı (α :0.05) (Bkz. EK 1)

Tablo 4-8 Sentetik tablet preparatlarının 2.dereceden türev spektrofotometrisi ile analiz bulguları

	Eklenen 0.5 mg		Eklenen 2 mg		Eklenen 4 mg	
	Bulunan (mg)	%Geri Kazanım	Bulunan (mg)	%Geri Kazanım	Bulunan (mg)	%Geri Kazanım
	0.5008	100.16	2.0101	100.50	4.0106	100.26
	0.4990	99.80	2.0077	100.38	4.0102	100.25
	0.5013	100.26	2.0034	100.17	3.9854	99.63
	0.4925	98.50	1.9869	99.34	4.0113	100.28
	0.5026	100.52	1.9906	99.53	4.0094	100.23
	0.5022	100.44	2.0011	100.05	3.9671	99.17
	0.5021	100.42	2.0118	100.59	4.0016	100.04
$\bar{X}$ =	0.5013±0.0013	100.26	2.0034±0.0036	100.17	4.0094±0.0063	100.23
SS=	0.0035	0.7097	0.0096	0.4805	0.0169	0.4254
BSS=	% 0.70	0.70	% 0.47	0.47	% 0.42	0.42
GA=	0.4980-0.5045		1.9945-2.0122		3.9937-4.0250	

$\bar{X}$: Ortalama±standart hata. SS: Standart Sapma. BSS: Bağıl Standart Sapma. GA: Güven Aralığı (α :0.05) (Bkz. EK 1)

4.3.7. Tekrarlanabilirlik

Geliştirilen yöntemlerin tekrarlanabilirlik sonuçları Tablo 4-9'da verilmiştir.

Tablo 4-9 Geliştirilen yöntemlerin tekrarlanabilirlik bulguları (Analiz edilen: 20µg mL⁻¹)

UV-GB Spektrofotometrisi	2. Dereceden Türev Spektrofotometrisi
Bulunan değer (µg mL ⁻¹)	Bulunan değer (µg mL ⁻¹)
20.14	19.95
20.05	20.19
19.92	20.09
20.05	19.94
19.94	20.06
20.06	20.29
20.15	20.16
20.18	19.93
19.93	19.96
19.89	20.02
20.14	20.04
20.15	19.96
19.87	19.98
20.18	20.31
19.96	20.05
$\bar{X} = 20.05 \pm 0.03$ SS=0.11 BSS=% 0.56 GA=19.98-20.11	$\bar{X} = 20.04 \pm 0.03$ SS=0.12 BSS=% 0.61 GA=19.97-20.10

$\bar{X}$: Ortalama±standart hata. SS: Standart Sapma. BSS: Bağıl Standart Sapma. GA: Güven Aralığı (α :0.05) (Bkz. EK 1)

Cihaz tekrarlanabilirliği ise UV-GB spektrofotometrisi ve 2. dereceden türev spektrofotometrisi için 20 µg mL⁻¹ Kabergolin içeren çözeltinin tekrarlı analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Kabergolin'in sulu ortamda UV-GB spektrofotometrisi ve 2. dereceden türev spektrofotometrisi yöntemleri için absorbans ve $d^2A/d\lambda^2$ değerlerinin bağıl standart sapmaları sırasıyla % 0.85 ve % 0.74 olarak bulunmuştur.

4.3.8. Sağlamlık ve Tutarlılık

Geliştirilen yöntemlerin sağlamlıklarının sınanması için, yöntem parametrelerdeki küçük değişimlerin sonucu ne kadar etkilediği incelenmiş ve sonuçlar Tablo 4-10'da verilmiştir.

Tablo 4-10 Geliştirilen yöntemlere ait sağlamlık bulguları

UV-GB spektrofotometrisi ile analiz sonuçları (n=6)			
Kabergolin 0.5 mg	280nm	278nm	282nm
	0.5031	0.5027	0.5036
	0.5013	0.5009	0.5017
	0.5022	0.5017	0.5027
	0.4978	0.4974	0.4983
	0.4987	0.4982	0.4992
	0.5004	0.4999	0.5009
$\bar{X}$	0.5008	0.5004	0.5013
SS	0.0020	0.0020	0.0020
BSS	% 0.41	% 0.41	% 0.41
Tek yönlü varyans analizi: $F_H=2.34 < F_T=3.68$, $p>0.05$			
2. Dereceden türev spektrofotometrisi ile analiz sonuçları (n=6)			
Kabergolin 0.5 mg	227-232nm	225-230nm	229-234nm
	0.5014	0.4911	0.4914
	0.5009	0.4952	0.4949
	0.5011	0.4986	0.4985
	0.4981	0.4853	0.4849
	0.4979	0.4896	0.4894
	0.5029	0.4964	0.4961
$\bar{X}$	0.5010	0.4932	0.4932
SS	0.0019	0.0049	0.0050
BSS	%0.39	%1.00	%1.01
Tek yönlü varyans analizi: $F_H=3.42 < F_T=3.68$, $p>0.05$			

$\bar{X}$: Ortalama SS: Standart Sapma. BSS: Bağlı Standart Sapma (Bkz. EK 1)

F_H : Hesaplanan F değeri; F_T : teorik F değeri; p: Hesaplanan yanılma düzeyi (Bkz. EK 2).

Geliştirilen yöntemlerin tutarlılık testi için UV-GB spektrofotometrisi ve 2.dereceden türev spektrofotometrisi ile farklı cihazda veya farklı analizciler tarafından yapılan analiz verileri ve istatistiksel karşılaştırma sonuçları Tablo 4-11 ve Tablo 4-12 'de verilmiştir.

Tablo 4-11 UV-GB spektrofotometrisi ve 2.dereceden türev spektrofotometrisi ile farklı cihazlara ait analiz sonuçları

UV-GB Spektrofotometrisi ile analiz sonuçları (n=6)				
	1. Cihaz		2. Cihaz	
Eklenen miktar	Bulunan miktar (mg)	% Geri kazanım	Bulunan miktar (mg)	% Geri kazanım
Kabergolin 0.5 mg	0.5009	100.18	0.5011	100.22
	0.5013	100.26	0.5015	100.30
	0.4979	99.58	0.4963	99.26
	0.5021	100.42	0.5028	100.56
	0.4982	99.64	0.4969	99.38
	0.5029	100.58	0.5043	100.86
$\bar{X}$:	0.5011	100.22	0.5013	100.26
SS :	0.0020	0.41	0.0032	0.64
BSS :	% 0.41	% 0.41	% 0.65	% 0.64
Farklı iki cihaz bulguları için Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi: $T_H=11.5 > T_T=0.461$, $p>0.05$.				
2. Dereceden Türev Spektrofotometrisi ile analiz sonuçları (n=6)				
Kabergolin 0.5 mg	0.5015	100.30	0.5026	100.52
	0.5018	100.36	0.5031	100.62
	0.4976	99.52	0.4974	99.48
	0.5032	100.64	0.4962	99.24
	0.4965	99.30	0.5043	100.86
	0.5024	100.48	0.5020	100.40
$\bar{X}$:	0.5016	100.33	0.5023	100.46
SS :	0.0027	0.55	0.0033	0.66
BSS :	% 0.60	% 0.55	% 0.66	% 0.66
Farklı iki cihaz bulguları için Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi: $T_H=10 > T_T=0.500$, $p>0.05$.				

$\bar{X}$: Ortalama; SS : Standart sapma; BSS : Bağıl standart sapma (Bkz. EK 1); T_H : Hesaplanan T değeri;

T_T : n=10 serbestlik derecesindeki teorik T değeri; p: Hesaplanan yanılma düzeyi (Bkz. EK 2).

Tablo 4-12 UV-GB spektrofotometrisi ve 2. dereceden türev spektrofotometrisi ile farklı analizcilere ait analiz sonuçları

UV-GB Spektrofotometrisi ile analiz sonuçları (n=6)				
	1. Analizci		2. Analizci	
Eklenen miktar	Bulunan miktar (mg)	% Geri kazanım	Bulunan miktar (mg)	% Geri kazanım
Kabergolin 0.5 mg	0.5013	100.26	0.5010	100.20
	0.5015	100.30	0.5018	100.36
	0.5026	100.52	0.5023	100.46
	0.4988	99.76	0.4982	99.64
	0.4987	99.74	0.4990	99.80
	0.5017	100.34	0.5014	100.28
$\bar{X}$:	0.5014	100.28	0.5012	100.24
SS :	0.0016	0.33	0.0016	0.33
BSS :	% 0.32	% 0.32	% 0.33	% 0.33
İki analizcinin bulguları için Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi: $T_H=18 > T_T=0.219$, $p>0.05$.				
2. Dereceden Türev Spektrofotometrisi ile analiz sonuçları (n=6)				
Kabergolin 0.5 mg	0.5019	100.38	0.5021	100.42
	0.5013	100.26	0.5017	100.34
	0.5015	100.30	0.5014	100.28
	0.4984	99.68	0.4985	99.70
	0.4985	99.70	0.4984	99.68
	0.5012	100.24	0.5011	100.22
$\bar{X}$:	0.5012	100.25	0.5012	100.25
SS :	0.0015	0.31	0.0016	0.32
BSS :	% 0.32	% 0.31	% 0.33	% 0.32
İki analizcinin bulguları için Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi: $T_H=9 > T_T=0.422$, $p>0.05$.				

$\bar{X}$: Ortalama; SS : Standart sapma; BSS : Bağıl standart sapma (Bkz. EK 1); T_H : Hesaplanan T değeri; T_T : n=10 serbestlik derecesindeki teorik T değeri; p: Hesaplanan yanılma düzeyi (Bkz. EK 2).

4.4. Farmasötik Preparatların Analizi

Kabergolin içeren preparatlardan Kabergolin analizi için UV-GB spektrofotometrisi ve 2. dereceden türev spektrofotometrisi ile elde edilen bulguları Tablo 4-13 ve Tablo 4-14'de sunulmuştur.

