

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

**ROSİGLİTAZON VE METFORMİN'İN KAPİLER  
ELEKTROFOREZ VE YÜKSEK BASINÇLI SIVI  
KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMLERİ İLE FARMASÖTİK  
PREPARATLARDAN VE BİYOLOJİK MATERYALDEN  
AYNI ANDA ANALİZİ**

**Yük. Kim. Ceren YARDIMCI**

**Analitik Kimya Programı  
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA**

**2006**

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

**ROSİGLİTAZON VE METFORMİN'İN KAPİLER  
ELEKTROFOREZ VE YÜKSEK BASINÇLI SIVI  
KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMLERİ İLE FARMASÖTİK  
PREPARATLARDAN VE BİYOLOJİK MATERYALDEN AYNI  
ANDA ANALİZİ**

**Yük. Kim. Ceren YARDIMCI**

**Analitik Kimya Programı  
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Nuran ÖZALTIN**

**ANKARA**

**2006**

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne:

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

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Sedef KIR  
Hacettepe Üniversitesi

Danışman: Prof. Dr. Nuran ÖZALTIN  
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Sacide ALTINÖZ  
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Nursabah BAŞÇI  
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Feyyaz ONUR  
Ankara 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 çalışmamı yöneten, bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, her aşamada yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Nuran Özaltın'a,  
Tez izleme komitesinde yer alarak değerli katkılarda bulunan Sayın Prof. Dr. Sedef Kır ve Sayın Prof. Dr. Nursabah Başçı'ya,  
Etken madde ve farmasötik preparatları sağlayan GlaxoSmithKline A.Ş.'ye,  
Biyolojik materyal çalışmalarının hastalara uygulanmasını sağlayan Sayın Prof. Dr. Alper Gürlek'e,  
Analitik Kimya Anabilim Dalı'mızdaki hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma,  
Sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Yardımcı, C., Rosiglitazon ve Metformin'in Kapiler Elektrophorez ve Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Yöntemleri ile Farmasötik Preparatlardan ve Biyolojik Materyalden Aynı Anda Analizi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Programı Doktora Tezi, Ankara, 2006.** Bu çalışmanın amacı, Tip 2 diyabet tedavisinde kombine olarak kullanılan rosiglitazon (ROS) ve metformin'in (MET) farmasötik preparatlardan ve biyolojik materyalden aynı anda analizi için kapiler elektrophorez (CE) ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemleri geliştirmektir. CE yönteminde en iyi sonuçlar, çalışma tamponu olarak 25 mM pH 4.0 asetat tamponu kullanılmasıyla elde edilmiştir. Ayırım, eritilmiş silika kapilerde (80.5 x 75 µm i.ç., 72 cm etkin uzunluk) 25°C'de, 50 mbar basınçla 3 sn süreli hidrodinamik enjeksiyon ve 25 kV potansiyel uygulanarak gerçekleştirilmiştir. ROS, MET ve iç standart olarak kullanılan verapamil 203 nm'de dizi diyot dedektörle saptanmıştır. Farmasötik preparat analizi için geliştirilen HPLC yönteminde fenil kolon (250 x 4.6 mm i.ç., 5 µm) ve asetonitril:10 mM pH 5.5 fosfat tamponu (70:30 h/h) karışımından oluşan hareketli faz kullanılmıştır. Akış hızı 1 mL dk<sup>-1</sup>'dir. Teşhis, UV dedektörle 245 nm'de yapılmış ve iç standart olarak verapamil kullanılmıştır. Validasyon çalışmaları sonucunda geliştirilen yöntemlerin doğru, kesin, duyarlı, seçici, sağlam ve tutarlı olduğu ispatlanmıştır. Geliştirilen ve valide edilen yöntemler yurtdışı piyasalarında bulunan ROS ve MET'i bir arada içeren farmasötik preparatlara uygulanmıştır. Sonuçlar, kaynaklarda bulunan yöntemle yapılan analiz sonuçları ile karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Biyolojik materyal analizi için geliştirilen HPLC yönteminde ise fenil kolonda asetonitril:5 mM pH 5.5 sodyum asetat (75:25 h/h) karışımından oluşan hareketli faz ile başlayan basamaklı gradient elüsyon uygulanmıştır. 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ve UV dedektör (245 nm) kullanılmıştır. İç standart verapamil'dir. Plazma örnekleri asetonitrille protein çöktürme işleminden sonra HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Yöntem valide edildikten sonra ROS ve MET'i birlikte kullanan hastaların kanlarının analizine başarıyla uygulanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Rosiglitazon, metformin, CE, HPLC, validasyon, plazma

**Destekleyen Kurumlar:** H.Ü. B.A.B. Destek Projesi (04D05301001)

H.Ü. B.A.B. Lisansüstü Öğrenim Araştırma Projesi (06T05102005)

## ABSTRACT

**Yardımcı, C., Simultaneous Analysis of Rosiglitazone and Metformin in Pharmaceutical Preparations and Biological Material by Capillary Electrophoresis and High Pressure Liquid Chromatography Methods, Hacettepe University Institute of Health Sciences Analytical Chemistry Program Ph.D. Thesis, Ankara, 2006.** The aim of this study is to develop capillary electrophoresis (CE) and high pressure liquid chromatography (HPLC) methods for the simultaneous determination of ROS and MET used in combination therapy for Type 2 diabetes in pharmaceutical preparations and biological material. The best results in the CE method were obtained using 25 mM pH 4.0 acetate buffer as the background electrolyte. The separation was performed through a fused silica capillary (80.5 x 75  $\mu\text{m}$  i.d., 72 cm effective length) at 25°C with the application of hydrodynamic injection for 3 s at 50 mbar pressure and a potential of 25 kV. ROS, MET and verapamil used as the internal standard were detected by using a diode array detector at 203 nm. Phenyl column (250 x 4.6 mm i.d., 5  $\mu\text{m}$ ) and mobile phase composed of acetonitrile:10 mM pH 5.5 phosphate buffer (70:30 v/v) was used in the HPLC method developed for the analysis of pharmaceutical preparations. Flow rate was 1 mL min<sup>-1</sup>. Detection was carried out by UV detector at 245 nm and verapamil was used as the internal standard. According to the results of validation studies, it was proved that the developed methods were accurate, precise, sensitive, selective, rugged and robust. The developed and validated methods were applied to the combined dosage forms of ROS and MET available in international markets. The results were compared to the results obtained by using the method mentioned in the literature and no statistically significant difference was found. In the HPLC method developed for the analysis of biological material, a step gradient elution was performed on a phenyl column starting with mobile phase composed of acetonitrile:5 mM sodium acetate pH 5.5 (75:25, v/v). 1 mL min<sup>-1</sup> flow rate and UV detector (245 nm) were used. The internal standard was verapamil. Plasma samples were injected to HPLC system after protein precipitation procedure with acetonitrile. The method was successfully applied to the analysis of patients' bloods who were treated with ROS and MET after validation.

**Keywords:** Rosiglitazone, metformin, CE, HPLC, validation, plasma

**Supported by:** H.Ü. B.A.B. Support Project (04D05301001)

H.Ü. B.A.B. Ph. D. Thesis Grant (06T05102005)

## İÇİNDEKİLER

|                                                                  | Sayfa |
|------------------------------------------------------------------|-------|
| ONAY SAYFASI                                                     | iii   |
| TEŞEKKÜR                                                         | iv    |
| ÖZET                                                             | v     |
| ABSTRACT                                                         | vi    |
| İÇİNDEKİLER                                                      | vii   |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ                                   | xi    |
| ŞEKİLLER DİZİNİ                                                  | xiv   |
| TABLolar DİZİNİ                                                  | xvii  |
| 1. GİRİŞ                                                         | 1     |
| 2. GENEL BİLGİLER                                                | 3     |
| 2.1. Oral Antidiyabetik İlaçlar                                  | 3     |
| 2.2. Rosiglitazon                                                | 6     |
| 2.2.1. Rosiglitazon'un Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri          | 6     |
| 2.2.2. Rosiglitazon'un Farmakokinetik Özellikleri                | 6     |
| 2.2.3. Rosiglitazon'un Klinik Kullanımı ve Dozu                  | 7     |
| 2.2.4. Rosiglitazon'un Yan Etkileri ve İlaç Etkileşimleri        | 7     |
| 2.3. Metformin                                                   | 8     |
| 2.3.1. Metformin'in Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri             | 8     |
| 2.3.2. Metformin'in Farmakokinetik Özellikleri                   | 8     |
| 2.3.3. Metformin'in Klinik Kullanımı ve Dozu                     | 9     |
| 2.3.4. Metformin'in Yan Etkileri ve İlaç Etkileşimleri           | 10    |
| 2.4. Rosiglitazon'un Analiz Yöntemleri                           | 10    |
| 2.4.1. Rosiglitazon Analizi için Kromatografik Yöntemler         | 10    |
| 2.4.2. Rosiglitazon Analizi için Kapiler Elektroforez Yöntemleri | 13    |
| 2.4.3. Rosiglitazon Analizi için Spektroskopik Yöntem            | 13    |
| 2.5. Metformin'in Analiz Yöntemleri                              | 14    |
| 2.5.1. Metformin Analizi için Kromatografik Yöntemler            | 14    |
| 2.5.2. Metformin Analizi için Kapiler Elektroforez Yöntemi       | 18    |

|                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.5.3. Metformin Analizi için Spektroskopik Yöntemler                              | 19 |
| 2.6. Rosiglitazon ve Metformin'in Aynı Anda Analizi için Geliştirilen Yöntemler    | 20 |
| 2.6.1. Rosiglitazon ve Metformin'in Aynı Anda Analizi için HPLC Yöntemi            | 20 |
| 2.6.2. Rosiglitazon ve Metformin'in Aynı Anda Analizi için Geliştirilen CE Yöntemi | 20 |
| 2.7. Kapiler Elektrophorez                                                         | 21 |
| 2.7.1 Kapiler Elektrophorez Sistemi                                                | 21 |
| 2.7.2. Kapiler Elektrophorezde Ayırım İlkeleri                                     | 26 |
| 2.7.3. Elektrophoretik Parametrelerin Ayırım Parametreleri Üzerine Etkisi          | 31 |
| 2.7.4. Kapiler Elektrophorez Türleri                                               | 33 |
| 2.8. Kromatografi                                                                  | 35 |
| 2.8.1. Adsorpsiyon Kromatografisi                                                  | 35 |
| 2.8.2. Dağılma (Partisyon) Kromatografisi                                          | 36 |
| 2.8.3. İyon çifti kromatografisi                                                   | 38 |
| 2.8.4. İyon değiştirme kromatografisi                                              | 40 |
| 2.8.5. Eleme Kromatografisi                                                        | 40 |
| 2.8.6. Afinite Kromatografisi                                                      | 41 |
| 2.8.7. Kromatografide Temel Parametreler                                           | 41 |
| 2.8.8. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC)                                 | 51 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM                                                                 | 59 |
| 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler                                                  | 59 |
| 3.2. Kullanılan Cihazlar                                                           | 59 |
| 3.3. Kullanılan Cam Malzemeler ve Diğer Sarf Malzemeleri                           | 60 |
| 3.4. Farmasötik Preparatlar                                                        | 60 |
| 3.5. Kullanılan Standart Maddelerin Saflığının Araştırılması                       | 60 |
| 3.6. Çözeltilerin Hazırlanması                                                     | 61 |
| 3.7. Farmasötik Preparat Çözeltilerinin Hazırlanması                               | 62 |
| 3.8. Sentetik Preparatların Hazırlanması                                           | 63 |
| 3.9. Kullanılan Malzemelerin Temizliği                                             | 63 |
| 3.9.1. Cam Malzemelerin Temizlenmesi                                               | 63 |
| 3.9.2. Kapilerin Temizlenmesi                                                      | 63 |

|                                                                                       |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.9.3. HPLC Kolonunun Temizlenmesi                                                    | 64  |
| 3.10. Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi                                             | 64  |
| 3.10.1. CE Yöntemi ile Yapılan Çalışmalar                                             | 64  |
| 3.10.2. HPLC Yöntemi ile Yapılan Çalışmalar                                           | 65  |
| 3.11. Geliştirilen Yöntemlerin Validasyonu                                            | 65  |
| 3.12. Geliştirilen Yöntemlerin Farmasötik Preparatlara Uygulanması                    | 69  |
| 3.13. Karşılaştırma Yöntemi                                                           | 70  |
| 3.14. Biyolojik Materyal Analizi                                                      | 71  |
| 3.14.1. Ekstraksiyon Yöntemi Seçimi                                                   | 71  |
| 3.14.2. Analiz Yöntemi                                                                | 71  |
| 3.14.3 Biyolojik Materyalden Analiz Yönteminin Validasyonu                            | 72  |
| 3.14.4. Etik Kurul İzni                                                               | 76  |
| 3.14.5. İlaç Uygulama Protokolü                                                       | 76  |
| 4. BULGULAR                                                                           | 77  |
| 4.1. Saflık Kontrolü                                                                  | 77  |
| 4.2. Rosiglitazon, Metformin ve İç Standardın (Verapamil) Dalga Boyu Taraması         | 77  |
| 4.3. CZE Yöntemine Ait Bulgular                                                       | 78  |
| 4.3.1. İç Standart Seçimi                                                             | 78  |
| 4.3.2. Çalışma Tamponuna Ait Parametreler                                             | 78  |
| 4.3.3. Cihaza Ait Parametreler                                                        | 79  |
| 4.3.4. CZE Yönteminin Validasyonu                                                     | 81  |
| 4.3.5. CZE Yöntemi ile Farmasötik Preparatların Analiz Bulguları                      | 92  |
| 4.4. HPLC Yöntemine Ait Bulgular                                                      | 94  |
| 4.4.1. Kromatografik Koşulların Optimizasyonu                                         | 94  |
| 4.4.2. HPLC Yönteminin Validasyonu                                                    | 101 |
| 4.4.3. HPLC Yöntemi ile Farmasötik Preparatların Analiz Bulguları                     | 112 |
| 4.5. Biyolojik Materyalden HPLC Yöntemi ile Analiz Bulguları                          | 114 |
| 4.5.1. Ekstraksiyon Yönteminin Optimizasyonu                                          | 115 |
| 4.5.2. Biyolojik Materyalden HPLC ile Analiz Yönteminin Validasyonu                   | 117 |
| 4.5.3. Biyolojik Materyalden HPLC ile Analiz Yönteminin Gerçek Örneklerle Uygulanması | 127 |