Tablo 4-13 Kabergolin içeren farmasötik preparatların UV-GB spektrofotometrisi ile kalibrasyon eğrisi kullanılarak elde edilen analiz bulguları

	Dostinex® (0.5 mg)	Cabaser® (1 mg)	Cabaser® (2 mg)	Cabaser® (4 mg)
	0.5014	1.0144	2.0283	4.0363
	0.5072	1.0028	2.0292	4.0367
	0.5074	1.0036	2.0285	4.0028
	0.5031	1.0161	2.0121	4.0305
	0.5059	1.0139	2.0199	4.0583
	0.5093	1.0116	2.0007	4.0014
	0.5019	1.0105	2.0199	4.0412
$\bar{X}$	0.5059±0.0011	1.0116±0.0019	2.0199±0.0041	4.0363±0.0077
SS	0.0030	0.0052	0.0110	0.0206
BSS	% 0.60	% 0.52	% 0.54	% 0.51
GA	0.5031-0.5086	1.0067-1.0164	2.0097-2.0300	4.0172-4.0553

$\bar{X}$: Ortalama $\pm$ Standart hata; SS: Standart Sapma; BSS: Bağıl Standart Sapma; Güven Aralığı ($\alpha=0.05$)(Bkz. EK 1)

Tablo 4-14 Kabergolin içeren farmasötik preparatların 2.dereceden türev spektrofotometrisi ile kalibrasyon eğrisi kullanarak elde edilen analiz bulguları

	Dostinex® (0.5 mg)	Cabaser® (1 mg)	Cabaser® (2 mg)	Cabaser® (4 mg)
	0.5012	1.0125	2.0025	4.0587
	0.5034	1.0011	2.0182	4.0133
	0.5059	1.0089	2.0286	4.0015
	0.5011	1.0134	2.0013	4.0287
	0.5049	1.0147	2.0125	4.0449
	0.5101	1.0019	2.0016	4.0008
	0.5064	1.0158	2.0268	4.0507
$\bar{X}$	0.5049±0.0011	1.0125±0.0022	2.0125±0.0044	4.0287±0.0089
SS	0.0031	0.0060	0.0118	0.0238
BSS	% 0.62	% 0.59	% 0.58	% 0.59
GA	0.5020-0.5077	1.0069-1.0180	2.0015-2.0234	4.0066-4.0507

$\bar{X}$: Ortalama ± Standart hata; SS: Standart Sapma; BSS: Bağıl Standart Sapma; Güven Aralığı ($\alpha=0.05$)(Bkz. EK 1)

Dostinex® ve Cabaser® tabletleri analize hazırlanarak (Bölüm 3.2.3.) Kabergolin miktarı standart ekleme tekniğiyle de tayin edilmiştir (3.3.1. 2 ve 3.3.2. 2). UV-GB spektrofotometrisi ve 2.dereceden türev spektrofotometrisi analiz sonuçları eklenen standart Kabergolin derişimine (0, 10, 20, 30, 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) karşı grafiğe geçirildiğinde elde edilen doğrunun x eksenini negatif yönde kestiği noktanın mutlak değeri numunedeki Kabergolin derişimini vermiştir. Kabergolin içeren preparatlardan standart ekleme yöntemi ile elde edilen UV-GB spektrofotometrisi ve 2. dereceden türev spektrofotometrisi analiz bulguları Tablo 4-15 ve Tablo 4-16'da verilmiştir.

Tablo 4-15 Kabergolin içeren farmasötik preparatların UV-GB spektrofotometrisi ile standart ekleme yöntemi kullanarak elde edilen analiz bulguları

	Dostinex® (0.5 mg)	Cabaser® (1 mg)	Cabaser® (2 mg)	Cabaser® (4 mg)
	0.5003	1.0159	2.0004	4.0519
	0.5043	1.0003	2.0289	4.0516
	0.5031	1.0026	2.0019	4.0007
	0.5088	1.0138	2.0216	4.0459
	0.5062	1.0039	2.0233	4.0021
	0.5098	1.0145	2.0017	4.0018
	0.5093	1.0023	2.0231	4.0413
$\bar{X}$	0.5062±0.0013	1.0039±0.0025	2.0216±0.0046	4.0413±0.0094
SS	0.0035	0.0067	0.0124	0.0249
BSS	% 0.70	% 0.67	% 0.61	% 0.61
GA	0.5029-0.5094	0.9977-1.0100	2.0101-2.0330	4.0182-4.0643

$\bar{X}$: Ortalama ± Standart hata; SS: Standart Sapma; BSS: Bağıl Standart Sapma; Güven Aralığı ($\alpha=0.05$)(Bkz. EK 1)

Tablo 4-16 Kabergolin içeren farmasötik preparatların 2.dereceden türev spektrofotometrisi ile standart ekleme yöntemi kullanarak elde edilen analiz bulguları

	Dostinex® (0.5 mg)	Cabaser® (1 mg)	Cabaser® (2 mg)	Cabaser® (4 mg)
	0.5078	1.0122	2.0014	4.0421
	0.5008	1.0009	2.0316	4.0534
	0.5064	1.0011	2.0021	4.0013
	0.5083	1.0154	2.0284	4.0438
	0.5002	1.0018	2.0218	4.0012
	0.5078	1.0147	2.0013	4.0005
	0.5004	1.0013	2.0206	4.0529
$\bar{X}$	0.5064±0.0014	1.0018±0.0026	2.0206±0.0050	4.0421±0.0096
SS	0.0038	0.0069	0.0133	0.0254
BSS	% 0.75	% 0.69	% 0.66	% 0.63
GA	0.5028-0.5099	0.9954-1.0081	2.0082-2.0329	4.0186-4.0665

$\bar{X}$: Ortalama $\pm$ Standart hata; SS: Standart Sapma; BSS: Bağıl Standart Sapma; Güven Aralığı ($\alpha=0.05$)(Bkz. EK 1)

Kabergolin içeren preparatlardan (Dostinex® 0.5 mg, Cabaser® 1 mg, Cabaser® 2 mg ve Cabaser® 4 mg) kalibrasyon eğrisi ve standart ekleme yöntemi ile etkin madde tayininde elde edilen UV-GB spektrofotometrisi ve 2. dereceden türev spektrofotometrisi analiz bulguları Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (Tablo 4-17).

Tablo 4-17 Kabergolin içeren preparatlardan UV-GB spektrofotometrisi ve 2. dereceden türev spektrofotometrisi yöntemi ile elde edilen analiz bulguların karşılaştırılması

	Kalibrasyon eğrisi yöntemi	
	UV-GB Spektrofotometrisi	2. Dereceden Türev Spektrofotometrisi
Dostinex® (0.5 mg)	Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi: $T_H:11 > T_T:0.344$, $p>0.05$	
Cabaser® (1 mg)	Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi: $T_H:12 > T_T:0.406$, $p>0.05$	
Cabaser® (2 mg)	.Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi: $T_H:6 > T_T:0.109$, $p>0.05$	
Cabaser® (4 mg)	Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi: $T_H:10 > T_T:0.289$, $p>0.05$	
	Standart ekleme yöntemi	
	UV-GB Spektrofotometrisi	2. Dereceden Türev Spektrofotometrisi
Dostinex® (0.5 mg)	Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi: $T_H:9 > T_T:0.234$, $p>0.05$	
Cabaser® (1 mg)	Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi: $T_H:9 > T_T:0.234$, $p>0.05$	
Cabaser® (2 mg)	Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi: $T_H:18 > T_T:0.289$, $p>0.05$	
Cabaser® (4 mg)	Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi: $T_H:14 > T_T:0.531$, $p>0.05$	

T_H : Hesaplanan T değeri; T_T : $n=10$ serbestlik derecesindeki teorik T değeri; p : Hesaplanan yanılma düzeyi (Bkz. EK 2).

Kabergolin içeren preparatlardan (Dostinex® 0.5 mg, Cabaser® 1 mg, Cabaser® 2 mg ve Cabaser® 4 mg) UV-GB spektrofotometrisi ve 2. dereceden türev spektrofotometrisi ile kalibrasyon eğrisi ve standart ekleme yöntemi uygulanması sonucunda elde edilen analiz bulguları Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (Tablo 4-18).

Tablo 4-18 Kabergolin içeren preparatlardan kalibrasyon eğrisi ve standart ekleme yöntemi ile elde edilen analiz bulgularının uygulanan yöntemler arasında karşılaştırılması

	UV-GB Spektrofotometrisi	
	Kalibrasyon Eğrisi Yöntemi	Standart Ekleme Yöntemi
Dostinex® (0.5mg)	Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi: $T_H:16 > T_T:0.406$, $p>0.05$	
Cabaser® (1 mg)	Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi: $T_H:21 > T_T:0.118$, $p>0.05$	
Cabaser® (2 mg)	Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi: $T_H:14 > T_T:0.531$, $p>0.05$	
Cabaser® (4 mg)	Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi: $T_H:18 > T_T:0.289$, $p>0.05$	
	2.Dereceden Türev Spektrofotometrisi	
	Kalibrasyon Eğrisi Yöntemi	Standart Ekleme Yöntemi
Dostinex® (0.5mg)	Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi: $T_H:14 > T_T:0.531$, $p>0.05$	
Cabaser® (1 mg)	Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi: $T_H:20 > T_T:0.234$, $p>0.05$	
Cabaser® (2 mg)	Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi: $T_H:12 > T_T:0.406$, $p>0.05$	
Cabaser® (4 mg)	Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi: $T_H:15 > T_T:0.421$, $p>0.05$	

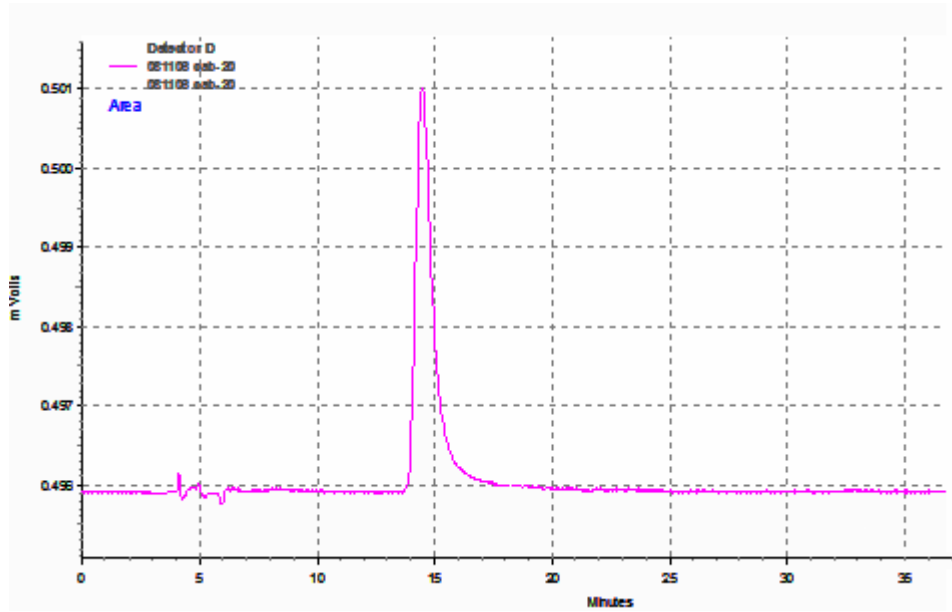
T_H : Hesaplanan T değeri; T_T : $n=10$ serbestlik derecesindeki teorik T değeri; p : Hesaplanan yanılma düzeyi (Bkz. EK 2).

4.5. Karşılaştırma Yöntemi (HPLC-ECD) ile Analiz

4.5.1. Doğrusallık

Karşılaştırma yöntemi olarak seçilen HPLC-ECD yöntemi (3) için kalibrasyon eğrisi, farmasötik preparatlardaki Kabergolin miktarları göz önünde bulundurularak, $5-60 \mu\text{g mL}^{-1}$ derişim aralığında pik alanları Kabergolin derişimine karşı grafiğe geçirilerek oluşturulmuştur.

Karşılaştırma yöntemi olarak kullanılan HPLC-ECD yöntemi ile elde edilen kromatogram Şekil 4-19'da verilmiştir.



Şekil 4-19 HPLC cihazından elde edilen kromatogram

Kalibrasyon eğrisinin (n=10) özellikleri Tablo 4-19'da, doğrusallıktan ayrılış ve korelasyon katsayısının önem kontrolüne ait istatistiksel değerlendirme sonuçları Tablo 4-20'de verilmiştir.

Tablo 4-19 HPLC yöntemine ait kalibrasyon eğrisinin özellikleri

	Kabergolin
Regresyon denklemi*	$y = 13715x + 1839.6$
Eğimin standart hatası	4.1270
Kestirimin standart hatası	4.4182
Korelasyon katsayısı (r)	0.9998
Tanımlayıcılık katsayısı (R²)	0.9997
Doğrusallık aralığı	5-60 $\mu\text{g mL}^{-1}$

* $y = a + bx$; x : $\mu\text{g mL}^{-1}$ biriminde derişim, y : Pik alan oranları, a : Kestirim, b : Eğim.

Tablo 4-20 Kabergolin'in HPLC ile analizinden elde edilen kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı ve doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü

Korelasyon Katsayısının Önem Kontrolü						
N	R	S _r	t _H	t _T		
10	0.9998	6.12x10 ⁻³	163.26	2.3		
Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü						
RKT	YOAKT	RAKT	RAKO	RKO	F _H	F _T
7.67x10 ¹¹	7.68x10 ¹¹	111157744	13894718	7.67x10 ¹¹	55268.75	5.32

(İstatistiksel terimler ve hesaplamalar için Bkz. EK 2).

4.5.2. Doğruluk ve Kesinlik

Kabergolin'in HPLC ile tayini yöntemi için gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik testlerine ait bulgular Tablo 4-21'de verilmiştir.

Tablo 4-21 HPLC yöntemiyle Kabergolin için elde edilen gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk bulguları

Kabergolin Miktarı ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Günler Arası ⁽¹⁾		Gün İçi ⁽²⁾	
	Bulunan Miktar ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% Bağıl Hata	Bulunan Miktar ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% Bağıl Hata
5	5.01	-0.20	5.05	-1.00
	5.08	-1.60	5.07	-1.40
	5.03	-0.60	5.04	-0.80
	5.02	-0.40	5.08	-1.60
	5.07	-1.40	5.01	-0.20
	$\bar{X} = 5.03 \pm 0.01$		$\bar{X} = 5.05 \pm 0.01$	
	SS=0.03		SS=0.02	
	BSS=% 0.61		BSS=% 0.54	
20	20.21	-1.05	20.19	-0.95
	20.16	-0.80	19.94	0.30
	20.11	-0.55	20.22	-1.10
	20.03	-0.15	20.09	-0.45
	19.89	0.55	20.06	-0.30
	$\bar{X} = 20.07 \pm 0.05$		$\bar{X} = 20.09 \pm 0.05$	
	SS=0.11		SS=0.11	
	BSS=% 0.58		BSS=% 0.55	
60	60.23	-0.38	60.02	-0.03
	60.29	-0.48	60.38	-0.63
	59.81	0.31	59.78	0.36
	60.03	-0.05	60.09	-0.15
	59.48	0.86	59.57	0.71
	$\bar{X} = 60.03 \pm 0.15$		$\bar{X} = 60.02 \pm 0.14$	
	SS=0.33		SS=0.30	
	BSS=% 0.55		BSS=% 0.51	

¹Günler arası çalışmalar; üç derişim seviyesinde beş ayrı çözelti kullanılarak 5 ayrı günde yapılmıştır.

²Gün içi çalışmalar; üç derişim seviyesinde beş ayrı çözelti kullanılarak aynı günde yapılmıştır.

$\bar{X}$: Ortalama $\pm$ Standart hata, SS:Standart sapma, BSS:Bağıl standart sapma (İstatistiksel hesaplamalar için Bkz. EK 1).

4.5.3. Kabergolin'in Farmasötik Preparatlardan Analizi

Kabergolin içeren Dostinex® ve Cabaser® tabletlerinin UV-GB spektrofotometrisi ve 2.dereceden türev spektrofotometrisi ile karşılaştırma

yöntemiyle (HPLC) analiz sonuçları Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi kullanılarak karşılaştırılmıştır (Tablo 4-22 ve Tablo 4-23).

Tablo 4-22 Dostinex® ve Cabaser® tabletlerinin geliştirilen UV-GB spektrofotometrisi ve karşılaştırma yöntemi ile analizi bulguları

İçerik	UV-GB yöntemi			Karşılaştırma yöntemi		
	$\bar{X} \pm SH$	SS	BSS	$\bar{X} \pm SH$	SS	BSS
Dostinex 0.5 mg	0.5059±0.0011	0.0030	0.60	0.5079 ± 0.0012	0.0034	0.68
Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi: $T_H=14.5 > T_T=0.531$, $p>0.05$.						
Cabaser 1 mg	1.0116±0.0019	0.0052	0.52	1.0101 ± 0.0021	0.0058	0.58
Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi: $T_H=20 > T_T=0.188$, $p>0.05$.						
Cabaser 2 mg	2.0199±0.0041	0.0110	0.54	2.0171 ± 0.0049	0.0132	0.65
Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi: $T_H=20 > T_T=0.188$, $p>0.05$.						
Cabaser 4 mg	4.0363±0.0077	0.0206	0.51	4.0179 ± 0.0083	0.0222	0.55
Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi: $T_H=19 > T_T=0.234$, $p>0.05$.						

$\bar{X}$: Ortalama $\pm$ standart hata; SS :Standart sapma; BSS :Bağıl standart sapma (Bkz. EK 1); T_H : Hesaplanan T değeri; T_T : n=10 serbestlik derecesindeki teorik T değeri; p: Hesaplanan yanılma düzeyi (Bkz. EK 2).

Tablo 4-23 Dostinex® ve Cabaser® tabletlerin geliştirilen 2.dereceden türev spektrofotometrisi ve karşılaştırma yöntemi ile analizi bulguları

İçerik	2.Dereceden türev yöntemi			Karşılaştırma yöntemi		
	$\bar{X} \pm SH$	SS	BSS	$\bar{X} \pm SH$	SS	BSS
Dostinex 0.5 mg	0.5049 $\pm$ 0.0011	0.0031	0.62	0.5079 $\pm$ 0.0012	0.0034	0.68
Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi: $T_H=10 > T_T=0.289$, $p>0.05$.						
Cabaser 1 mg	1.0125 $\pm$ 0.0022	0.0060	0.59	1.0101 $\pm$ 0.0021	0.0058	0.58
Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi: $T_H=14 > T_T=0.531$, $p>0.05$.						
Cabaser 2 mg	2.0125 $\pm$ 0.0044	0.0118	0.58	2.0171 $\pm$ 0.0049	0.0132	0.65
Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi: $T_H=9 > T_T=0.234$, $p>0.05$.						
Cabaser 4 mg	4.0287 $\pm$ 0.0089	0.0238	0.59	4.0179 $\pm$ 0.0083	0.0222	0.55
Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi: $T_H=13 > T_T=0.469$, $p>0.05$.						

$\bar{X}$: Ortalama $\pm$ standart hata; SS :Standart sapma; BSS :Bağıl standart sapma (Bkz. EK 1); T_H : Hesaplanan T değeri; T_T : n=10 serbestlik derecesindeki teorik T değeri; p: Hesaplanan yanılma düzeyi (Bkz. EK 2).