|                                                                                  |     |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5. TARTIŞMA                                                                      | 130 |
| 5.1. CE Yöntemi                                                                  | 130 |
| 5.1.1. CE Yönteminin Optimizasyon Çalışmaları                                    | 130 |
| 5.1.2. CZE Yönteminin Validasyon Çalışmaları                                     | 134 |
| 5.1.3. CZE Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulanması                        | 139 |
| 5.2. HPLC Yöntemi                                                                | 139 |
| 5.2.1. HPLC Yönteminin Optimizasyon Çalışmaları                                  | 139 |
| 5.2.2. HPLC Yönteminin Validasyon Çalışmaları                                    | 142 |
| 5.2.3. HPLC Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulanması                       | 145 |
| 5.3. HPLC Yöntemi ile Biyolojik Materyal Analizi                                 | 146 |
| 5.3.1. Ekstraksiyon Yönteminin Seçimi                                            | 146 |
| 5.3.2. Biyolojik Materyalden HPLC ile Analiz Yönteminin Optimizasyon Çalışmaları | 147 |
| 5.3.3. Biyolojik Materyalden HPLC ile Analiz Yönteminin Validasyon Çalışmaları   | 147 |
| 5.3.4. Yöntemin Gerçek Örneklerle Uygulanması                                    | 150 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER                                                             | 152 |
| KAYNAKLAR                                                                        | 154 |
| EKLER                                                                            | 164 |
| EK 1: Etik Kurul İzni                                                            | 164 |
| EK 2: İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması                                    | 165 |
| EK 3: Tez İçinde Kullanılan İstatistiksel Testler                                | 167 |
| ÖZGEÇMİŞ                                                                         | 172 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|            |                                                 |
|------------|-------------------------------------------------|
| $\bar{X}$  | Aritmetik ortalama                              |
| $\alpha$   | Seçicilik                                       |
| $\mu A$    | Mikroamper                                      |
| $\mu g$    | Mikrogram                                       |
| $\mu L$    | Mikrolitre                                      |
| $\mu m$    | Mikrometre                                      |
| $\mu M$    | Mikromolar                                      |
| AUC        | Plazma derişimi-zaman eğrisi altında kalan alan |
| BSS        | Bağıl standart sapma                            |
| CE         | Kapiler elektroforez                            |
| CGE        | Kapiler jel elektroforez                        |
| CIEF       | Kapiler izoelektrik odaklama                    |
| CITP       | Kapiler izotakoforez                            |
| $CL_T$     | Toplam klerens                                  |
| cm         | Santimetre                                      |
| $C_{maks}$ | Maksimum plazma derişimi                        |
| CZE        | Kapiler zon elektroforez                        |
| dk         | Dakika                                          |
| DAD        | Dizi diyot dedektör                             |
| EOF        | Elektroosmotik akış                             |
| FDA        | <i>Food and Drug Administration</i>             |
| GC         | Gaz kromatografisi                              |
| HPLC       | Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi             |
| HPTLC      | Yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi  |
| IR         | İnfrared (Kızılötesi)                           |
| i.ç.       | iç çap                                          |
| İS         | İç standart                                     |
| $k'$       | Kapasite faktörü                                |
| kg         | Kilogram                                        |

|                  |                                                                 |
|------------------|-----------------------------------------------------------------|
| kV               | Kilovolt                                                        |
| L                | Litre                                                           |
| LC/MS/MS         | Sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrisi                 |
| LOD              | Gözlenebilme sınırı                                             |
| LOQ              | Alt tayin sınırı                                                |
| m                | Metre                                                           |
| M                | Molar                                                           |
| MEKC             | Miseller elektrokinetik kapiler kromatografi                    |
| MET              | Metformin                                                       |
| mg               | Miligram                                                        |
| mL               | Mililitre                                                       |
| mM               | Milimolar                                                       |
| mm               | Milimetre                                                       |
| MIP              | Molekül kalıplanmış polimer                                     |
| N                | Etkinlik (Teorik tabaka sayısı); Normal (Değişim birimi olarak) |
| ng               | Nanogram                                                        |
| nL               | Nanolitre                                                       |
| nm               | Nanometre                                                       |
| NMR              | Nükleer magnetik rezonans                                       |
| A <sub>s</sub>   | Pik asimetri oranı                                              |
| PN               | Pik normalizasyonu                                              |
| PPAR- $\gamma$   | Peroksizom proliferatörünü aktive eden reseptör-gama            |
| r                | Korrelasyon katsayısı                                           |
| R <sup>2</sup>   | Tanımlayıcılık katsayısı                                        |
| R <sub>s</sub>   | Ayırıcılık                                                      |
| ROS              | Rosiglitazon                                                    |
| sn               | Saniye                                                          |
| SDS              | Sodyum dodesil sülfat                                           |
| S/G              | Sinyal/Gürültü                                                  |
| SH               | Standart Hata                                                   |
| SS               | Standart Sapma                                                  |
| t <sub>1/2</sub> | Plazma yarılanma ömrü                                           |

|            |                                                       |
|------------|-------------------------------------------------------|
| $t_{maks}$ | Maksimum plazma derişimine ulaşmak için gereken zaman |
| $t_R$      | Alıkonma zamanı                                       |
| UV         | Ultraviyole (Morötesi)                                |
| UV/GB      | Ultraviyole/Görünür Bölge                             |
| V          | Volt                                                  |
| $V_d$      | Dağılım hacmi                                         |
| VER        | Verapamil                                             |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                     | <b>Sayfa</b> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 2.1. Rosiglitazon maleat'ın kimyasal yapısı                                                                                                                                                         | 6            |
| 2.2. Metformin hidroklorür'ün kimyasal yapısı                                                                                                                                                       | 8            |
| 2.3. Kapiler elektroforez cihazının şematik gösterimi                                                                                                                                               | 22           |
| 2.4. Kapiler elektroforezde enjeksiyon sistemleri<br>a, b, c) Hidrodinamik enjeksiyon, d) Elektrokinetik enjeksiyon.                                                                                | 23           |
| 2.5. Eritilmiş silika kapilerin boyuna kesiti                                                                                                                                                       | 24           |
| 2.6. Kapiler içinde elektroosmotik akışın gösterimi                                                                                                                                                 | 26           |
| 2.7. Voltaja karşı akım (Ohm Yasası) grafiği                                                                                                                                                        | 28           |
| 2.8. Elektroforetik ve elektroosmotik hızların göç zamanı<br>üzerine etkisi (EOF: Elektroosmotik akış, $\mu_{EP}$ : Elektroforetik<br>hareketlilik, $\mu_{göz}$ : Gözlenen hareketlilik, t : Zaman) | 31           |
| 2.9. Kapiler zon elektroforezde numune zonlarının ayırımı                                                                                                                                           | 34           |
| 2.10. Kapiler zon elektroforezde ayırım                                                                                                                                                             | 34           |
| 2.11. İyon çifti oluşum modeli                                                                                                                                                                      | 38           |
| 2.12. Dinamik iyon değiştirme modeli                                                                                                                                                                | 39           |
| 2.13. İyon etkileşim modeli                                                                                                                                                                         | 39           |
| 2.14. Kapasite faktörünün hesaplanması                                                                                                                                                              | 43           |
| 2.15. Van Deemter eğrisi                                                                                                                                                                            | 46           |
| 2.16. Seçiciliğin ayırıcılık üzerine etkisi                                                                                                                                                         | 47           |
| 2.17. Kapasite faktörünün ayırıcılık üzerine etkisi                                                                                                                                                 | 48           |
| 2.18. Kapasite faktörünün, etkinliğin ve seçiciliğin<br>kromatogram üzerine etkisi                                                                                                                  | 48           |
| 2.19. Temel üç izoterm şekilleri ile alıkonma zamanı<br>ve pik şekline etkileri                                                                                                                     | 49           |
| 2.20. Pik asimetri oranının hesaplanması                                                                                                                                                            | 50           |
| 2.21. HPLC cihazının şematik gösterimi                                                                                                                                                              | 52           |

|       |                                                                                                                                                   |     |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.22. | Bağlı faz dolgu maddelerinin elde edilmesi                                                                                                        | 55  |
|       | a)Yüzey silanolünün klorodimetil silanla reaksiyonu,                                                                                              |     |
|       | b)Yüzey silanollerinin trifonksiyonel klorosilanla reaksiyonu,                                                                                    |     |
|       | c) Yüzey silanollerinin trifonksiyonel alkoksisilanla reaksiyonu                                                                                  |     |
| 4.1.  | ROS, MET ve VER'in UV spektrumları                                                                                                                | 77  |
| 4.2.  | Çalışma tamponu pH'ının göç zamanı ve ayırıcılık üzerine etkisi.                                                                                  | 78  |
| 4.3.  | Çalışma tamponu derişiminin göç zamanı ve ayırıcılık üzerine etkisi.                                                                              | 79  |
| 4.4.  | Çalışma tamponuna uygulanan voltaja karşı akım ilişkisi                                                                                           | 79  |
| 4.5.  | ROS'un CZE yöntemi ile analizinde elde edilen kalibrasyon eğrisi                                                                                  | 82  |
| 4.6.  | MET'in CZE yöntemi ile analizinde elde edilen kalibrasyon eğrisi                                                                                  | 83  |
| 4.7.  | Geliştirilen CZE yöntemi ile elde edilen elektroferogramlar.                                                                                      | 90  |
|       | a) Plasebo, b) Sentetik preparat ve İS,                                                                                                           |     |
|       | c) Standart ROS, MET ve İS (VER), d) Farmasötik preparat (Avandamet® tablet) ve İS.                                                               |     |
| 4.8.  | Hareketli faz asetonitril oranı ile kapasite faktörü ve ayırıcılığın değışimi [k' (R): ROS'un kapasite faktörü, k' (M): MET'in kapasite faktörü]. | 96  |
| 4.9.  | Hareketli faz pH'ı ile kapasite faktörü ve ayırıcılığın değışimi [k' (R): ROS'un kapasite faktörü, k' (M): MET'in kapasite faktörü].              | 97  |
| 4.10. | Hareketli faz tampon derişimi ile kapasite faktörü ve ayırıcılığın değışimi [k' (R): ROS'un kapasite faktörü, k' (M): MET'in kapasite faktörü].   | 99  |
| 4.11. | Farmasötik preparat analizi için geliştirilen HPLC yönteminde ROS için elde edilen kalibrasyon eğrisi                                             | 102 |
| 4.12. | Farmasötik preparat analizi için geliştirilen HPLC yönteminde MET için elde edilen kalibrasyon eğrisi                                             | 102 |

|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |     |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.13. | Geliştirilen HPLC yöntemi ile elde edilen kromatogramlar<br>a) Plasebo, b) Sentetik preparat ve İS, c) Farmasötik preparat<br>(Avandamet® tablet) ve İS, d) Standart ROS, MET ve İS (VER)                                                                                                                                                                                             | 109 |
| 4.14. | Biyolojik materyal analizi için geliştirilen HPLC<br>yönteminde ROS için elde edilen kalibrasyon eğrisi                                                                                                                                                                                                                                                                               | 118 |
| 4.15. | Biyolojik materyal analizi için geliştirilen HPLC<br>yönteminde MET için elde edilen kalibrasyon eğrisi                                                                                                                                                                                                                                                                               | 118 |
| 4.16. | Biyolojik materyal analizi için geliştirilen HPLC<br>yöntemi ile elde edilen kromatogramlar a) Boş plazma,<br>b) Plazma üzerine eklenmiş ROS (500.0 ng mL <sup>-1</sup> ),<br>MET (500.0 ng mL <sup>-1</sup> ), ve İS (VER) (7.7 µg mL <sup>-1</sup> ),<br>c) Hasta plazması (Bulunan ROS derişimi: 300.0 ng mL <sup>-1</sup> ,<br>Bulunan MET derişimi: 1400.0 ng mL <sup>-1</sup> ) | 125 |

## TABLOLAR DİZİNİ

|                                                                                                                                                       | Sayfa |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 2.1. ROS'un farmakokinetik özelliklerinin özeti                                                                                                       | 7     |
| 2.2. MET'in farmakokinetik özelliklerinin özeti                                                                                                       | 9     |
| 2.3. Ters faz ve normal faz sıvı kromatografilerinin karşılaştırılması                                                                                | 37    |
| 3.1. Geliştirilen HPLC yönteminde biyolojik materyal analizi için uygulanan basamaklı gradient elüsyon sistemi                                        | 72    |
| 4.1. Geliştirilen CZE yöntemi ile elde edilen ROS, MET ve VER pikleri ile ilgili bilgiler (ROS, MET ve VER derişimi: 20.0 µg mL <sup>-1</sup> , n=10) | 80    |
| 4.2. Elektroferogramlardan elde edilen verilerin istatistiksel değerdendirmesi (ROS, MET ve VER derişimi 20.0 µg mL <sup>-1</sup> , n=10)             | 81    |
| 4.3. ROS ve MET'in CZE yöntemi ile elde edilen kararlılık bulguları (n=3)                                                                             | 81    |
| 4.4. Geliştirilen CZE yöntemine ait kalibrasyon eğrilerinin özellikleri (n=10)                                                                        | 83    |
| 4.5. Geliştirilen CZE yöntemine ait kalibrasyon eğrilerinin doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü                                                      | 84    |
| 4.6. Geliştirilen CZE yöntemine ait kalibrasyon eğrilerinin korrelasyon katsayılarının önem kontrolü                                                  | 84    |
| 4.7. Geliştirilen CZE yöntemi ile ROS analizi için elde edilen gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk bulguları                                 | 86    |
| 4.8. Geliştirilen CZE yöntemi ile MET analizi için elde edilen gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk bulguları                                 | 87    |
| 4.9. Geliştirilen CZE yönteminin tekrarlanabilirliğine ait analiz bulguları (Eklenen ROS ve MET derişimi: 10.0 µg mL <sup>-1</sup> , n=10)            | 88    |
| 4.10. Geliştirilen CZE yönteminde ROS ve MET için geri kazanım verileri (n=6)                                                                         | 89    |
| 4.11. Geliştirilen CZE yönteminin sağlamlık bulguları (Eklenen ROS derişimi: 6.0 µg mL <sup>-1</sup> , MET derişimi: 600.0 µg mL <sup>-1</sup> , n=3) | 91    |

|       |                                                                                                                                                                          |     |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.12. | Geliştirilen CZE yönteminin tutarlılık bulguları<br>(Eklenen ROS derişimi: $6.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , MET derişimi: $600.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,<br>$n=6$ )            | 92  |
| 4.13. | Geliştirilen CZE yöntemi ve karşılaştırma (HPLC)<br>yöntemi ile elde edilen farmasötik preparat analiz sonuçları ( $n=6$ )                                               | 93  |
| 4.14. | Hareketli faz asetonitril oranının kromatografik<br>parametrelere etkisi                                                                                                 | 95  |
| 4.15. | Hareketli faz tampon pH'ının kromatografik<br>parametrelere etkisi                                                                                                       | 97  |
| 4.16. | Hareketli faz tampon derişiminin kromatografik<br>parametrelere etkisi                                                                                                   | 98  |
| 4.17. | Geliştirilen HPLC yönteminde ROS ve MET için<br>elde edilen kromatografik parametreler ( $n=10$ )                                                                        | 100 |
| 4.18. | ROS ve MET'in HPLC yöntemi ile elde edilen<br>kararlılık bulguları ( $n=3$ )                                                                                             | 101 |
| 4.19. | Farmasötik preparat analizi için geliştirilen HPLC<br>yöntemine ait kalibrasyon eğrilerinin özellikleri ( $n=10$ )                                                       | 103 |
| 4.20. | Farmasötik preparat analizi için geliştirilen HPLC<br>yöntemine ait kalibrasyon eğrilerinin<br>doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü                                      | 103 |
| 4.21. | Farmasötik preparat analizi için geliştirilen HPLC<br>yöntemine ait kalibrasyon eğrilerinin korrelasyon<br>katsayılarının önem kontrolü                                  | 104 |
| 4.22. | Farmasötik preparat analizi için geliştirilen HPLC<br>yöntemi ile ROS için elde edilen gün içi ve günler arası<br>kesinlik ve doğruluk bulguları                         | 105 |
| 4.23. | Farmasötik preparat analizi için geliştirilen HPLC<br>yöntemi ile MET için elde edilen gün içi ve günler arası<br>kesinlik ve doğruluk bulguları                         | 106 |
| 4.24. | Farmasötik preparat analizi için geliştirilen HPLC<br>yönteminin tekrarlanabilirliğine ait analiz bulguları<br>(Eklenen ROS ve MET derişimi: $2.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) | 107 |

|       |                                                                                                                                                                                          |     |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.25. | Farmasötik preparat analizi için geliştirilen HPLC yönteminde ROS ve MET için geri kazanım verileri (n=6)                                                                                | 108 |
| 4.26. | Farmasötik preparat analizi için geliştirilen HPLC yöntemine ait sağlamlık bulguları (Eklenen ROS derişimi: $0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ , MET derişimi: $30.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , n=3)  | 111 |
| 4.27. | Farmasötik preparat analizi için geliştirilen HPLC yöntemine ait tutarlılık bulguları (Eklenen ROS derişimi: $0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ , MET derişimi: $30.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , n=6) | 112 |
| 4.28. | Geliştirilen HPLC yöntemi ile yapılan farmasötik preparat analiz sonuçları ve diğer yöntemlerle karşılaştırılması (n=6)                                                                  | 113 |
| 4.29. | Biyolojik materyal analizi için geliştirilen HPLC yönteminde ROS ve MET için elde edilen kromatografik parametreler (n=10)                                                               | 115 |
| 4.30. | ROS ve MET'in plazmadan analizi için denenen ekstraksiyon yöntemleri                                                                                                                     | 116 |
| 4.31. | Biyolojik materyal analizi için geliştirilen HPLC yönteminde plazmaya eklenmiş ROS ve MET'in kararlılık bulguları (n=3)                                                                  | 117 |
| 4.32. | Biyolojik materyal analizi için geliştirilen HPLC yöntemine ait kalibrasyon eğrilerinin özellikleri (n=10)                                                                               | 119 |
| 4.33. | Biyolojik materyal analizi için geliştirilen HPLC yöntemine ait kalibrasyon eğrilerinin doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü                                                             | 119 |
| 4.34. | Biyolojik materyal analizi için geliştirilen HPLC yöntemine ait kalibrasyon eğrilerinin korrelasyon katsayılarının önem kontrolü                                                         | 120 |
| 4.35. | Biyolojik materyal analizi için geliştirilen HPLC yöntemi ile ROS için elde edilen gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk bulguları                                                | 121 |
| 4.36. | Biyolojik materyal analizi için geliştirilen HPLC yöntemi ile MET için elde edilen gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk bulguları                                                | 122 |

|       |                                                                                                                                                                                                       |     |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.37. | Biyolojik materyal analizi için geliştirilen HPLC yönteminin tekrarlanabilirliğine ait analiz bulguları (Eklenen ROS derişimi: 250.0 ng mL <sup>-1</sup> , MET derişimi: 1000.0 ng mL <sup>-1</sup> ) | 123 |
| 4.38  | Biyolojik materyal analizi için geliştirilen HPLC yönteminde ROS ve MET için geri kazanım bulguları (n=3)                                                                                             | 124 |
| 4.39. | Biyolojik materyal analizi için geliştirilen HPLC yönteminin sağlamlık bulguları (Eklenen ROS derişimi: 250.0 ng mL <sup>-1</sup> , MET derişimi: 1000.0 ng mL <sup>-1</sup> , n=3)                   | 126 |
| 4.40. | Biyolojik materyal analizi için geliştirilen HPLC yöntemine ait tutarlılık bulguları (Eklenen ROS derişimi: 250.0 ng mL <sup>-1</sup> , MET derişimi: 1000.0 ng mL <sup>-1</sup> , n=6)               | 127 |
| 4.41. | ROS ve MET etken maddeli ilaçları kullanan diyabet hastalarından alınan kan örneklerinin geliştirilen HPLC yöntemi ile analizinde bulunan sonuçlar (n=3)                                              | 129 |

## 1. GİRİŞ

Tip 2 diyabet son derece ciddi ve ilerleyici bir hastalık olmasının yanı sıra, bu hastalığın seyrinde görülebilen komplikasyonlarıyla büyük bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Tip 2 diyabet patogeneğinde insülin direnci ve ilerleyici beta hücre disfonksiyonu yer almaktadır (1). Antidiyabetik tedavinin ana hedefi plazma glukozunu düşürmektir.

Tip 2 diyabetli hastaların çoğu optimum glisemik kontrolün sağlanması için birden fazla antihiperglisemik ilaçla tedaviye gereksinim duymaktadır. Tiazolidindion sınıfının bir elemanı olan rosiglitazon maleat (ROS) ve biguanidin türevi olan metformin hidroklorür (MET) farklı etki mekanizmalarına sahip antihiperglisemik ilaçlardır. ROS insülin duyarlılığını artırırken, MET hepatik glukoz oluşumunu azaltır (2). Bu ilaçların kombine kullanımının tedavide daha etkili olduğu gösterilmiştir (2-5). Bu iki ilacı birarada içeren farmasötik preparatlar da Ekim 2002’de FDA onayı alarak yurtdışında piyasaya sürülmüştür.

Kaynaklarda, ROS’un farmasötik preparatlardan ve biyolojik materyalden analizi için kromatografik (6-19), kapiler elektroforetik (12,20) ve spektroskopik (21) yöntemler bulunmaktadır. Aynı şekilde MET’in de farmasötik preparatlardan ve biyolojik materyalden analizi için kromatografi (22-45), kapiler elektroforez (CE) (46) ve spektroskopi (47-52) yöntemleri kaynaklarda bildirilmiştir. Bu iki ilacın farmasötik preparatlardan aynı anda tayini için sadece yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi (53) bulunmaktadır. Biyolojik materyalden aynı anda analizlerine ise rastlanmamıştır. Kaynaklardaki bu boşluk göz önünde bulundurularak, ROS ve MET’in farmasötik preparatlardan ve biyolojik materyalden aynı anda analizi için yöntem geliştirilmesi planlanmıştır.

Bu çalışmada, son yıllarda yüksek etkinlik, yüksek ayırıcılık, hızlı ve kolay uygulanabilir olma gibi özellikleri nedeniyle ilaç analizlerinde sıklıkla kullanılmakta olan CE ve HPLC yöntemleri ile, ROS ve MET’in ikili karışım halindeki farmasötik preparatlarından aynı anda analizi amaçlanmıştır. Bu amaçla, öncelikle ROS ve MET’in en uygun ayırımının sağlanması için kapiler elektroforetik ve kromatografik koşullar optimize edilmiştir. Geliştirilen yöntemlerin geçerliliğinin kanıtlanması için kararlılık, doğrusalılık, duyarlılık, doğruluk, kesinlik, seçicilik, sağlamlık ve tutarlılık gibi validasyon parametreleri değerlendirilmiştir. Valide edilen yöntemler yurtdışı

piyasalarında bulunan ROS ve MET'i birarada içeren farmasötik preparatlara uygulanmış ve elde edilen sonuçlar kaynaklarda bulunan yöntemle (53) karşılaştırılarak aralarında fark olup olmadığı istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında, ROS ve MET'in plazmadan aynı anda tayini için HPLC yöntemi geliştirilerek validasyon parametreleri değerlendirilmiştir. Geliştirilen ve valide edilen yöntem ile, ROS ve MET etken maddeli ilaçları birlikte kullanan diyabet hastalarının kanları analiz edilerek yöntemin gerçek örneklerle uygulanabilirliği gösterilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Oral Antidiyabetik İlaçlar (54)

Diyabet, başta karbonhidratlar olmak üzere protein ve yağ metabolizmasını ilgilendiren bir metabolizma hastalığıdır. Diyabet hastalarındaki temel metabolik bozukluk, kan yoluyla taşınan glikozun hücrelerin içine girememesidir. Normal koşullarda besinlerden elde edilen veya karaciğerdeki depolardan kana salınan glikoz, pankreas tarafından salgılanan insülin hormonunun yardımıyla hücre içine girer ve orada yakılarak enerjiye dönüşür. Diyabet, hipergliseminin ve lipid ve protein metabolizmasındaki bozukluğun eşlik ettiği göreceli veya mutlak insülin eksikliği sendromudur.

Nedenlerine göre bir çok diyabet tipi olmakla birlikte olguların büyük kısmını kapsayan Tip 1 ve Tip 2 olmak üzere iki ana tipi vardır. Tip 1 diyabet, genellikle çocukluk çağında başlayan bir hastalıktır. Pankreasın beta hücrelerini yabancı cisim olarak tanımlayan vücudun savunma mekanizması, bu hücreleri öldürür. Dolayısıyla pankreas insülin üretemez hale gelir. Mutlaka insülin enjeksiyonuna ihtiyaç vardır. Bu nedenle Tip 1 diyabet insüline bağımlı diyabet olarak da isimlendirilmektedir. Tip 2 diyabet, genellikle 45 yaş sonrasında ortaya çıkan kronik bir hastalıktır. Tip 2 diyabette insülin salgılanmasındaki yetersizlikten çok dokulardaki insülin reseptörlerindeki direnç sonucunda glikoz metabolizması bozulmaktadır. Tip 2 diyabetliler hastalıklarının başlangıcında ve genelde uzun süre insüline ihtiyaç duymadan yaşamlarını sürdürebildiklerinden, bu hastalık insüline bağımlı olmayan diyabet olarak da tanımlanmaktadır.