Kabergolin içeren Dostinex® ve Cabaser® tabletlerinin UV-GB spektrofotometrisi, 2.dereceden türev spektrofotometrisi ve karşılaştırma yöntemiyle (HPLC) elde edilen analiz sonuçları Kruskal Wallis varyans analizi kullanılarak karşılaştırılmıştır (Tablo 4-24, $p > 0.05$).

Tablo 4-24 Dostinex® ve Cabaser® tabletlerin geliştirilen UV-GB, 2.dereceden türev spektrofotometrisi ve karşılaştırma yöntemi ile analizi bulguları

	UV-GB yöntemi	Türev yöntemi	HPLC yöntemi	KW
Dostinex 0.5mg	0.5059 $\pm$ 0.0011	0.5049 $\pm$ 0.0011	0.5079 $\pm$ 0.0012	3.13
Cabaser 1mg	1.0116 $\pm$ 0.0019	1.0125 $\pm$ 0.0022	1.0101 $\pm$ 0.0021	2.54
Cabaser 2mg	2.0199 $\pm$ 0.0041	2.0125 $\pm$ 0.0044	2.0171 $\pm$ 0.0049	2.11
Cabaser 4mg	4.0363 $\pm$ 0.0077	4.0287 $\pm$ 0.0089	4.0179 $\pm$ 0.0083	2.44
Kruskal Wallis varyans analizi için $KW_T=5.66$ ($KW_T > KW$; $p < 0.05$).				

KW_T : Kruskal Wallis varyans analizi için tablo değeri; KW: Kruskal Wallis varyans analizi ile hesaplanan test istatistiğidir (Bkz. EK 2).

5. TARTIŞMA

Kabergolin içeren farmasötik preparatlar, hiperprolaktinemi ve Parkinson hastalıklarında sık kullanılan ilaçlardır (1, 2). Bu preparatların rutin analizleri, üretimde kalite kontrol aşamasında yapılmaktadır. Kalite kontrol laboratuvarlarında kısa zamanda doğru ve tutarlı sonuç veren, uygulaması kolay, düşük maliyetli ve valide edilmiş analiz yöntemlerine ihtiyaç vardır. Kalite kontrol laboratuvarlarında miktar tayini amacıyla spektrofotometrik ve kromatografik yöntemler yaygın olarak uygulanmaktadır. Kromatografik yöntemler, zaman alıcı ön işlemler gerektirirler ve daha çok karışım halindeki numunelerin analizinde kullanılırlar. Kabergolin'in biyolojik matrikste (insan plazması ve idrar) nitel ve nicel tayini için RIA, HPLC-ECD ve farklı tekniklerin uygulandığı sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi (LC/MS) yöntemleri bildirilmiştir (2-8). Kabergolin'in farmasötik preparatlarından analizine yönelik bir yöntem kaynaklarda rastlanmamış, bu nedenle, tez çalışmasında Kabergolin'in rutin analizinde kullanımına uygun, valide edilmiş spektrofotometrik yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu çerçevede, Kabergolin'in farmasötik preparatlardan miktar tayini için UV-GB spektrofotometrisi ve 2.dereceden türev spektrofotometrisi yöntemleri geliştirilmiş, validasyon çalışmaları yapılarak T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından ruhsatlandırılmış ve Türk ilaç piyasasında yer alan farmasötik preparatlarından analizine uygulanmıştır.

Kabergolin'i üreten firma Pharmacia tarafından verilen analiz sertifikasında HPLC, IR, safsızlık, partikül boyutu gibi tanımlayıcı testlerden uygunluk aldığı belirtilmiştir (Analiz Sertifika Numarası: 1008816, Analiz Tarihi: 22.12.2004). Kabergolin'in saflığının laboratuvarımızda da kontrol edilmesi amacıyla erime noktası tayini yapılmış, 102°C olarak ölçülen erime noktası değerinin kaynakta (20) bildirilen değerle (102-104°C) uyumlu olması nedeniyle kullanılan etkin maddenin yeterli saflıkta olduğu sonucuna varılmıştır.

Kabergolin metanolde çözünür, bu nedenle stok çözeltiler metanol içinde hazırlanmıştır. Ancak, UV-GB spektrofotometrisi yöntemi ile analizinde çeşitli çözeltiler (sulu ortam, etanol, metanol, kloroform, 0.1 N HCl ve 0.1 N

NaOH) denenerek analiz işlemlerinde çözelti sistemi olarak sulu ortam kullanılmasına karar verilmiştir.

Kabergolin'in sulu ortamdaki UV-GB spektrumunda 219 ve 280 nm dalga boylarında iki maksimumu olduğu saptanmıştır (Bkz. Şekil 4-1). Kabergolin çözeltisinin 1., 2., 3. ve 4. dereceden türev spektrumları alındığında, orijinal spektrumun 219 nm dalga boyundaki bandının bütün türev derecelerinde daha belirginleştiği saptanmıştır (Bkz. Şekil 4-2, Şekil 4-3, Şekil 4-4 ve Şekil 4-5). Türev spektrofotometrisi ile nicel analizlerde 2. ve 4. derece türev eğrileri önerilmektedir (50). Kabergolin'in 1-125 µg mL⁻¹ derişim aralığında 1., 2., 3. ve 4. dereceden türev spektrumları ile elde edilen kalibrasyon eğrilerinin korelasyon katsayıları arasında fark olmadığı ve belirli bir Kabergolin derişiminde türev derecesi artırıldıkça sinyal büyüklüğünün belirgin biçimde küçüldüğü saptanmıştır. Ayrıca, ilaç analizlerinde referans olarak kullanılan Farmakope'lerde UV-GB spektrofotometrisi ve 2. dereceden türev spektrofotometrisi tekniklerine yer verilmektedir (43, 44). Dolayısıyla, Kabergolin miktar tayini için 280 nm'de UV-GB spektrofotometrisi ve 227-232 nm aralığında ise 2. dereceden türev spektrofotometrisi kullanılmasına karar verilmiştir.

Geliştirilen yöntemlerin validasyonu için analit çözeltilerinin kararlılığı, özgünlük, aralık ve doğrusallık, doğruluk, kesinlik, gözlenebilme sınırı, tayin alt sınırı, geri kazanım, tekrarlanabilirlik, sağlamlık ve tutarlılık çalışmaları yapılmıştır (41, 43-45).

Aydınlık ve karanlıkta kararlılık testlerinin amacı; analit veya analitlerle ilgili olarak örnek hazırlama süresince, depolama esnasında ve analitin analizi sırasında oluşabilecek herhangi bir bozunmanın saptanmasıdır. Bütün bu işlemler analitik yöntemin validasyonu sırasında yapılır (41). Kabergolin standart çözeltisi için belirli sürelerde (3, 6, 12 ve 24 saat) karanlıkta veya aydınlıkta (gün ışığı) bekletilmesi sonucunda Kabergolin cevabındaki değişiklikler izlenmiştir.

Aydınlıkta kararlılık testinde Kabergolin sulu ortamdaki absorbans değerinin 3.saatten sonra azalmaya başladığı saptanmıştır. Karanlıkta kararlılık testinde ise 24 saat boyunca elde edilen Kabergolin absorbans

değerleri ile aynı derişimde ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) taze hazırlanmış Kabergolin çözeltilerinin absorpsiyon değerleri arasındaki istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı bulunmuştur (Bkz. Tablo 4-1). Buzdolabında ($+4^{\circ}\text{C}$) saklanan çözeltilerin 280nm dalga boylarındaki absorpsiyon şiddetinde 2 ay boyunca bir azalma gözlenmemiştir ($p>0.05$, Bkz. Tablo 4-1). Böylece Kabergolin stok çözeltisinin $+4^{\circ}\text{C}$ 'de en az iki ay kararlı olduğunu söylenebilir. Bu bulgulara dayanarak Kabergolin stok çözeltileri buzdolabında renkli şişelerde en fazla 2 ay boyunca saklanmış ve kullanılacağı zaman oda sıcaklığına getirilerek pipetlemede sıcaklığa bağlı sıvı hacminin değişiminden doğabilecek hata en aza indirilmiştir. Kabergolin çalışmaları sırasında kullanılan standart ve numune çözeltileri ışıktan korunmuştur.

Özgünlük, yöntemin diğer maddeler varlığında analizi yapılan maddenin miktarını doğru olarak tayin edebilme yeteneğidir (41, 44, 47). UV-GB spektrofotometrisi yöntemi için özgünlük çalışmasında plasebo, Kabergolin standartı, Kabergolin eklenmiş plasebo ve tablet örneklerine ait spektrumlar (Bkz. Şekil 4-6, Şekil 4-7, Şekil 4-8 ve Şekil 4-9) karşılaştırıldığında Kabergolin UV-GB cevabının 280 nm'de herhangi bir girişim olmadığı ancak 219 nm'de bir zemin etkisinin olduğu görülmüştür. Aynı örneklerin, 2. dereceden türev spektrumları (Bkz. Şekil 4-10, Şekil 4-11, Şekil 4-12 ve Şekil 4-13) incelendiğinde ise 227-232 nm aralığındaki zemin etkisinin ortadan kalktığı saptanmıştır. Bu dalga boyu aralığında 2. dereceden türev spektrumunda türev sinyalinin büyüklüğü ve düzgünlüğü Kabergolin analizi için uygundur. Böylece Kabergolin daha kolay ve kesin olarak tanınabilir.