Günümüzde plazma glikoz düzeylerini düşüren farklı oral antidiyabetik ilaç sınıfları vardır:

**a) Sülfonilüre Türevi İlaçlar:** Tedavinin başlangıcında pankreastan insülin salgılanmasını arttırmak suretiyle terapötik etki oluştururlar. Bu etkiye toleransın olduğu ileri dönemde ise hedef hücrelerin insüline duyarlılığını arttırmak suretiyle antidiyabetik etkinlik oluşturabilirler. Aşırı dozda hipoglisemi yapabilirler. Tolbutamid, asetoheksamid, tolazamid, klorpropamid birinci kuşak, gliburid (glibenklamid), glipizid, glibornurid, gliklazid, sodyum glimidin, glimepirid, glikuidon ikinci kuşak sülfonil ürelerdir.

**b) Sülfonilüre Benzerleri (Glinidler):** Bu ilaçların farmakolojik etki profili, etkisinin kısa sürmesi dışında sülfonilürelerinkine benzer. Bunlardan ilki repaglinid, diğeri nategliniddir.

**c) Biguanid Bileşikleri:** Bu ilaçlar moleküllerinde birbiriyle birleşmiş iki guanidin grubu içerirler. İlk bulunan ilaç fenformin (feniletilbiguanid)'dir. Biguanid türevleri diyabetli hastalarda hiperglisemiye azaltırlar, fakat hipoglisemi yapmazlar. Bu gruptaki halen kullanılan tek ilaç olan MET, sülfonilürelerle veya glitazonlarla kombine kullanılır.

Etki mekanizmaları, sülfonilürelerinkinden farklıdır. Beta hücrelerini etkilemezler ve insülin salgısını arttırmazlar. Etkilerinin pankreas dışındaki yapılar üzerinde olduğu sanılmaktadır. İnsülin düzeyini azaltırlar. Etki mekanizmaları kesin olarak bilinmemektedir. Başlıca üç mekanizma ileri sürülmüştür:

- i. Periferik dokularda insülinin etkinliğini reseptör sonrası düzeyde arttırırlar. Anaerobik glikolizi hızlandırmak suretiyle glikoz kullanımını arttırırlar. Bunun sonucu laktik asit oluşumunu hızlandırır.
- ii. İnce bağırsaktan glikoz absorpsiyonunu azaltırlarsa da bunun pratik önemi şüphelidir.
- iii. Glikoneojenezi azaltarak karaciğerden glikoz çıkışını azaltırlar; bu etkinin insülini potansiyalize etmeleri sonucu meydana gelmesi olasılığı vardır.

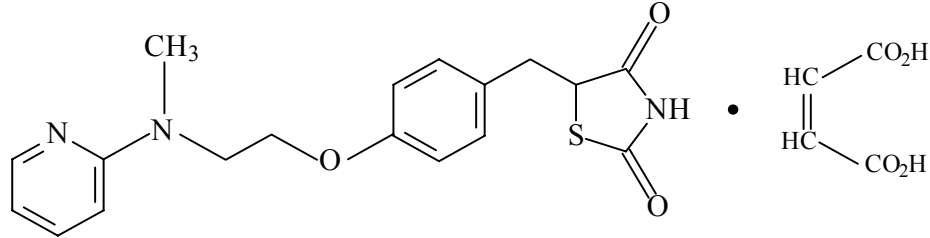
**d) Glitazonlar:** Çeşitli tiazolidindion türevi ilaçların insülin direnci gelişmiş durumlarda hedef hücrelerin insüline duyarlılığını arttırdıkları ve direnci kısmen kırdıkları bulunmuştur. Bunlara “insüline duyarlılığı arttırıcı ilaçlar” adı da verilir. Klinik kullanıma giren ilk üye olan troglitazon, 1990’ların ortasında kullanılmaya başlanmıştır. Seyrek de olsa, ölümcül olacak veya karaciğer transplantasyonu gerektirecek kadar ağır karaciğer nekrozu yaptığı için Mart 2000’de piyasadan çekilmiştir. Troglitazon’un piyasadan kaldırılmasından sonra çıkan ROS ve pioglitazon, hepatotoksik etki potansiyellerinin düşük olması nedeniyle bu ilacın yerini almıştır. Hiperinsülineminin ve insülin direncinin eşlik etmesi nedeniyle sadece Tip 2 diyabette kullanılırlar. Diyet ve egzersizle kontrol altına alınmayan hafif olgularda tek başlarına kullanılabilir. Her ikisi de MET ile birlikte kullanılabilir. Kombine tedavi ile glisemide daha fazla bir düşme meydana gelir. ROS’un sülfonilüreler veya insülinle birlikte kullanılması tavsiye edilmemektedir.

Bu grup ilaçlar, biguanidler gibi, sadece antihiperglisemik etki yaparlar, hipoglisemi yapmazlar. Normal bireylerde insüline duyarlılığı ve onun etkinliğini arttıramazlar; glisemiye değıştirmezler. İnsülin salgılanmasını arttırmazlar.

Etki mekanizması tam olarak henüz aydınlatılmamıştır. Etkili olabilmeleri için ortamda insülin bulunmalı ve ona direnç gelişmiş olmalıdır. Tiazolidindionlar, insülin hedef hücrelerinde, özellikle yağ dokusu hücreleri adipositlerde “peroksizom proliferatörünü aktive eden reseptör-gama (PPAR $\gamma$ )” adlı aslında bir nükleer transkripsiyon faktörü olan nükleer reseptörlere bağlanarak onu aktive ederler; başka bir deyişle bu reseptörlerin agonistidirler. Yağ doku hücresinde bu reseptörlerin bilinen bir doğal agonisti kandan depolanmak üzere hücreye giren serbest uzun zincirli doymuş veya doymamış yağ asitleridir. Yağ asitleri, çizgili kas hücresine de girerler, orada depo edilmeyip yakıt olarak kullanılırlar, böylece enerji oluştururlar. PPAR $\gamma$  çizgili kasta da bulunur. PPAR $\gamma$ , çekirdekte retinoid X-reseptörü ile etkileşir, onu stabilize eder ve onun genler üzerindeki etkinliğini güçlendirir. Bu etkileşme sonucu, gen transkripsiyonunu körükleyen kofaktörler, özgül genlerin düzenleyici bölgesinde toplanır. Bu olay lipid ve karbonhidrat metabolizmasının düzenlenmesinde rol alan genlerin, insülinin başlattığı sinyalleme kaskadı tarafından transkripsiyonunu hızlandırır. PPAR $\gamma$ , adipositlerde yoğun şekilde üretilir; ancak, iskelet kası hücresindeki miktarı azdır. Bu nedenle, tiazolidindionların ana etki yerinin yağ dokusu olduğu sanılmaktadır. PPAR $\gamma$  etkinliğinin artması yağ depolanmasını artırır ve şişmanlamaya yol açar. Bu durumda gelişecek olan insülin direncinin belirli bir kilo düzeyinden sonra tiazolidindionların terapötik etkisini tersine çevirmesi beklenir.

## 2.2. Rosiglitazon

### 2.2.1. Rosiglitazon'un Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri



Şekil 2.1. Rosiglitazon maleat'ın kimyasal yapısı.

ROS'un kimyasal adı  $(\pm)$ -5-[[4-[2-(metil-2-piridinilamino)etoksi]fenil]metil]-2,4-tiazolidindion (Z)-2-butendioat (1:1)'dir. Kapalı formülü  $C_{18}H_{19}N_3O_3S \cdot C_4H_4O_4$  olan ROS'un kimyasal yapısı Şekil 2.1'de verilmiştir. Molekülün tek bir kiral merkezi vardır ve rasemat halinde bulunur. Molekül ağırlığı 473.52'dir.

ROS'un erime noktası 122-123 °C olup pKa değerleri 6.8 ve 6.1'dir. Etanolde ve pH'ı 2.3 olan sulu tampon çözeltisinde kolayca çözünür, çözünürlük pH arttıkça azalır (55).

### 2.2.2. Rosiglitazon'un Farmakokinetik Özellikleri

ROS oral yolla kullanılır ve oral kullanım sonrasındaki farmakokinetik özellikleri Tablo 2.1'de özetlenmiştir (56,57).

ROS'un besinlerle birlikte alımı maksimum plazma derişiminde ( $C_{maks}$ ) yaklaşık % 28 azalmaya neden olurken, bu derişime ulaşma hızını ( $t_{maks}$ ) da 1.75 saate uzatır. Bu değişikliklerin klinik olarak anlamlı olduğu düşünülmediğinden yemeklerle veya aç karnına alınabilir (58).

ROS, % 99.8 oranında plazma proteinlerine, birincil olarak albumine bağlanır. Karaciğerde büyük oranda metabolize olur, idrarda değişmemiş olarak bulunmaz. Sitokrom P450 enzimleri ve onların izoenzimleri tarafından N-demetilasyon ve hidroksilasyon ile metabolize olup daha sonra da sülfat ve glukuronik asitle konjüge edilir. Metabolitler, ana bileşiğe göre daha az etkilidirler ve ROS'un insülin duyarlılığını artırma aktivitesine etki etmezler. Plazma yarılanma

ömrü ( $t_{1/2}$ ) 3-4 saat arasındadır, alınan dozla değişmez. ROS'un toplam dozunun % 64'ü idrarda, % 23'ü dışkıda atılır (57).

Tablo 2.1. ROS'un farmakokinetik özelliklerinin özeti.

| Farmakokinetik Parametre                   | Değer   |
|--------------------------------------------|---------|
| Tam oral biyoyararlanım (%)                | 99      |
| $t_{maks}$ (saat)                          | 0.75-1  |
| $C_{maks}$ (ng mL <sup>-1</sup> ) 4 mg doz | 242-254 |
| AUC (ng saat L <sup>-1</sup> ) 4 mg doz    | 1400    |
| $V_d$ (L)                                  | 17.9    |
| $CL_T$ (L saat <sup>-1</sup> )             | 2.4     |
| $t_{1/2}$ (saat)                           | 3-4     |

$C_{maks}$  : Maksimum plazma derişimi,  $t_{maks}$ :  $C_{maks}$ 'a ulaşmak için gereken zaman, AUC: Plazma derişimi-zaman eğrisinin altında kalan alan,  $V_d$ : Dağılım hacmi,  $CL_T$  : Toplam klerens,  $t_{1/2}$ : Plazma yarılanma ömrü.

### 2.2.3. Rosiglitazon'un Klinik Kullanımı ve Dozu

ROS, diyet ve egzersizin yetersiz kaldığı Tip 2 diyabetli hastalarda glisemik kontrolü düzeltmek için kullanılır. Ayrıca Tip 2 diyabet tedavisinde MET veya sülfonil ürelerin tek başına yetersiz kaldığı durumlarda bu ilaçlarla birlikte verilir.

Başlangıç dozu günde bir kez 4 mg'dır. Ek glisemik kontrol gereken hastalarda doz günde 8 mg'a çıkarılabilir. Yemeklerle veya aç karnına alınabilir (56).

### 2.2.4. Rosiglitazon'un Yan Etkileri ve İlaç Etkileşimleri

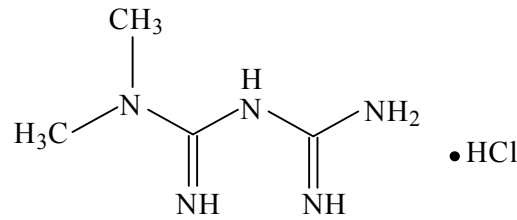
ROS tedavisinde görülen yan etkiler hafif ve seyrek. Yapılan çalışmalar ilacın yan etki profilinin plasebo kullanımı ile benzer olduğunu göstermektedir. En sık görülen yan etkiler üst solunum yolları enfeksiyonları ve baş ağrısıdır, ancak bunların ROS tedavisine bağlı olma ihtimali düşüktür.

Araştırmalar ROS'un akarboz, digoksin, etanol, glibenklamid, MET, nifedipin, oral kontraseptifler, ranitidin ve varfarin ile herhangi bir etkileşime girmediğini göstermiştir (56).

ROS'un gemfibrozil ile birlikte alımı ROS'un plazma derişimi-zaman eğrisinin altında kalan alan (AUC) değerinde artışa neden olurken, rifampisin ile kullanımı AUC değerini düşürür (2).

### 2.3. Metformin

#### 2.3.1. Metformin'in Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri



Şekil 2.2. Metformin hidroklorür'ün kimyasal yapısı.

MET, (N,N-dimetilimidodikarbonimidik diamid hidroklorür) (Şekil 2.2) kimyasal ve farmakolojik olarak diğer oral antidiyabetiklerden farklılık gösterir. Kapalı formülü  $C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$  olup molekül ağırlığı 165.63'dür.  $pK_a$ 'sı 12.4'dür. Suda çözünür; aseton, eter ve kloroformda çözünmez (55).

#### 2.3.2. Metformin'in Farmakokinetik Özellikleri

MET oral yolla kullanılır ve oral kullanım sonrasındaki farmakokinetik özellikleri Tablo 2.2'de özetlenmiştir (59).

MET'in tam oral biyoyararlanımı % 50-60'tır ve oral kullanımdan sonra 6 saat içinde gastrointestinal emilim tamamlanır. Gastrointestinal emilim sonrasında MET hızla dağılır, plazma proteinlerine bağlanmaz. MET'in hiçbir metabolitine veya bileşenine rastlanmamıştır (60). Bu özellik MET'in hepatik metabolizmaya veya safra salgılanmasına uğramadığını göstermektedir.

Tablo 2.2. MET'in farmakokinetik özelliklerinin özeti.

| Farmakokinetik Parametre                    | Değer     |
|---------------------------------------------|-----------|
| Tam oral biyoyararlanım (%)                 | 50-60     |
| $t_{maks}$ (saat)                           | 2.0-3.3   |
| $C_{maks}$ (mg L <sup>-1</sup> ) 850 mg doz | 1.5-2.0   |
| AUC (mg saat L <sup>-1</sup> ) 850 mg doz   | 8.7-9.6   |
| $V_d$ (L)                                   | 63-276    |
| $CL_T$ (L saat <sup>-1</sup> )              | 26.5-42.4 |
| $t_{1/2}$ (saat)                            | 1.5-4.7   |

$C_{maks}$  : Maksimum plazma derişimi,  $t_{maks}$ :  $C_{maks}$ 'a ulaşmak için gereken zaman, AUC: Plazma derişimi-zaman eğrisinin altında kalan alan,  $V_d$ : Dağılım hacmi,  $CL_T$  : Toplam klerens,  $t_{1/2}$ : Plazma yarılanma ömrü.

Böbrek fonksiyon bozukluğu kreatinin klerensi ile bağlantılı olarak MET'in eliminasyon hızını yavaşlatmaktadır. Bu nedenle böbrek yetmezliği olan hastalarda MET kontrendikedir (61).

### 2.3.3. Metformin'in Klinik Kullanımı ve Dozu

Diyet tedavisinin başarılı olmadığı durumlarda ve özellikle Tip 2 diyabetli şişman hastalarda etkili olur. Başlangıç tedavisi olarak tek başına veya diğer antidiyabetik ajanlarla ya da insülinle kombine olarak verilebilir. MET, Tip 1 diyabette insülin tedavisine yardımcı olarak özellikle semptomların iyi kontrol edilemediği hastalarda kullanılabilir.

Başlangıç dozu, sabah ve akşam yemekleriyle beraber günde iki kez 500 mg veya 850 mg'dır. İdame dozu, yemeklerle beraber günde 2-3 kez 500 ve 850 mg'dır. Maksimum doz 2550 mg'dır. Yaşlı hastalarda maksimum doz kullanımı tavsiye edilmez (59).

### 2.3.4. Metformin'in Yan Etkileri ve İlaç Etkileşimleri

MET genellikle iyi tolere edilir. Ancak bazen gastrointestinal sisteme ait hafif şikayetlere yol açabilir. İlacın yemekle alınmasıyla bu şikayetlerin çoğu kaybolursa da nadiren dozun geçici olarak azaltılması gerekebilir. En sık görülen yan etkiler; ağızda metalik tat, epigastrik ağrı, bulantı ve kusmadır. Nadiren diyare ve iştahsızlık ortaya çıkabilir. MET tedavisi sırasında laktik asidoz olduğu bildirilen çok az sayıdaki vakada aslında kontrendikasyon olduğu saptanmıştır (61).

MET'in anti-hiperglisemik etkisi hipoglisemi oluşturma eğilimli herhangi bir ilaç tarafından arttırılabilir (örneğin ACE inhibitörleri) veya hiperglisemi oluşturma eğilimli herhangi bir ilaçla (örneğin glukokortikoidler, beta<sub>2</sub>-agonistler ve diüretikler) azalabilir. Bu olası etkileşimlerin klinik önemi azdır. Ayrıca MET'in furosemid, simetidin ve nifedipin'le birlikte alımında farmakokinetik parametrelerinde değişiklik meydana geldiği belirlenmiştir (61).

### 2.4. Rosiglitazon'un Analiz Yöntemleri

Kaynaklarda, ROS'un tek başına veya diğer ilaçlarla beraber kromatografik, kapiler elektroforetik ve spektroskopik analiz yöntemleri bulunmaktadır.

#### 2.4.1. Rosiglitazon Analizi için Kromatografik Yöntemler

Muxlow ve diğ. (6), klinik çalışmalarda ROS'un nicel analizi için, online dializ ve dializat zenginleştirmesi kullanarak tam otomatik bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Analitlerin biyolojik sıvılardan izolasyonu için geliştirilen "dializatların otomatik ardışık eser zenginleştirmesi (ASTED)" işlemi ile hazırlanan örneklerin kromatografik analizleri C<sub>18</sub> kolonunda (100 x 5 mm, 4 µm) 0.01 M amonyum asetat (pH 8.0):asetonitril (65:35 h/h) hareketli fazı ile floresans dedektör kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yöntemin alt tayin sınırı (LOQ) 3 ng mL<sup>-1</sup>'dir.

Mamidi ve diğ. (7), ROS'un plazmadan analizini, 0.01 M potasyum hidrojenfosfat:metanol:asetonitril (pH 6.5) (40:50:10 h/h/h) karışımından oluşan hareketli fazla, C<sub>18</sub> kolonda floresans dedektörle gerçekleştirmişlerdir. Ekstraksiyon çözücüsü olarak etil asetat kullanılmıştır. LOQ 5 ng mL<sup>-1</sup>'dir. Yöntem sağlıklı bir gönüllüde farmakokinetik çalışmaya uygulanmıştır.

Radhakrishna ve diğ. (8), ROS'un ve safsızlıklarının farmasötik preparatlardan tayini için ters faz HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Analiz C<sub>18</sub>

kolonda, sodyum fosfat tamponu (pH 6.2):asetonitril (50:50 h/h) hareketli fazı ile, 245 nm'de UV dedektörle yapılmıştır. Geliştirilen yöntem safsızlıklar için 0.45-10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , ROS için 180-910  $\mu\text{g mL}^{-1}$  aralığında doğrusaldır.

Mamidi ve diğ. (9), ROS'un plazmadan analizi için, ticari olarak bulunabilen bir iç standart (selekoksib) kullanarak basit bir HPLC yöntemi geliştirmeyi amaçlamışlardır. Ayırım  $\text{C}_{18}$  kolonda (250 x 4.6 mm), 0.01 M potasyum dihidrojen fosfat (pH 6.5):asetonitril:metanol (40:50:10 h/h/h) içeren hareketli faz ile gerçekleştirilmiş, teşhis floresans dedektörle yapılmıştır. Plazma örnekleri etil asetat ile ekstrakte edilmiştir. Doğrusal aralık 5-1000  $\text{ng mL}^{-1}$  arasındadır.

Kolte ve diğ. (10) tarafından ROS'un plazmadan analizi için HPLC yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. ROS ve iç standart pioglitazon'un ayırımı, 0.01 M fosfat tamponu (pH 2.6):metanol (70:30 h/h) karışımından oluşan hareketli fazda,  $\text{C}_{18}$  kolonda, 30 °C'de gerçekleştirilmiş, teşhis için 245 nm'de UV dedektör kullanılmıştır. Doğrusal aralık 5-1250  $\text{ng mL}^{-1}$ 'dir. Plazmadan örnek hazırlama işlemi n-hekzan ve diklorometan kullanılarak sıvı-sıvı ekstraksiyon ile yapılmıştır.

Hruska ve Frye (11)'nin ROS'un plazmadan analizi için geliştirdiği HPLC yönteminde, fenil kolonda hareketli faz olarak 10 mM sodyum asetat:asetonitril (pH 5.0) (60:40 h/h) karışımı kullanılmış, floresans dedektörle tayin yapılmıştır. Örnek hazırlama işlemi asetonitrille protein çöktürmeden ibarettir. LOQ 5  $\text{ng mL}^{-1}$ 'dir. Geliştirilen yöntem farmakokinetik çalışmada kullanılmıştır.

Gomes ve diğ. (12)'nin, ROS'un tabletlerden analizi için geliştirdiği HPLC yönteminde,  $\text{C}_{18}$  kolon (125 x 4 mm) ve 25 mM potasyum dihidrojen fosfat:asetonitril (pH 6.2, 55:45 h/h) hareketli fazı ve 247 nm'de UV dedektör kullanılmıştır.

Pedersen ve diğ. (13)'nin bir çalışmasında, ROS'un plazmadan analizi için floresans dedektörle HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Plazmadan ekstraksiyon için  $\text{C}_4$  katı faz kartuşu kullanılmıştır. Hareketli faz olarak 0.01 M amonyum asetat (pH 7.0):asetonitril (65:35 h/h) kullanılan bu çalışmada, LOQ 1  $\text{ng mL}^{-1}$ 'dir. Geliştirilen yöntemle, sağlıklı bir gönüllüde farmakokinetik çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada ROS'un iki metaboliti ile birlikte plazmada gözlemlendiği iddia edilmekte, ancak metabolitlerin standartları bulunamadığından kanıtlanamamaktadır.

Lin ve diğ. (14), denge dializi uygulayarak ROS ve glipizid'in plazmadaki serbest fraksiyonlarının aynı anda tayini için sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrisi (LC/MS/MS) yöntemi geliştirmişlerdir. Ayırım fenil kolonda asetonitril:su (50:50 h/h) ile 10 mM amonyum asetat ve % 0.02 TFA içeren hareketli fazda gerçekleştirilmiştir. Kütle spektrometresinde pozitif iyon modu, elektrosprey atmosferik basınç iyonlaştırma kaynağı kullanılmıştır. Glipizid ve ROS için oluşturulan kalibrasyon eğrileri 1-2000 ng mL<sup>-1</sup> aralığındadır. Geliştirilen yöntem, ROS ve glipizid için ilaç-ilac protein bağlanma etkileşimi çalışmasına uygulanmıştır.

Ho ve diğ. (15), at plazması ve idrarından 10 antidiyabetik ilacın (glipizid, glibenklamid, glimepirid, gliklazid, tolazamid, tolbutamid, nateglinid, repaglinid, rosiglitazon ve pioglitazon) aynı anda analizi için LC/MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Bu ilaçların yarış atlarında durdurucu olarak kullanıldığı belirtilmiştir. Antidiyabetikler, at plazma ve idrarından asidik pH'da 1,2 dikloroetan kullanılarak sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile elde edilmişlerdir. Hareketli faz, amonyum format (10 mM, pH 3.0) içeren su (çözücü A) ve metanolden (çözücü B) oluşmaktadır. Başlangıçta % 30 çözücü B ile başlayıp 8. dk'da % 100'e çıkan lineer gradient akış uygulanmıştır. Gradient akış, 14. dk'da % 0 çözücü B'ye düşürülmüş, 17. dk'da da başlangıç hareketli faz içeriğine dönmüştür. Ayırım C<sub>8</sub> kolonda gerçekleştirilmiştir. Gözlenebilme sınırı (LOD) 1 ng mL<sup>-1</sup>'dir.

Chou ve diğ. (16)'nin çalışması, ROS'un idrardan analizi için katı faz ekstraksiyon ile kombine bir LC/MS/MS yöntemini içermektedir. ROS'un idrardan ekstraksiyonu, C<sub>8</sub> katı faz ekstraksiyon kartuşunda asetonitrille elüe edilerek gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak asetonitril:10 mM amonyum format (pH 5.0, 72:28 h/h) karışımı kullanılmış, ayırım C<sub>18</sub> kolonda gerçekleştirilmiştir. LOQ 0.1 ng mL<sup>-1</sup>'dir.

Sane ve diğ. (17), yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (HPTLC) ile ROS'un farmasötik preparatlardan tayinini yapmışlardır. Bu yöntemde sabit faz olarak silika jel 60F<sub>254</sub>, hareketli faz olarak etil asetat:toluen:metanol (45:55:1 h/h/h) kullanılmıştır. Teşhis 242 nm'de yapılmış, iç standart olarak pioglitazon kullanılmıştır.

Gumieniczek ve diğ. (18) de ROS'un tabletlerden analizi için HPTLC yöntemi geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Analiz, silika jel 60F<sub>254</sub> tabakalarda,

kloroform:etil asetat:%25 amonyum hidroksit (5:5:0.1 h/h/h) karışımından oluşan hareketli fazla gerçekleştirilmiştir. Teşhis ve nicel analiz, klasik densitometrede 240 ve 254 nm’de yapılmıştır. Tabletten ROS’un ekstraksiyonu için etanol kullanılmıştır. Kalibrasyon eğrileri 0.2-1.0 µg / 10 µL aralığında oluşturulmuştur.

ROS ve gliklazid’in tabletlerden aynı anda analizi, HPTLC yöntemi ile Gayatri ve diğ. (19) tarafından geliştirilmiştir. Yöntemde, sabit faz olarak silika jel 60F<sub>254</sub>, hareketli faz olarak toluen:etil asetat:metanol (85:5:10 h/h/h) karışımı kullanılmıştır. Teşhis 225 nm’de yapılmıştır. Doğrusal aralık ROS için 0.05-0.15 µg / 10 µL, gliklazid için 1.0-3.0 µg / 10 µL’dir.

#### **2.4.2. Rosiglitazon Analizi için Kapiler Elektroferez Yöntemleri**

Jamali ve diğ. (20), ROS, balaglitazon ve pioglitazon’un rasemik karışımlarını ayırmak için kapiler elektroferez (CE) yöntemi geliştirmişlerdir. İki siklodekstrin 25 mM pH 8.0 fosfat tamponunda çözülerek bir çözelti hazırlanmış, çalışma tamponunda bu çözelti ile beraber % 10 asetonitril (h/h) kullanılmıştır. Analiz, 80.5 cm uzunluğunda, 50 µm iç çaplı “uzatılmış ışık yollu” kapilerle 225 nm’de UV dedektörle gerçekleştirilmiştir. Yöntem tabletlere de uygulanmıştır. Örneklerin eşit miktarda (50:50) enantiyomer içerdiği bulunmuştur.