Kabergolin'in UV-GB spektrofotometrisi ve 2. dereceden türev spektrofotometrisi ile analizi yöntemleri için elde edilen kalibrasyon eğrileri geniş bir Kabergolin derişim aralığında ($1-125 \mu\text{g mL}^{-1}$) doğrusaldır (Bkz. Şekil 4-14, Şekil 4-15 ve Şekil 4-16). Ayrıca, UV-GB spektrofotometrisi ve 2. dereceden türev spektrofotometrisi kalibrasyon eğrilerinin doğrusallıktan ayrılışlarının önemsiz ve kalibrasyon eğrilerin korelasyon katsayılarının önemli bir değer olduğu istatistiksel olarak bulunmuştur (Bkz. Tablo 4-2, Tablo 4-4). Doğrusal cevap sınırı (üst tayin sınırı) spektrofotometre cevabının

derişim artışıyla doğrusal olarak artmasının bozulduğu sınırdır. Geliştirilen yöntemler için üst tayin sınırı $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Tayin alt sınırı ile üst tayin sınırı arasındaki derişim aralığına çalışma aralığı (veya doğrusallık aralığı) denilmektedir (41, 44, 47). Kabergolin'in UV-GB spektrofotometrisi ve 2. dereceden türev spektrofotometrisinde $1-125 \mu\text{g mL}^{-1}$ arasında doğrusal olduğu saptanmıştır. Farmasötik analizlerin validasyonunda, doğrusallık aralığının analiz edilecek etkin madde derişiminin %80-120'si boyutundaki analizlerini sağlayabilecek düzeyde olması gerektiği bildirilmiş olup, geliştirilen yöntemler bu koşulu sağlamaktadır (46, 49).

Kabergolin'in sulu ortamdaki çözeltilerinde 2. dereceden türev spektrumlarının değerlendirilmesi için pikten pike ve pikten sıfıra ölçümler yapılarak kalibrasyon eğrileri çizilmiş, pikten pike ölçüm ile elde edilen eğrinin eğimi daha yüksek ve LOQ ve LOD değerleri daha düşük olduğu için çalışmamızın türev spektrofotometrisi sonuçları pikten pike ölçümü ile değerlendirilmiştir (Bkz. Tablo 4-3).

Olması gereken derişime karşı yöntemle bulunan derişimler grafiğe geçirilince, $y=x$ benzeri bir doğru elde edilmesi, çalışılan aralıkta doğrusal sonuçlar elde edildiğinin diğer bir göstergesidir (Bkz. Şekil 4-17 ve Şekil 4-18).

Doğruluk, ölçülen ve doğru olarak kabul edilen değerler arasındaki uyumun bir ölçüsüdür ve % bağıl hata ile belirlenmektedir (41, 43-45). Yöntemin doğruluğunun belirlenmesi için bilinen numunelerde en az 3 farklı derişimde tekrarlanan bağımsız numune analizleriyle test edilmelidir. Geliştirilen yöntemlerin gün içi ve günler arası doğruluk çalışması $10, 50$ ve $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ Kabergolin derişimlerinde, 7 ayrı çözeltiyle yapılmış olup sonuçlarda kabul kriterinden çok daha düşük bağıl hata değerleri elde edilmiştir (UV-GB spektrofotometrisi için %BH; gün içi %0.10-1.10; günler arası %0.08-1.10, 2. dereceden türev spektrofotometrisi için %BH; gün içi %0.04-1.00; günler arası %0.08-1.10, Bkz. Tablo 4-5 ve Tablo 4-6). Analitik sonuçlarda en yüksek BH (mutlak değeri)'nin %5'i geçmeyeceği bildirilmiş (47), ancak farmasötik analizlerde bu değerin %0.1-1.5 aralığında olması

gerektiği belirtilmiştir (45, 49). Doğruluk çalışmasından elde edilen bulgular geliştirilen yöntemlerin gün içinde ve farklı günlerde doğru sonuç verdiğini ortaya koymaktadır.

Kesinlik, sonuçların tekrarlanabilirliğinin göstergesidir ve sayısal ölçütü BSS'dir (41, 43, 44). En az üç farklı derişimde tekrarlanan analiz sonuçlarının bağıl standart sapmasının en fazla %5 olabileceği (47), ancak tablet analizlerinde değişkenliğin %1.5'den fazla olamayacağı bildirilmiştir (45, 46, 49). Geliştirilen analiz yöntemlerinde, 10, 50 ve 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Kabergolin derişimlerinde yapılan gün içi ve günler arası analiz sonuçlarında kabul kriterinden düşük BSS değerlerinin elde edilmesi, yöntemlerin kesinliklerinin yüksek olduğunun göstergesidir ($n=7$, UV-GB spektrofotometrisi için gün içi %0.39-0.57; günler arası %0.59-0.63, 2. dereceden türev spektrofotometrisi için gün içi %0.50-0.64; günler arası %0.62-0.70, Bkz. Tablo 4-5, Tablo 4-6). Ayrıca, aynı derişimdeki standart çözeltilerden her iki yöntem ile miktar tayini yapıldığında elde edilen BSS değerleri en fazla %0.6184'dir. Cihaz tekrarlanabilirliği için 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ derişimde Kabergolin içeren çözeltinin tekrarlı analizleri sonucunda BSS değerlerinin % 0.85 ve % 0.74 olarak bulunması cihazın tekrarlanabilir sonuçlar verdiğini göstermektedir. ve cihaz sistemlerinin kesinliği için önerilen kriterini sağlaması (<%1) nedeniyle tekrarlanabilirdir ($n=15$, Bkz. Tablo 4-9).

LOD bir yöntemin saptayabileceği veya algılayabileceği en düşük analit derişimi, LOQ ise nicel analiz yapabileceği en düşük analit derişimi olarak ifade edilir (41, 43, 44, 47,48). Kabergolin için ICH validasyon rehberinde önerilen hesaplama yöntemi kullanılarak (Bkz. Bölüm 3.4.5.) UV-GB spektrofotometrisi yöntemi için LOQ değeri 0.6293 $\mu\text{g mL}^{-1}$, LOD değeri 0.2076 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur. 2. Dereceden türev spektrofotometrisi yönteminde ise, aynı hesaplama yöntemi kullanılarak, pikten pike ölçüm yöntemi ile LOQ değeri 0.0756 $\mu\text{g mL}^{-1}$, LOD değeri 0.0249 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur (Bkz. Tablo 4-3). Ancak, bu hesaplamalar sonucunda bulunan LOD ve LOQ değerleri UV-GB spektrofotometrisi ve 2. dereceden türev spektrofotometrisinde sinyali elde edilemeyen kuramsal değerlerdir. Bu nedenle, her iki yöntemin LOD değeri sinyal kayıt edilebilen en düşük

Kabergolin derişimi olan $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ kabul edilmiştir. Geliştirilen yöntemlerin LOQ değerleri ise hesaplanan yerine $\text{BSS} = \% 0.67$ ve $\text{BH} = 0.33$ olan Kabergolin'in $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ derişimidir. Bulgular geliştirilen yöntemlerin farmasötik preparattan analiz için gerekenden çok daha duyarlı olduklarını göstermektedir.

Geri kazanım, numuneye eklenen maddenin analiz sonucunda ne kadarının bulunduğunu belirtmek amacıyla kullanılır (41). Yöntemin geri kazanımının $\%100$ 'den düşük olması durumunda, kalibrasyon numuneleri ve bilinmeyen numuneler aynı işleminden geçtiği için, tekrarlanabilir geri kazanım varsa doğru sonuç elde edilebilir. Farmasötik preparattan miktar tayini için geliştirilen UV-GB spektrofotometrisi ve 2. dereceden türev spektrofotometrisi yöntemlerinin sentetik tablet numunelerinden geri kazanım değerleri sırasıyla $\%98.16$ - 101.10 ve $\%98.50$ - 100.59 aralıklarında bulunmuştur (Bkz. Tablo 4-7 ve Tablo 4-8). Farmasötik preparat analizlerinde kabul edilen geri kazanım aralıkları $\%80$ - 120 veya $\%70$ - 130 aralıklarındadır (45, 49) ve geliştirilen yöntemler bu kriterleri sağlamaktadır.

Geliştirilen yöntemlerin sağlamlık testlerinde, 0.5 mg Kabergolin içeren tabletlerin analizi, Avrupa Farmakopesi'nde spektrofotometreler için kabul edilen dalga boyu sapması (maksimum tolerans $\pm 2 \text{ nm}$) dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir (43). UV-GB spektrofotometrisi ve 2. dereceden türev spektrofotometrisi yöntemlerinde bilinçli olarak değiştirilen dalga boylarında elde edilen sonuçların, optimum dalga boylarında elde edilenlerden istatistiksel olarak farklı olmadığı ($p > 0.05$, Bkz. Tablo 4-10), dolayısıyla sonuçların etkilenmediği saptanmıştır.

Tutarlılık çalışmasında (41, 44, 45, 47), 0.5 mg Kabergolin içeren tabletlerin analizi, farklı cihaz ve farklı analizcinin sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Geliştirilen yöntemlerin farklı analizcilerin ve farklı cihazlarda uygulanmasından hesaplanan Kabergolin miktarları istatistiksel olarak farklı değildir ($p > 0.05$, Bkz. Tablo 4-11 ve Tablo 4-12). Bu bulgular, geliştirilen yöntemlerin dalga boyu değişimlerine karşı sağlam, analizci ve cihaz değişimlerinde tutarlı sonuçlar ürettiğini göstermektedir.