Gomes ve diğ. (12), miseller elektrokinetik kapiler kromatografi (MEKC) yöntemi ile ROS’un tabletlerden analizini gerçekleştirmişlerdir. 30 mM sodyum dodesil sülfat (SDS) içeren 10 mM sodyum tetraborat (pH 9.0) çalışma tamponu olarak kullanılmıştır. 48 cm uzunluğunda, 75 µm iç çaplı kapilerle yapılan analizlerde, 50 mbar 5 sn hidrodinamik enjeksiyon, 20 kV voltaj, 25 °C kapiler sıcaklığı uygulanmıştır. Dizi diyot dedektör 247 nm’ye ayarlanmıştır.

#### **2.4.3. Rosiglitazon Analizi için Spektroskopik Yöntem**

ROS ve pioglitazon’un farmasötik preparatlardan UV spektrofotometrik analizleri, Sankar ve diğ. (21) tarafından yapılmıştır. Geliştirilen yöntemler ROS için 10-60 µg mL<sup>-1</sup>, pioglitazon için 5-30 µg mL<sup>-1</sup> aralığında doğrusaldır. Ölçümler 270 nm ile 318 nm’de gerçekleştirilmiştir.

## 2.5. Metformin'in Analiz Yöntemleri

Kaynaklarda, MET'in tek başına veya diğer ilaçlarla beraber kromatografik, kapiler elektroforetik ve spektroskopik analiz yöntemleri bulunmaktadır.

### 2.5.1. Metformin Analizi için Kromatografik Yöntemler

Lennard ve diğ. (22) tarafından MET'in biyolojik örneklerden analizi için gaz kromatografisi (GC) yöntemi geliştirilmiştir. 210 °C fırın sıcaklığında, taşıyıcı gaz olarak azot ve dedektör olarak elektron yakalayıcı dedektör kullanılmıştır. Yöntem için LOD 2 ng / 200 µL'dir. Asetonitrille ekstraksiyon yapılmıştır. Plazmanın yanı sıra kan, tükürük, karaciğer perfüzyatı ve homojenatı, safra, idrar ve dışkı örnekleriyle çalışılmıştır.

MET'in GC ile farmasötik preparatlardan analizi için Sane ve diğ. (23) tarafından yapılan çalışmada, Chromosorb W üzerine kaplanmış % 3 OV-10 ile doldurulmuş bir cam kolon ve taşıyıcı gaz olarak azot kullanılmıştır. Geri kazanım % 99.60'dır.

Charles ve diğ. (24), katyon değiştirici HPLC yöntemi kullanarak MET'in plazmadan ve idrardan analizini gerçekleştirmiştir. 0.5 mL örneğin trikloroasetik asitle muamelesini gerektiren yöntemde, iç standart olarak 1-propilbiguanid kullanılmıştır. Teşhis, 230 nm'de UV dedektörle yapılmıştır. LOD 0.1 mg L<sup>-1</sup>'dir.

Huupponen ve diğ. (25), MET'in plazmadan analizi için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde, fenil kolon (30 cm x 3.9 mm, 10 µm) ve pH'ı 7'ye birkaç damla dietilaminle ayarlanmış asetonitril:0.01 M potasyum hidrojenfosfat (40:60 h/h) karışımı hareketli faz olarak kullanılmıştır. Analizler UV dedektörle 236 nm'de yapılmıştır. Plazma örnekleri kolona enjekte edilmeden önce Amprep ekstraksiyon kolonlarından geçirilmiştir. LOQ 0.05 mg L<sup>-1</sup>'dir. Geliştirilen yöntem insan ve sıçan plazmalarına uygulanmıştır.

Yuen ve Peh (26)'in MET'in plazmadan analizi için geliştirdiği HPLC yönteminde, siyano kolonda, 0.01 M potasyum dihidrojen ortofosfat (pH 3.5) ve asetonitril (60:40 h/h) karışımından oluşan hareketli faz ile analizler gerçekleştirilmiştir. 234 nm'de UV dedektör kullanılmıştır. Plazma örnekleri perklorik asitle protein çöktürmesinin ardından kolona verilmiştir. LOQ 60 ng mL<sup>-1</sup>'dir. Çalışmada, sağlıklı gönüllülerle farmakokinetik çalışma yapılmıştır.

Vesterqvist ve diğ. (27), plazma örneklerinin ultrafiltrasyonundan sonra katyon değiştirici ekstraksiyon kolonu, kolon değiştirme valfi ve bir katyon değiştirici analitik kolondan oluşan bir HPLC sistemi ile MET'in plazmadan analizini gerçekleştirmişlerdir. 232 nm'de UV dedektör kullanılmıştır. 0.1-40 mg L<sup>-1</sup> arasında doğrusallık elde edilmiştir.

Tache ve diğ. (28)'nin geliştirdiği HPLC yönteminde, MET'in plazmadan ppb seviyesinde tayini gerçekleştirilmiştir. MET'in p-nitrobenzoilklorid ile iki fazlı bir sistemde türevlendirilmesini içeren bu yöntemde, C<sub>18</sub> kolon, su:metanol (65:35 h/h) içeren hareketli faz, 280 nm'de dizi diyot dedektör kullanılmıştır. LOD 10 ng mL<sup>-1</sup>'dir. Geliştirilen yöntemle sağlıklı gönüllülerde farmakokinetik çalışma yapılmıştır.

Vasudevan ve diğ. (29), MET'in gliklazid ve glipizid içeren çok bileşenli dozaj formlarından aynı anda analizi için bir iyon çifti sıvı kromatografisi tekniği geliştirmişlerdir. Yöntemde C<sub>18</sub> kolonda, asetonitril:75 mM kamfor sülfonik asit içeren su (35:65 h/h) hareketli fazı ile 225 nm'de dizi diyot dedektörle analizler gerçekleştirilmiştir.

Cheng ve Chou (30) tarafından geliştirilen yöntemde, MET'in plazmadan analizi UV dedektörlü HPLC ile yapılmıştır. Silika kolonda, 40 °C'de % 25 asetonitril ve % 75 0.03 M amonyum hidrojenfosfat (pH 7) içeren hareketli fazda yapılan analizde LOQ 10 ng mL<sup>-1</sup>'dir. Plazma örneklerinin hazırlanmasında asetonitril ve diklorometan kullanılmaktadır. Geri kazanım değerleri % 76'dan büyüktür.

Zhang ve diğ. (31), geliştirdikleri HPLC yöntemi ile MET'in plazmadan ve anne sütünden analizini gerçekleştirmişlerdir. Asetonitrille proteinlerin çöktürülmesinden sonra bir katyon değiştirici kolona verilen örneklerde MET'in tayini 236 nm'de UV dedektörle yapılmıştır. Hareketli faz, tetrametilamonyum fosfat tamponu (pH 3.7):asetonitril (80:20 h/h) karışımıdır. Plazma ve anne sütünde MET için LOQ 20 µg L<sup>-1</sup>'dir.

Kolte ve diğ. (32), glipizid ile MET'in (kombinasyon 1) ve gliklazid ile MET'in (kombinasyon 2) farmasötik preparatlardan aynı anda analizi için bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri yöntemi miseller sıvı kromatografisi olarak tanımlamışlardır. Bu yöntemde kullanılan hareketli faz 50 mM SDS, 2.5 mM

disodyumhidrojen fosfat ve % 5 izopropil alkol içermektedir, pH 7.2'ye ortofosforik asitle ayarlanmıştır. Analiz bir C<sub>18</sub> kolonda, 226 nm'de UV dedektörle gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, farklı hareketli faz değişkenleri denenerek her birinin MET, glipizid ve gliklazid'e etkisi incelenmiştir. Geliştirilen yöntem, kombinasyon 1 ve kombinasyon 2 tabletlerine uygulanmıştır.

Zarghi ve diğ. (33), MET'in plazmadan analizi için bir iyon çifti HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Ekstraksiyon işlemi olarak asetonitrille protein çöktürme işlemi kullanılmıştır. Analiz, C<sub>18</sub> kolonda, % 40 asetonitril ve % 60 SDS içeren fosfat tamponundan oluşan hareketli fazda, UV dedektörle 235 nm'de yapılmıştır. Doğrusallık aralığı 0.1-4 µg mL<sup>-1</sup>'dir.

AbuRuz ve diğ. (34), MET'in plazmadan analizi için geliştirdikleri iyon çifti HPLC yönteminde, iyon çifti katı faz ekstraksiyon yöntemini uygulamışlardır. Ekstraksiyon işleminde, katı faz kartuşu bir iyon çifti reaktifi (SDS) ile şartlandırıldıktan sonra MET metanolle elüe edilmektedir. Analiz yönteminde, C<sub>18</sub> kolon, 2 mM SDS içeren potasyum dihidrojenfosfat:asetonitril (pH 7.3, 62.5:37.5 h/h) karışımı hareketli faz olarak kullanılmıştır. Plazmadan geri kazanım % 98'dir. LOQ 5.0 ng mL<sup>-1</sup>'dir.

Kolte ve diğ. (35), MET'in pioglitazon ile farmasötik preparatlardan aynı anda analizi için bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Ayırım C<sub>18</sub> kolonda, 5 mM SDS içeren 10 mM disodyum hidrojen fosfat ve asetonitril (66:34 h/h, pH 7.1) karışımından oluşan hareketli fazda gerçekleştirilmiştir. Kolon sıcaklığı 40 °C, UV dedektör dalga boyu 226 nm'dir. İç standart olarak metil paraben kullanılmıştır.

Feng ve diğ. (36), MET'in katı faz ekstraksiyonda tanınması için yeni bir molekül kalıplanmış polimer sentezlemişlerdir. Bu polimerle yapılan bir mikro kolon, mikrometre pompa, enjeksiyon valfi, UV dedektör ve integratörden oluşan geliştirdikleri cihazda, MET'in plazmadan analizini gerçekleştirmişlerdir. Geri kazanım % 94, LOQ 0.1 µg mL<sup>-1</sup>'dir.

MET'in glipizid, gliklazid, glibenklamid ve glimperid ile plazmadan aynı anda analizi için AbuRuz ve diğ. (37) tarafından HPLC yöntemleri geliştirilmiştir. MET'in, glibenklamid ve glimperid ile aynı anda analizi için geliştirilen birinci yöntemde 2 mM SDS, asetonitril (% 37.5) ve potasyum dihidrojen fosfat (% 62.5) içeren hareketli fazın pH'ı 7.3'e ayarlanmıştır. MET'in, glipizid ve gliklazid ile aynı

anda analizi için geliştirilen diğer yöntemde ise aynı hareketli fazın pH'ı 5.3'e ayarlanmıştır. Her iki yöntemde de C<sub>18</sub> kolon kullanılmış, 225 nm'de UV dedektörle analizler gerçekleştirilmiştir. Örnek hazırlama işlemi, AbuRuz ve arkadaşlarının yukarıda anlatılan daha önceki çalışmalarındaki (34) iyon çifti katı faz ekstraksiyon işleminin aynısıdır, tek farkı plazma örnekleri kartuşa verilmeden önce asitlendirilmektedir. Yöntemler bu ilaçları kullanan hastalara başarıyla uygulanmıştır.

Amini ve diğ. (38)'nin, MET'in insan plazmasından analizi için uyguladıkları HPLC yönteminde, silika kolon (250 mm x 4.6 mm, 5 µm), hareketli faz olarak asetonitril:40 mM sodyum dihidrojenfosfat (25:75 h/h) (pH 6) ve UV dedektör kullanılmıştır. Bu yöntemde, ekstraksiyon işlemi olarak, bazik ortamda 1-butanol:n-hekzan (50:50 h/h) karışımı ile sıvı-sıvı ekstraksiyondan sonra seyreltik asetik aside geri ekstraksiyon uygulanmıştır. LOQ 15.6 ng mL<sup>-1</sup>, geri kazanım % 98'dir.

AbuRuz ve diğ. (39), MET'in kurutulmuş kan lekelerinden analizi için bir mikroanalitik yöntem tanımlamışlar ve valide etmişlerdir. Kan leke toplama kartlarının kullanımı, ilaç analizlerinde örnek toplamak için kolay bir yoldur. Yöntemde kullanılan HPLC analiz koşulları, daha önce yaptıkları çalışma (34) ile aynıdır. Analiz için gerekli kan miktarı 10 µL'dir. LOQ 150 ng mL<sup>-1</sup> ve geri kazanım ise en az % 84'dür.

Juan ve diğ. (40), MET'in plazmadan analizinde yeni bir ön kolon türevlendirme işlemi ile ters faz HPLC yöntemi kullanmışlardır. Türevlendirme reaktifi 9,10-antrakınon-2-sülfonil klorür'dür. Türevlendirmeden sonra analiz C<sub>18</sub> kolonda (150 mm x 6 mm, 5 µm), metanol:su (70:30 h/h) hareketli faz karışımında gerçekleştirilmiştir. LOD 0.02 mg L<sup>-1</sup>'dir.