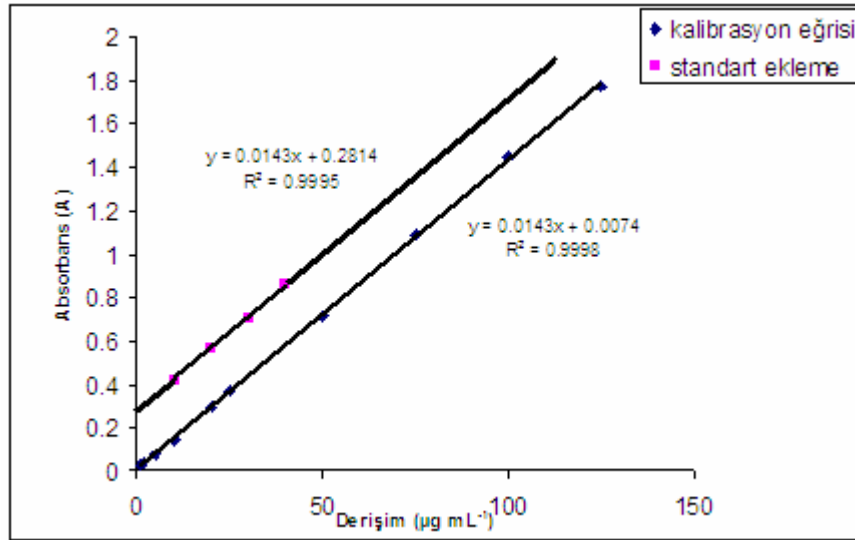
Geliştirilen ve valide edilen UV-GB spektrofotometrisi ve 2. dereceden türev spektrofotometrisi yöntemleri Dostinex® (0.5 mg), Cabaser® (1 mg), Cabaser® (2 mg) ve Cabaser® (4 mg) isimli farmasötik preparatların analizine uygulanmış, belirtilen etkin madde içeriklerine yakın miktarlar bulunmuştur (Bkz. Tablo 4-13 ve Tablo 4-14). Kabergolin tabletlerinden, UV-GB spektrofotometrisi ve 2. dereceden türev spektrofotometrisi ile miktar tayini yapıldığında analiz sonuçları farklı değildir (Bkz. Tablo 4-17 ve Tablo 4-18).

Bu preparatlar, kromatografik kolon ve numune matriksi farklılığı nedeniyle kısmi validasyonu yapılan karşılaştırma yöntemiyle (HPLC-ECD) de analiz edilmiştir (3). Kabergolin'e ait kalibrasyon eğrisinin özellikleri (Bkz. Tablo 4-19) ve kısmi validasyon bulguları karşılaştırma yönteminin laboratuvarımız koşullarında başarıyla uygulandığını göstermektedir (Bkz. Tablo 4-20 ve Tablo 4-21). Hem geliştirilen UV-GB spektrofotometrisi ve 2. dereceden türev spektrofotometrisi sonuçları arasında hem de geliştirilen yöntemler ile karşılaştırma yöntemi sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$, Bkz. Tablo 4-22 ve Tablo 4-23).

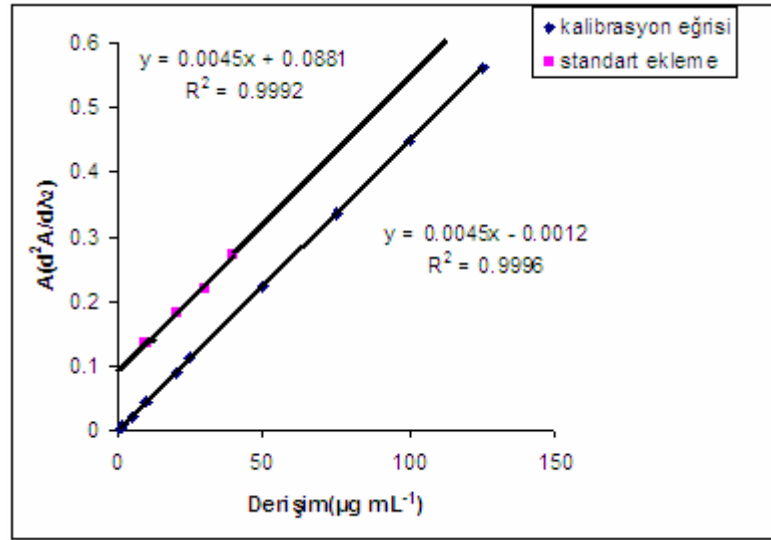
Geliştirilen ve valide edilen UV-GB spektrofotometrisi, 2. dereceden türev spektrofotometrisi ve karşılaştırma yöntemleri farmasötik preparatların analizine uygulanmış, Kabergolin tabletlerinden, UV-GB spektrofotometrisi, 2. dereceden türev spektrofotometrisi ve karşılaştırma yöntemleri ile miktar tayini yapıldığında analiz sonuçları Kruskal Wallis varyans analizi ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. ($p>0.05$, Bkz. Tablo 4-24).

Yöntemlerin preparatlara uygulanması sırasında yardımcı maddelerin analizi etkileyip etkilemediğine kesin olarak karar vermek amacıyla kalibrasyon eğrisi kullanılarak analiz edilen ilaçlar ayrıca standart ekleme yöntemiyle de analiz edilmiştir (Bkz. Tablo 4-15 ve Tablo 4-16). Kabergolin tabletlerinin gerek UV-GB spektrofotometrisi gerek 2. dereceden türev spektrofotometrisi ile analizlerinde kullanılan kalibrasyon eğrisi ve standart ekleme yöntemi ile elde edilen doğruların eğimleri aynıdır (Şekil 5-1 ve Şekil 5-2). Kabergolin içeren preparatlardan UV-GB spektrofotometrisi ve 2. dereceden türev spektrofotometrisi yöntemleri ile hem kalibrasyon eğrisi

hem de standart ekleme teknikleriyle elde edilen analiz sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p > 0.05$, Bkz. Tablo 4-17 ve Tablo 4-18). Bu bulgular farmasötik preparatlardaki yardımcı maddelerin analizi etkilemediğini göstermektedir, ayrıca yöntemlerin seçiciliğini de kanıtlamaktadır.



Şekil 5-1 Kabergolin'in UV-GB spektrofotometrisi ile kalibrasyon ve standart ekleme yöntemleri eğrileri



Şekil 5-2 Kabergolin'in 2. dereceden türev spektrofotometrisi ile kalibrasyon ve standart ekleme yöntemleri eğrileri

Sonuç olarak, geliştirilen UV-GB spektrofotometrisi ve 2. dereceden türev spektrofotometrisi yöntemlerinin doğru, duyarlı, kesin ve tekrarlanabilir, Kabergolin'in farmasötik preparatlardan analizinde doğrudan, hızlı ve kolay uygulanabilecek yöntemler oldukları sonucuna varılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmamızda Kabergolin'in farmasötik preparatlarından analizi için UV-GB spektrofotometrisi ve 2. dereceden türev spektrofotometrisi yöntemleri geliştirilmiştir.

Geliştirilen yöntemlerin validasyonu için analit çözeltilerinin kararlılığı, özgünlük, aralık ve doğrusallık, doğruluk ve kesinlik, gözlenebilme sınırı, alt ve üst tayin sınırları, geri kazanım, tekrarlanabilirlik, sağlamlık ve tutarlılık gibi validasyon parametreleri değerlendirilmiş, bütün parametrelerin kabul kriterlerini sağladığı saptanmıştır. Daha sonra, valide edilen yöntemler Türkiye piyasasında satılmakta olan, Kabergolin içeren Dostinex® (0.5 mg), Cabaser®(1 mg), Cabaser®(2 mg) ve Cabaser®(4 mg) isimli farmasötik preparatlara uygulanmış ve karşılaştırma yöntemi olarak HPLC-ECD yöntemiyle de analiz edilmiştir (3). Analiz sonuçları, her iki yöntemle bulunan sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir.

Sonuç olarak, Kabergolin'in analizi için doğru, duyarlı, kesin, seçici, tutarlı ve sağlam UV-GB spektrofotometrisi ve 2.dereceden türev spektrofotometrisi yöntemleri geliştirilmiştir.

Kabergolin içeren farmasötik preparatların analizi için kaynaklarda valide edilmiş UV-GB spektrofotometrisi ve 2.dereceden türev spektrofotometrisi yöntemleri bulunmadığından, tez çalışmasında geliştirilen ve valide edilen yöntemlerin kaynaklara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Geliştirilen yöntemlerin validasyon çalışmalarının yapılmış, validasyon sonuçlarının rutin ilaç analizleri için belirtilen geçerlilik kriterlerini sağlamış olması yöntemin güvenilirliğini kanıtlamaktadır (43-49).

Geliştirilen UV-GB spektrofotometrisi ve 2.dereceden türev spektrofotometrisi pek çok aletli analiz yöntemine göre daha kolay, daha kısa sürede analiz yapma imkanı sağlamakta ve analiz için herhangi bir ön işlem gerektirmemektedir. Ayrıca cihaz ve işletim maliyeti daha düşük olduğundan rutin çalışan laboratuvarlarda bulunma olasılığı yüksektir.

Kabergolin'in farmasötik preparattan 2.dereceden türev spektrofotometrisi ile analizi matriks girişimi etkisinin herhangi bir ayırma

yöntemine gerek duymadan uzaklaştırılması analiz sonuçlarında seçicilik, kesinlik ve doğruluk sağlamaktadır.

Bu üstünlükleri düşünüldüğünde, geliştirilen yöntemler, kolay uygulanabilir, güvenilirliği yüksek ve toplam işletme maliyeti düşük olduğundan, rutin analiz laboratuvarlarında, daha pahalı yöntemlere alternatif olarak önerilebilir.