Heinig ve Bucheli (41), geliştirdikleri iki LC/MS/MS yöntemi ile MET'in çeşitli hayvan plazmalarından tayinini gerçekleştirmişlerdir. Birinci yöntem, siyano kolonda (2 mm x 50 mm, 3 µm) yüksek oranda asetonitril içeren gradient elüsyonla normal faz alıkonma mekanizması ile yapılmıştır. İkinci yöntemde, kolon değiştirme uygulanmıştır. Öncelikle analit ve iç standart bir siyano kolonda (2 mm x 10 mm, 5 µm) asetonitril:metanol (95:5 h/h) karışımı ile tutulmuştur. Elüsyon *back-flush* modunda bir analitik kolonda (siyano, 2 mm x 50 mm, 3 µm) gerçekleştirilmiştir. Bu yaklaşımla analiz süresi 1 dakikaya indirilmiştir. LOQ 10 ng mL<sup>-1</sup>'dir.

Chen ve diğ. (42), MET'in insan plazmasından analizi için, bir LC/MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Asetonitrille proteinlerin çöktürülmesinden sonra, C<sub>8</sub> kolonda, asetonitril:su:formik asit (70:30:1 h/h/h) hareketli fazı kullanılarak analiz gerçekleştirilmiştir. LOQ 2 ng mL<sup>-1</sup>'dir. Yöntem, gliburid ve MET'i bir arada içeren tabletleri kullanan hastalara uygulanarak MET'in farmakokinetik özellikleri değerlendirilmiştir.

Wang ve diğ. (43)'nin geliştirdiği LC/MS/MS yönteminde, asetonitril:metanol:10 mM pH 7.0 amonyum asetat (20:20:60 h/h/h) hareketli fazı kullanılarak kısa bir C<sub>18</sub> kolonda (50 mm x 4.6 mm, 5 µm) MET'in insan plazmasından analizi yapılmıştır. Örnek hazırlama, asetik asitle asitlendirme, asetonitrille protein çöktürme ve diklorometanla yıkamayı içermektedir. Yöntem 1-200 ng mL<sup>-1</sup> aralığında doğrusaldır ve farmakokinetik çalışmaya uygulanmıştır.

Diğer bir LC/MS/MS çalışmasında, Koseki ve diğ. (44), MET'in insan plazmasından analizinde katyon değiştirme katı faz ekstraksiyonu kullanmışlardır. Elüe edilen örnekler doğrudan HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Kullanılan HPLC sistemi, katyon değiştirme ve normal faz ayırımını birleştirme temeline dayalı, 2 tane 6 girişli valf, 4 pompa ve bir katyon değiştirici kolon içermektedir. LOQ 10 ng mL<sup>-1</sup>'dir. MET'in tayinine diğer ilaçların etkisi (nateglinid, glibenklamid, statinler, sartanlar, hidroklorotiyazid) plazmaya eklemeler yapılarak araştırılmış, herhangi bir etki gözlenmemiştir. Yöntem farmakokinetik çalışmaya uygulanmıştır.

Zhong ve diğ. (45), MET ve glizlazid'in plazmadan aynı anda analizi için bir LC/MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Ayırım, C<sub>18</sub> kolonda (50 mm, 2.1 mm, 3 µm), metanol:su (% 1 formik asit içeren):asetonitril (30:31:39 h/h/h) karışımından oluşan hareketli faz kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz süresi 2 dk'dır. LOQ MET için 7.8 ng mL<sup>-1</sup>'dir. Örnek hazırlama işlemi, asetonitrille protein çöktürülmesinden sonra potasyum hidrojenfosfat eklenmesini içermektedir. Ekstraksiyon verimi MET için % 77.5-83.6'dır. Yöntem, sağlıklı gönüllülerle farmakokinetik çalışmaya uygulanmıştır.

### 2.5.2. Metformin Analizi için Kapiler Elektroferez Yöntemi

Song ve diğ. (46) MET'in plazmadan tayini için bromotimol mavisi ile iyon çifti ekstraksiyonu temeline dayanan bir CE yöntemi geliştirmiştir. 10 kV elektrokinetik enjeksiyon voltajı 10 sn uygulanarak *field amplified sample stacking* enjeksiyonu kullanılmıştır. Çalışma tamponu 0.1 M fosfat tamponu (pH 2.5),

uygulanan voltaj 20 kV, çalışılan UV dedektör dalga boyu 195 nm'dir. LOQ 0.25 µg mL<sup>-1</sup>'dir.

### 2.5.3. Metformin Analizi için Spektroskopik Yöntemler

El-Khateeb ve diğ. (47), nükleer magnetik rezonans (NMR) spektroskopisi yöntemi ile MET'in tabletlerden analizini yapmışlardır. MET'in döteryum oksitteki NMR sinyali (10–35 mg mL<sup>-1</sup>) kullanılmıştır. 3.06'daki pikin 3-trimetilsililpropionik aside göre integrali iç standart maleik asidin 6.3 ppm'deki piki ile karşılaştırılmıştır. Tablet eksipientleriyle girişim gözlenmemiştir.

MET'in dikloroetanda iyodürle kompleks oluşturma temeline dayalı bir spektroskopik yöntem El-Bardicy ve diğ. (48) tarafından geliştirilmiştir. MET-iyodür kompleksinin mol oranı 1:1'dir. Nicel analiz 295 nm'de 2-12 µg mL<sup>-1</sup> aralığında yapılmıştır. Yöntem tabletlere uygulandığında geri kazanım % 99.97 olarak bulunmuştur.

Hassan ve diğ. (49), potansiyometri, spektrofotometri ve spektrofotometri yöntemleri ile MET'in farmasötik preparatlardan analizini gerçekleştirmişlerdir. Spektrofotometrik yöntem, MET'in krisenkinon ve 1-naftol ile bazik ortamda tepkimesi sonucu floresan bir madde oluşturmaya temeline dayanır. Floresans şiddeti-derişim ilişkisi 20-200 µg mL<sup>-1</sup> aralığında doğrusaldır. Önerilen spektrofotometrik yöntem ise, MET'in bazik ortamda bakır sülfatla tepkimesi sonucu MET-bakır kompleksi oluşumunu içerir. Kompleks sikloheksilaminde çözünmüş ve maksimum absorpsiyon gösterdiği 540 nm'de ölçümler yapılmıştır. 0.5-2 mg mL<sup>-1</sup> aralığında Beer Kanunu geçerlidir. Ayrıca Hassan ve diğ., aynı çalışmada MET'in potansiyometrik titrasyonla farmasötik preparatlardan tayini için PVC matriksinde renkat ve tungstosilikat kompleksi ile oluşturulan bir sensör geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntemlerle elde edilen sonuçlar İngiliz Farmakope'sindeki titrasyon yöntemiyle bulunan sonuçlarla uyumludur.

Ashour ve Kabbani (50), MET'in ilaçlardan analizi için spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntem, asetonitril ortamında iyodürle yük transferi kompleksi oluşma temeline dayanmaktadır. Oluşan kompleksin oluşum sabiti  $3.8 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$  olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntem farmasötik preparatlara uygulanmıştır.

Wang ve diğ. (51), MET'in farmasötik preparatlardan analizini akış-enjeksiyon kemilüminesans yöntemi ile gerçekleştirmişlerdir. Yöntem, fluoresein varlığında bazik ortamda MET ile N-bromosüksinimid arasında kemilüminesans tepkimesi temeline dayanır. Önerilen yöntem otomatik ve sürekli analize uygundur ve farmasötik preparatlardan analize uygulanmıştır.

He ve diğ. (52), MET'in tayini için kemilüminesans yöntemi geliştirmişler ve valide etmişlerdir. Bu yöntemde, MET için kalıplanmış polimer sentezlenmiştir. Bu polimer cam bir tüp içine yerleştirilip içinden MET çözeltisi ya da serum örneği geçirildiğinde molekül seçici olarak adsorplanmaktadır. Daha sonra hidrojen peroksit ve bakır polifosfat, molekül kalıplanmış polimer kolondan (MIP) geçirildiğinde adsorplanmış MET ile tepkimeye girmektedir. MIP kolon, bir kemilüminesans-akış enjeksiyon sisteminde akış hücresinin önüne yerleştirilmektedir. MET'in nicel analizi, kemilüminesans şiddetindeki azalmadan tayin edilmektedir. Yöntem insan serumundan MET tayinine başarıyla uygulanmıştır.

## **2.6. Rosiglitazon ve Metformin'in Aynı Anda Analizi için Geliştirilen Yöntemler**

### **2.6.1. Rosiglitazon ve Metformin'in Aynı Anda Analizi için HPLC Yöntemi**

Kolte ve diğ. (53), MET ve ROS'un aynı anda analizi için geliştirdikleri HPLC yönteminde, C<sub>18</sub> kolon ve asetonitril:5 mM SDS içeren 10 mM disodyum hidrojenfosfat (34:66 h/h, pH 7.1) karışımından oluşan hareketli faz kullanmışlardır. Kolon sıcaklığı 40 °C ve UV dedektör dalga boyu 226 nm'dir. İç standart olarak metil paraben kullanılmıştır. Yöntem, bu iki ilacı bir arada içeren farmasötik preparatlara uygulanmıştır.

### **2.6.2. Rosiglitazon ve Metformin'in Aynı Anda Analizi için Geliştirilen CE Yöntemi**

Bu tez çalışması kapsamında yer alan ROS ve MET'in CE yöntemi ile farmasötik preparatlardan aynı anda analizini içeren çalışma, yayın haline getirilmiştir (62).

## 2.7. Kapiler Elektroforez

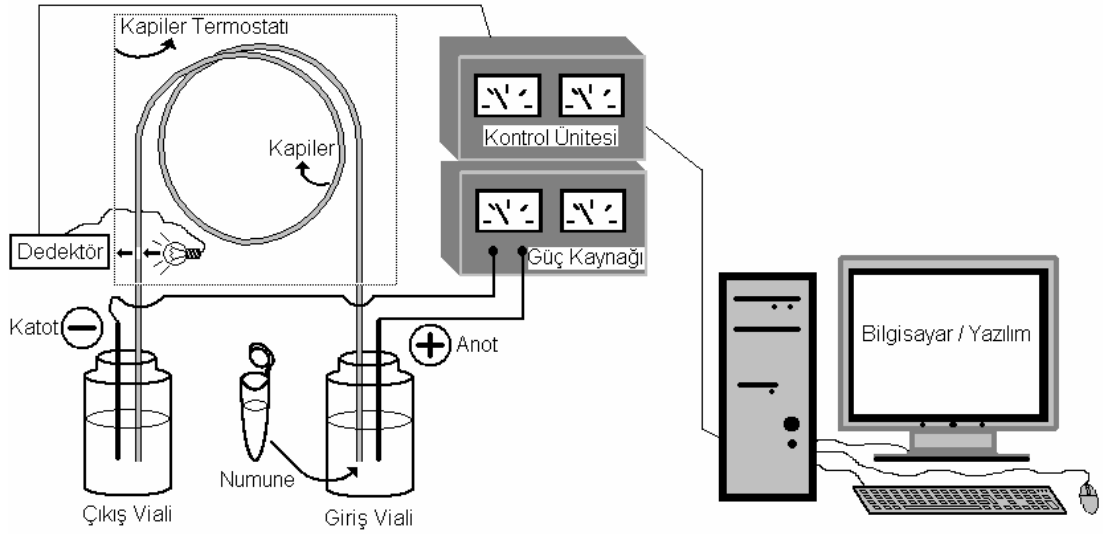
Elektroforez, iletken bir çözelti içindeki yüklü parçacıkların veya moleküllerin bir elektriksel alan varlığında göç etmesidir. Farklı yük ve büyüklükteki parçacıklar farklı hızlarda göç ederek birbirlerinden ayrılmaktadırlar.

Elektroforez, bir kapiler tüp içinde gerçekleştiriliyorsa “kapiler elektroforez” adını alır. Geleneksel elektroforezden modern CE’ye geçiş GC için dar çaplı kapilerler üretilmesi ve HPLC için yüksek duyarlılıkta *on-line* teşhis yöntemleri geliştirilmesini takiben olmuştur. CE’de, 10 – 100 µm iç çaplı ve 40 – 100 cm uzunlukta kapiler tüpler kullanılır. Kapilerin açık olan iki ucu, içi çalışma tamponu ile dolu iki vial arasına yerleştirilmiştir. Kapilerin bir tarafından örnek verilir ve viallere daldırılan iki elektrot arasına 30 kV’a kadar doğru akım potansiyeli uygulanır. Analit iyonları, uygulanan elektriksel alan nedeniyle kapilerin diğer ucuna doğru hareket ederler. Ayırım, analit iyonlarının göç hızlarının farkına dayanır. Ayırımı gerçekleştiren iyonların tayini kapilerin diğer ucundaki bir dedektörle gerçekleştirilir (63,64).

### 2.7.1. Kapiler Elektroforez Sistemi (63-65)

Bir CE sistemi; yüksek voltaj güç kaynağı, giriş ve çıkış vialleri, kapiler, dedektör ve integratör veya bilgisayardan oluşmaktadır. Bir çok sistemde kapilerdeki ısınmayı soğutmak ve kapiler sıcaklığını kontrol etmek için termostat bulunmaktadır. Şekil 2.3’de bir CE sisteminin şematik gösterimi verilmiştir.

Bir CE analizinin temel adımları; kapilerin ön yıkaması, kapiler ile giriş ve çıkış viallerinin çalışma tamponu ile doldurulması, kapilerin tampon ile şartlandırılması, örneğin kapilere enjeksiyonu ve elektriksel alan uygulanmasını içerir. Örnekler kapiler içinde göç ederler, dedektörden geçerken gözlemlenirler ve veriler integratör veya bilgisayara gönderilir. Veriler, dedektör cevabının zamana karşı grafiği olan elektroferogramlar şeklinde elde edilir.