KAYNAKLAR

- 1- Dotto, P. D., Bonuccelli, U. (2003). Clinical pharmacokinetics of cabergoline. *Clinical Pharmacokinetics*, 42 (7), 633-645.
- 2- Persiani, S., Pianezzola, E., Broutin, F., Fonte, G., Strolin Benedetti, M. (1992). Radioimmunoassay for the synthetic ergoline derivative cabergoline in biological fluids. *Journal of Immunoassay*, 13(3), 457-76.
- 3- Pianezzola, E., Bellotti, V., Croix, R. L., Benedetti, M. S. (1992). Determination of cabergoline in plasma and urine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography*, 574, 170-174.
- 4- Hughes, N., Winnick, W., Dunyach, J. J., Amad, M., Splendore, M., Paul, G. (2003). High-sensitivity quantitation of cabergoline and pergolide using a triple-quadrupole mass spectrometer with enhanced mass-resolution capabilities. *Journal of Mass Spectrometry*, 38, 743-751.
- 5- Igarashi, K., Hotta, K., Kasuya, F., Abe, K., Sakoda, S. (2003). Determination of cabergoline and L-dopa in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 792, 55-61.
- 6- Paul, G., Winnik, W., Hughes, N., Schweingruber, H., Heler, R., Schoen, A. (2003). Accurate mass measurement at enhanced mass-resolution on a triple quadrupole mass-spectrofotometer for the identification of a reaction impurity and collisionally-induced fragment ions of cabergoline. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17, 561-568.
- 7- Kimball, B. A., Deliberto, T. J. ve Johnston, J. J. (2001). Determination of cabergoline by electrospray ionization tandem mass spectrometry: Picogram detection via column focusing sample introduction. *Analytical Chemistry*, 73, 4972-4976.
- 8- Allievi, C., Dostert, P. (1998). Quantitative determination of cabergoline in human plasma using liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 12, 33-39.

- 9- Mycek M.J., Harvey R.A., Champe P.C. (1998). *Farmakoloji* (2.bs.)(Ş. Oktay, K. Berkman, F. Onat, Z. Gören ve P. Atagündüz, Çev.Ed.).İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
- 10- Cedarbaum, J.M., Gancher, S.T. (1993). *Parkinson Hastalığı* (G. Bakaç, Çev.). İstanbul: Yeni Alaş Ofset Matbaacılık. (1992).
- 11- Hauser, R.A., Zesiewicz, T.A. (2002). *Parkinson Hastalığı* (2.bs.).İstanbul: Deomed Medikal Yayıncılık.
- 12- Özcan, O.E., Turgut, M., Açıkgöz, B. (1995). *Temel Nöroşirürji* (5.bs.). Ankara: Güneş Kitabevi.
- 13- Eşkazan, E., Özdemir, O. (2000). Parkinson Hastalığının Tedavisinde Kullanılan İlaçlar. Bökesoy, A., Çakıcı, İ., Melli, M. (Ed.). *Farmakoloji Ders Kitabı* (s.290-296). Ankara: Gazi Kitabevi.
- 14- Dere, F. (2000). *Nöroanotomi Fonksiyonel Nöroloji Atlası ve Ders Kitabı* (3.bs.). Adana: Adana Nobel Tıp Kitabevi.
- 15- Kayaalp, S.O. (2000). *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji* (9.bs.). Ankara: Feryal Matbaası.
- 16- Erol, D.D. (2000). Antiparkinson ilaçlar. Akgün, H., Balkan, A., Bilgin, A.A., Çalış, Ü., Dalkara, S., Erdoğan, H. ve diğerleri (Ed.). *Farmasötik Kimya* (s.517-530). Ankara: Irmak Matbaası.
- 17- Süzer, Ö. (2002). *Farmakolojinin Temelleri*. Ankara: Nobel Tıp Kitabevi.
- 18- Benli, K., Oruçkaptan, H. (2004). Hareket Bozuklukları ve Cerrahi Tedavi. Benli, K (Ed.). *Temel Nöroşirürji* (s. 369-384). Ankara:Hacettepe Üniversitesi Yayınları.
- 19- *Drug Facts and Comparisons* (2003). 57th Edition, s.432-433.
- 20- O'Neil, M.J., Smith, A., Heckelman, P.E. (Ed.)(2001). *The Merck Index*, Thirteenth Edition.
- 21- *Physician's desk reference* (PDR)(2006). 60th Edition, Thomson's Healthcare.
- 22- Fariello, R.G. (1998). Pharmacodynamic and Pharmacokinetic features of cabergoline. *Drugs*, 55, 10-16.
- 23- Persiani, S., Sassolas, G., Piscitelli, G., Bizollon, C.A., Poggesi, I.,

Pianezzola, E. ve diğeri (1994). Pharmacodynamics and relative bioavailability of cabergoline tablets vs solution in healthy volunteers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83(10), 1421-4.

24- Gottwald, M.D., Bainbridge, J.L., Dowling, G.A., Aminoff, M.J., Alldredge, B.K. (1997). New pharmacotherapy for parkinson's disease. *Annals of Pharmacotherapy*, 31(10), 1205-17.

25- Verhelst, J., Abs, R., Maiter, D., Bruel, A., Vandeweghe, M., Velkeniers, B. ve diğeri (1999). Cabergoline in the treatment of hyperprolactinemia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84(7), 2518-22.

26- Yıldız, A., Genç, Ö., Bektaş, S. (1997). *Enstrümental Analiz Yöntemleri* (2.bs.). Ankara: Hacettepe Üniversitesi Basımevi.

27- Gündüz, T. (1988). *İnstrümental Analiz*. Ankara: Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları.

28- Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A. (1998). *Enstrümental Analiz İlkeleri* (E. Kılıç, F. Köseoğlu ve H. Yılmaz (Çev.Ed.). Ankara: Bilim Yayıncılık.

29- Harris, D.C. (1982). *Quantitative Chemical Analysis*. USA: W.H. Freeman and Company.

30- Howel, J.A., Hargis, L.G. (1994). Ultraviolet and light absorbtion spectrometry. *Analytical Chemistry*, 66: 445R-461R.

31- Cottrell, C.T. (1982). Extending the applications of derivative spectrophotometry. *Analytical Proceedings*, 43-45.

32- Fell, A.F., Smith, G. (1982). Higher derivative methods in ultraviolet-visible and infrared spectrophotometry. *Analytical Proceedings*, 28-33.

33- Rojas, F.S., Ojeda, B.C., Pavon, J.M.C. (1988). Derivative ultraviolet-visible region absorption spectrophotometry and its analytical applications. *Talanta*, 35 (10), 753-761.

34- Gans, P. (1982). Numerical Methods for generating derivative spectra. *Analytical Proceedings*, 33-35.

35- O'Haver, T.C. (1982). Derivative spectroscopy and it's applications

in analysis. *Analytical Proceedings*, 22-28.

36- O'Haver, T.C., Green, G.L. (1976). Numerical error analysis of derivative spectrometry for the quantitative analysis of mixtures. *Analytical Chemistry*, 43 (2), 312-318.

37- Özaltın. N., Koçer, A. (1997). Determination of omeprazole in pharmaceuticals by derivative spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 16(2), 337-342.

38- Nevado, J.J.B., Salinas, F., Paya, I.O., Capitan-Vallvey, L.F. (1991). Simultaneous determination of sulphathiazole and sulphanilamide in pharmaceuticals by derivative spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 9 (2), 117-122.

39- Chukwuenweniwe, J.E., Kalowole, I.A.(1989). Spektrophotometric assay of drugs in presence of spectral interferants in suspension and syrups. *International Journal of Pharmaceutics*, 51, 263-267.

40- Korany, M.A., Bedair, M., Mahgoup, H., Elsayed, M.A. (1986). Second derivative spectrophotometric determination of acetaminophen and phenacetin in presence of their degradation products. *Journal of association of analytical chemistry*, 69, 608-611.

41- ICH Steering Committee (2005). *Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1)*. Harmonized Tripartite Guideline.

42- Sümbüloğlu, K., Sümbüloğlu, V. (2000). *Biyoistatistik* (9.bs). Ankara: Hatipoğlu Yayınevi.

43- European Pharmacopoeia (2001). Third Edition, Council of Europe, Strasbourg.

44- The United States Pharmacopeia (2005). The national formulary, United States Pharmacopeial convention, INC. 12601, Twinbrook Parkway, Rockville.

45- Reviewer Guidance (1994). Validation of chromatographic methods. Center for drug evaluation and research (CDER).

46- Ermer, J. (2001). Validation in pharmaceutical analysis Part I: An integrated approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24, 755-767.

47- Taverniers, I., Loose, M.D., Bockstaele, E.V. (2004). Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends in Analytical Chemistry*, 23, 535-552.

48- Taverniers, I., Loose, M.D., Bockstaele, E.V. (2004). Trends in quality in the analytical laboratory. I. Traceability and measurement uncertainty of analytical results. *Trends in Analytical Chemistry*, 23, 480-490.

49- Ermer, J., Ploss, H.J. (2005). Validation in pharmaceutical analysis Part II: Central importance of precision to establish acceptance criteria and for verifying and improving the quality of analytical data. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37, 859-870.

50- Talsky, G., Marying, L., Kreuzer, H. (1978). High-resolution, higher-order UV-VIS derivative spectrophotometry. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 17 (11), 785-794.

EKLER

EK 1. İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması

Bağıl Standart Sapma Hesaplanması

$$\text{Bağıl Standart Sapma (BSS)} = \frac{SS}{\bar{X}} \times 100$$

SS: Standart Sapma

$\bar{X}$: Aritmetik ortalama

% Bağıl Hata Hesaplanması

$$\% \text{ Bağıl Hata (\%BH)} = \frac{(\text{Olması gereken miktar} - \text{Bulunan miktar})}{\text{Olması gereken miktar}} \times 100$$

Standart Hata Hesaplanması

$$\text{Standart Hata (SH)} = \frac{SS}{\sqrt{n}}$$

SS: Standart sapma

n : Ölçüm sayısı

%Geri Kazanım Hesaplanması

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{\text{Bulunan miktar}}{\text{Olması gereken miktar}} \times 100$$

Evren Ortalaması Güven Aralığının Hesaplanması

$$\mu = \bar{X} \pm S_{\bar{X}} t \quad \text{veya} \quad \bar{X} - S_{\bar{X}} < \mu < \bar{X} + S_{\bar{X}}$$

μ : Evren ortalaması

$\bar{X}$: Örneklem ortalaması

$S_{\bar{x}}$: Standart hata

t : Seçilen yanılma düzeyi (α) ve $n-1$ serbestlik derecesindeki t tablosundaki değer.

EK 2. Tez İçinde Kullanılan İstatistiksel Testler

Korelasyon Katsayısı Önem Kontrolü

Bu test ile bulunan korelasyon katsayısının önemli bir katsayı mı yoksa tesadüfe bağlı bir katsayı mı olduğu anlaşılmaktadır.

Testin yapılışı şu şekildedir:

1. H_0 : Korelasyon katsayısı tesadüfe bağlı bir değerdir ($r=0$).
2. Test istatistiğinin hesaplanması:

$$T = \frac{r}{S_r} \qquad S_r = \sqrt{\frac{1-r^2}{n-2}}$$

T: Test istatistiği,

r: Korelasyon katsayısı,

S_r : Korelasyon katsayısının standart hatası.

3. Yanılma olasılığı $\alpha=0.05$ seçilmiştir.
4. Serbestlik derecesi= $n-2$ (n: Ölçüm sayısı)
5. $\alpha=0.05$ yanılma düzeyinde ve $n-2$ serbestlik derecesindeki tablo t değerine bakılır.
6. Karşılaştırma: Hesapla bulunan t değeri tablo t değerinden büyükse H_0 reddedilir, küçükse kabul edilir.
7. Karar: a) Korelasyon katsayısı önemli bir değerdir, tesadüfen bulunmuş bir değer değildir (t=hesaplanan değer, $p<0.05$).
b) Korelasyon katsayısı önemli bir değer değildir, tesadüfen bulunmuş bir değerdir (t=hesaplanan değer, $p>0.05$)

Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü

1. Kareler toplamı bulunur:

a) Regresyon Kareler Toplamı (RKT):

$$RKT = \frac{\left[\sum xy - \frac{(\sum x)(\sum y)}{n} \right]^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

b) Y Ortalamadan Ayrılış Kareler Toplamı (YOAKT):

$$YOAKT = \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}$$

c) Regresyondan Ayrılış Kareler Toplamı (RAKT) hesaplanır:

$$RAKT = YOAKT - RKT$$

2. Serbestlik dereceleri bulunur:

a) Regresyon Serbestlik Derecesi (RSD) = 1

b) Y Ortalamadan Ayrılış Serbestlik Derecesi (YOASD) = n-1

c) Regresyondan Ayrılış Serbestlik Derecesi (RASD) = YOASD - YSD

3. Kareler ortalamaları bulunur:

a) Regresyon Kareler Ortalaması = RKT / RSD

b) Regresyondan Ayrılış Kareler Ortalaması (RAKO) = RAKT / RASD

4. H_0 = Derişim ile dedektör cevabı arasındaki ilişki doğrusal değildir.

5. Yanılma olasılığı $\alpha=0.05$ seçilmiştir.

6. $F=RKO / RAKO$

7. $p=0.05$ düzeyinde RSD ve RASD serbestlik derecelerindeki tablo F değerleri bulunur.

8. Karşılaştırma: Hesapla bulunan F değeri tablo F değerinden büyükse H_0 hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.

9. Karar: a) Derişim ile dedektör cevabı arasındaki ilişki doğrusaldır

(F =Hesaplanan değer, $p<0.05$).

b) Derişim ile dedektör cevabı arasındaki ilişki doğrusal değildir

(F =Hesaplanan değer, $p>0.05$).

Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi

Aynı örneklerin değişik iki durumdaki ölçüm sonuçları arasında fark olup olmadığının belirlenmesinde $n < 25$ ise uygulanan önemlilik testidir.

H_0 = İki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında fark yoktur.

$\alpha = 0.05$ yanılma düzeyi seçilmiştir.

Test istatistiğinin hesaplanması:

İki yöntemden elde edilen sonuçlar iki sütun şeklinde yanyana yazılır. Sağda yeni bir sütuna satırlar arasındaki farklar $\pm$ işaretleriyle birlikte yazılır. Ardından farklar küçükten büyüğe doğru sıralanır ve sıra no. verilir. Sıra no.ların önüne farklardaki $\pm$ işaretleri yazılır. + ve - işaretli sıra no. grupları arasında işareti sayıca fazla olan grup toplanır. Elde edilen değer, hesapla bulunan T değeridir (T_H).

Ölçüm sayısı (n) serbestlik derecesindeki tablo T değerine bakılır.

Karar:

- a) $T_H > T_t$ ise iki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında fark yoktur (T_H = Hesaplanan T değeri, $p < 0.05$)
- b) $T_H < T_t$ ise iki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında fark vardır (T_H = Hesaplanan T değeri, $p > 0.05$)

Friedman İki Yönlü Varyans Analizi

Tekrarlı ölçümlerde tek yönlü varyans analizinin varsayımları yerine gelmediğinde kullanılan parametrik olmayan bir testtir. Tekrarlı ölçümlerde ölçümler arasında farklılıkların anlamlı olup olmadığı test edilir.

1. Hazırlık işlemleri:

a- Her ölçüm değeri önce ve sonra olarak kolonlara yazılır.

b- X_R^2 değeri hesaplanır.

$$X_R^2 = \frac{12}{n.k.(k+1)} \sum_{j=1}^k (R_j)^2 - 3.n.(k+1)$$

n: Satır sayısı

k: Grup (Sütun) sayısı

R_j : Her bir gruba (sütuna) ait sıra numaraları toplamı

2. Test işlemleri:

a- H_0 : İki ölçüm arasında fark yoktur.

b-Yanılma olasılığı olarak $\alpha=0.05$ seçilmiştir.

c-Tablo X_R^2 değerinin bulunması: $\alpha=0.05$ düzeyinde n ve k'nın değerleri için tablodan bulunur.

d-Karşılaştırma: Tablo X_R^2 değeri hesapla bulunan X_R^2 değerinden küçükse H_0 hipotezi reddedilir. Tablo X_R^2 değeri hesapla bulunan X_R^2 değerinden büyükse H_0 hipotezi kabul edilir.

Tek Yönlü Varyans Analizi

1- Kareler toplamları bulunur.

a- Genel kareler toplamı (GnKT)

$$GnKT = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

b- Gruplar arası kareler toplamı (GAKT)

$$GAKT = \sum \left[\frac{(\sum x_j)^2}{n_j} \right] - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

c- Denekler arası kareler toplamı (DAKT)

$$DAKT = \sum [(Her\ bir\ satır\ toplamı)^2 / Her\ bir\ satırdaki\ ölçüm\ sayısı] - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

d- Etkileşim (hata) kareler toplamı → HKT=GnKT- GAKT- DAKT

2- Serbestlik derecelerinin bulunması

a- Genel serbestlik derecesi → GnSD= $n_j \times k - 1$

b- Gruplar arası serbestlik derecesi → GASD= $k - 1$

c- Denekler arası serbestlik derecesi → DASD= $n_j - 1$

d- Hata serbestlik derecesi → HSD= $(n_j - 1) \times (k - 1)$

3- Kareler ortalamasının bulunması

a- Gruplar arası kareler ortalaması → GAKO= GAKT/GASD

b- Denekler arası serbestlik derecesi → DAKO= DAKT/DASD

c- Hata kareler ortalaması → HKO= HKT/HSD

4- H_0 =Yöntemler arasında fark yoktur.

H_1 =En az bir ölçüm diğerinden farklıdır.

5- Yanılma olasılığı $p=0.05$ olarak seçilmiştir.

6- $F = GAKO / HKO$

7- $\alpha = 0.05$ düzeyinde GSD ve HSD serbestlik derecelerindeki tablo F değerleri bulunur.

8- Karşılaştırma: Hesaplanan değer F (F_H) değeri tablo F (F_T) değerinden büyükse H_0 hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.

9- Karar: Yöntemler arasında fark yoktur ($F =$ Hesaplanan değer, $p > 0.05$) veya yöntemlerden en az biri farklıdır ($F =$ Hesaplanan değer, $p > 0.05$).

Kruskal Wallis Varyans Analizi

Parametrik test varsayımları yerine getirilmediğinde, bir değişken yönünden ikiden fazla bağımsız grup arasında fark olup olmadığının belirlenmesinde kullanılır.

Test işlemleri:

Bütün gruptaki değerler küçükten büyüğe doğru tek dizi halinde sıralanır ve her bir değere sıra numarası verilir. Aynı değerler için ortalama sıra numarası hesaplanıp aynı olan değerlere verilir.

Test istatistiğinin (KW) hesaplanması:

$$KW = \frac{12}{n(n+1)} \left[\sum_{j=1}^k \frac{T_j^2}{n_j} \right] - k(n+1)$$

T_j : j. gruptaki değerlerin sıra numaraları toplamı (her bir grup için);

n_j : j. gruptaki denek sayısı (her bir grup için);

k : Grup sayısı;

n : Toplam denek sayısı.

H_0 = İki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında fark yoktur.

$\alpha=0.05$ yanılma düzeyi için (grup sayısı – 1) serbestlik derecesindeki tablo değerine (KW_T) bakılır.

Karar: $KW_T > KW$ ise H_0 hipotezi kabul edilir.

$KW > KW_T$ ise H_0 hipotezi reddedilir.

ÖZGEÇMİŞ

20.01.1980 yılında Mersin’de doğdum. İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimimi Mersin’de tamamladım. 1998 yılında başladığım Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’nden 2002 yılında mezun olduktan bir dönem sonra Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Programına başladım. 2004 yılında SSK İzmit Bölge Hastanesi’nde göreve başladım halen SSK Ankara Sağlık İşleri İl Müdürlüğü’nde eczacı olarak çalışmaktayım.