Şekil 2.3. Kapiler elektroforez cihazının şematik gösterimi.

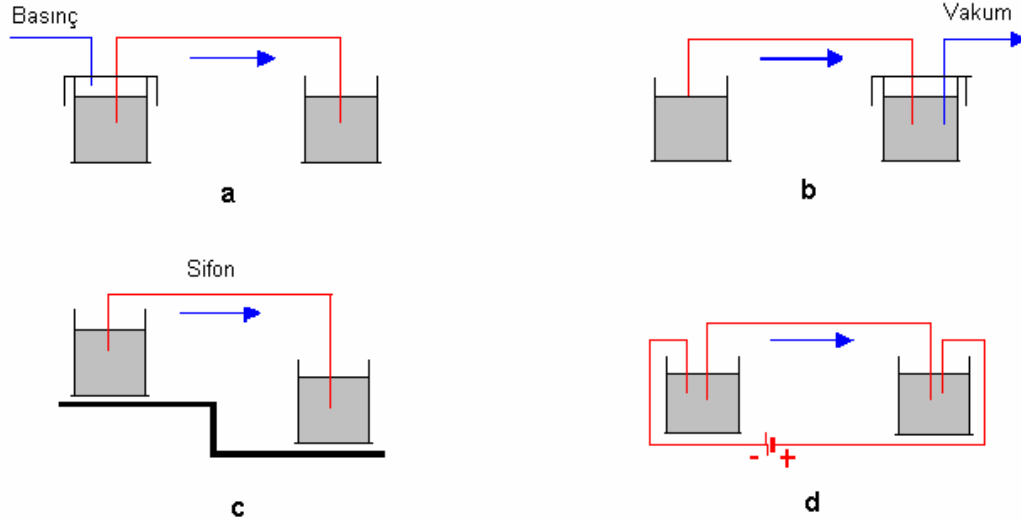
### Numune Enjeksiyonu

Kapiler içine numune enjeksiyonu hidrodinamik veya elektrokinetik olarak yapılabilir.

Hidrodinamik enjeksiyon en çok kullanılan enjeksiyon yöntemidir. Üç şekilde yapılabilir. Bunlardan birincisi, kapilerin giriş tarafına konulan numune vialine basınç uygulanmasıdır. Genelde 50 mbar civarında 1-5 saniye arası basınç uygulanır. Ardından numune vialı çıkarılıp çalışma tamponu vialı takılır ve voltaj uygulanarak analize devam edilir. Hidrodinamik enjeksiyonun ikinci yolu, numune vialı kapilerin giriş kısmındayken, çıkış kısmındaki tampon vialine vakum uygulanmasıdır. Uygulanan vakumla istenen miktardaki numune kapilere girince vakum kesilir, numune vialı çıkarılıp çalışma tamponu vialı takılır ve voltaj uygulanarak analize devam edilir. Üçüncü hidrodinamik enjeksiyon yönteminde, sifon etkisinden yararlanılır. Kapilerin giriş kısmına takılan numune vialı, çıkıştaki tampon vialinden daha yükseğe yerleştirilir. Yerçekiminin etkisiyle, numune kapilerin içine girer. Ardından numune vialı çıkarılıp çalışma tamponu vialı takılır ve voltaj uygulanarak analize devam edilir (Şekil 2.4 a,b,c).

Elektrokinetik enjeksiyonda kapilerin giriş kısmına numune vialı yerleştirildikten sonra, numune vialıyla çıkış kısmındaki çalışma tamponu vialı arasına voltaj uygulanır. Oluşan elektrik alanın etkisiyle numunedeki iyonlar kapiler

içine göç etmeye başlar. Bu voltajın uygulanmasından sonra numune vialı çıkarılıp tampon vialı takılır ve voltaj uygulanarak analize devam edilir (Şekil 2.4 d) (65).

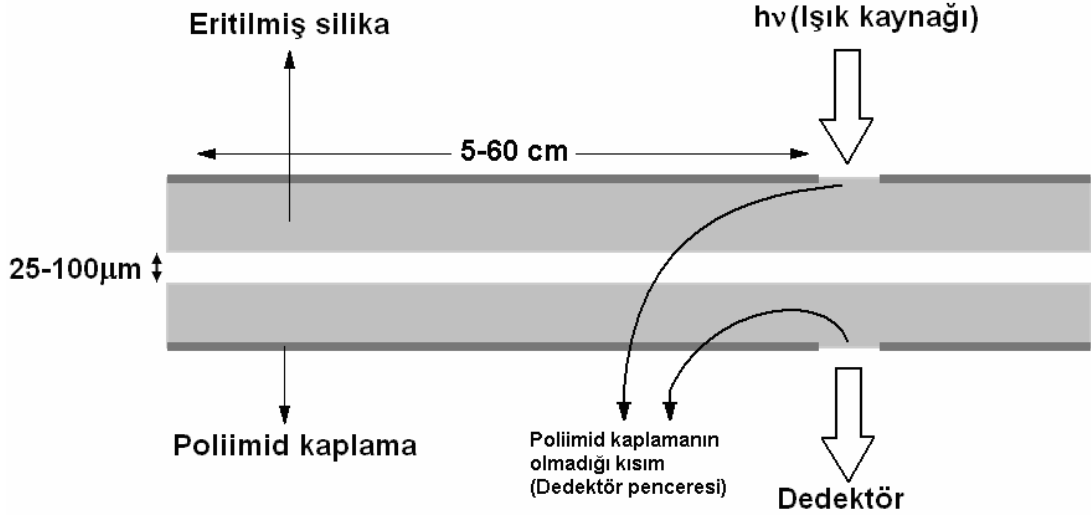


Şekil 2.4. Kapiler elektroforezde enjeksiyon sistemleri a, b, c) Hidrodinamik enjeksiyon, d) Elektrokinetik enjeksiyon.

### Kapiler

Kapiler elektroforezde kullanılacak kapilerin türü ve boyutları uygulanacak yöntem, analiz edilecek numune, istenen ayırıcılık ve uygun analiz süresine göre seçilir. Kapilerden beklenen, kısa analiz süresinde yeterli ayırımı sağlayabilmesidir. Kapilerin üretildiği materyalin elektrik iletkenliğinin olmaması, kimyasal olarak inert olması ve dedektörle uyumlu olması (örneğin UV dedektör için kapilerin ışınları absorplamaması) gerekir.

Eritilmiş silika günümüzde en sık kullanılan kapiler materyalidir. Kolay kırıldığı için dış kısmı poliimid ile kaplanıp sağlamlaştırılmıştır. UV dedektör kullanılacaksa, ışık yolunu kapatmaması için poliimid kaplama bu bölgeden kaldırılır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Eritilmiş silika kapilerin boyuna kesiti.

Pyreks kapiler, eritilmiş silika kapilere göre daha sağlam olması ve dedektör penceresi açmaya gerek göstermemesine rağmen 280 nm'nin altında çalışılamama dezavantajına sahiptir. Teflon kapilerde homojen iç çap elde edilemez ve ısı iletkenliği düşük olduğundan yüksek voltaj uygulanamaz. Bu nedenlerden dolayı eritilmiş silika, pyreks ve teflondan daha sık kullanılan bir kapiler materyalidir. Genelde iç çapı 25-100 µm olan eritilmiş silika kapiler kullanılır. Büyük çaplı kapilerde yüksek ısı açığa çıkar ve kapilerin iç duvarıyla merkezi arasındaki ısı farkı çok büyük olur. Küçük çaplı kapiler kullanılması ile UV/GB absorbands veya floresans gibi dedektörlerde ışık yolunun küçülmesinden dolayı absorbands düşer ve pik yüksekliği azalır. Ayrıca çok küçük çaplı kapilerin partiküllerle tıkanma olasılığı yüksektir.

Kapilerin tekrarlanabilir sonuçlar vermesi için ilk kullanımda ve her analizden önce şartlandırma işleminden geçirilmesi gerekir. Silika yüzeyinin durumu, CE'de parçacıkların hızlarına etki eden iki kuvvetten biri olan elektroosmotik akış (EOF) üzerinde etkilidir. Şartlandırmayla kapilerin iç çeperindeki silanol gruplarının iyonlaşma oranı, dolayısıyla EOF, her analizde aynı olur. Kapiler yeni ise 1 N NaOH, takiben 0.1 N NaOH, su ve en son olarak da çalışma tamponu geçirilerek şartlandırılır. Ayrıca her analizden önce 0.1 N NaOH, su ve çalışma tamponu geçirilerek kapilerin mümkün olduğunca aynı şartlanması sağlanır. Çalışma bitiminde su geçirilmelidir. Eğer birkaç gün çalışma

yapılmayacaksa kapiler içinde mikroorganizma üreyeceği göz önünde bulundurularak hava çekilerek kurutulmuş olarak bırakılması yararlı olur (64).

### **Kapiler Termostat**

CE’de tekrarlanabilir sonuçlar almak için kapiler sıcaklığının kontrolü önemlidir. Sıcaklığın değişmesiyle etkinlik, göç zamanı, enjeksiyon hacmi ve dedektör cevabı değişir. Ayrıca numune bozunmasına da neden olabilir. Kapiler sıcaklığının kontrolü, kapilerin içinde bulunduğu kasetin içine, istenen sıcaklığa termostatlı sistem ile ayarlanmış havanın fan ile üflenmesiyle sağlanır.

### **Güç Kaynağı**

Yüksek voltaj güç kaynağının amacı elektroforez için gerekli olan voltajı, akımı veya gücü sağlamaktır. Çoğu CE ayırımı sabit voltajda gerçekleştirilse de, güç kaynağı sabit akım ve sabit güç uygulayabilme özelliğine de sahip olmalıdır. Voltaj 30 kV’a kadar, akım 300  $\mu\text{A}$ ’e kadar ve güç 6 W’a kadar uygulanabilir. Ayrıca gerektiği durumlarda uygulanan elektrik alanın yönü (giriş vialı katot, çıkış vialı anot) değiştirilebilir (64).

### **Dedektör**

CE’de en çok kullanılan dedektörler UV/GB absorbans (direkt ve indirekt), floresans (direkt ve indirekt), lazer indüklenmiş floresans, kütle spektrometrisi, iletkenlik, amperometri (direkt ve indirekt), radyometrik ve kırılma indisi dedektörleridir.

Absorbans dedektörleri CE’ye uygulanabilirlikleri nedeniyle yaygın olarak kullanılırlar. Gözlenebilme sınırı genellikle  $10^{-5}$ - $10^{-7}$  M aralığındadır. Tek bir dalga boyunda veya dizi diyot dedektör kullanılarak bir çok dalga boyunda absorbans alınabilir.

Absorbans dedektörlerinde kapilerin kendisi dedektör hücresi olarak görev yapar. Bunun için erimiş silika kapilerin dış kısmındaki poliimid koruyucu kaplamanın bir kısmı yakma, çözme ve kazıma ile uzaklaştırılır. Ancak, bu durumda ışın yolunun uzunluğu kapiler iç çapından (50 ile 100  $\mu\text{m}$ ) fazla olamaz ve bu da derişim cinsinden gözlenebilme sınırını kısıtlar. Işın yolunun arttırılması için “Z”

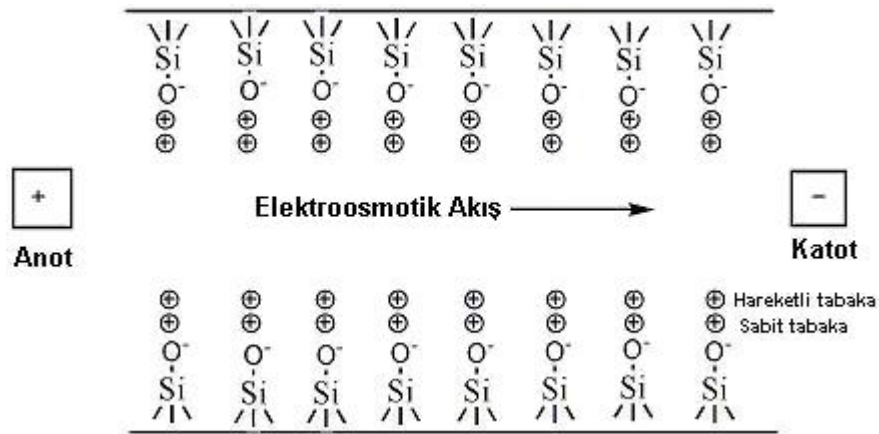
veya baloncuk şeklinde dedektör hücresine sahip kapillerler kullanılarak duyarlılık artırılabilir.

### 2.7.2. Kapiler Elektroferezde Ayırım İlkeleri (63-67)

#### Elektroosmotik Akış

CE'de, elektriksel alan etkisi altında genellikle çalışma tamponu da kapiler boyunca hareket eder. Bu olay elektroosmotik akış olarak adlandırılır.

Eritilmiş silika kapillerin iç yüzeyi silanol grupları ( $\text{SiOH}$ ) ile kaplıdır ve pH 3.0'un üzerinde  $\text{SiO}^-$ ya iyonize olurlar. Bu, kapillerin NaOH veya KOH ile muamele edilmesi ile sağlanır. Elektroosmotik akışın nedeni, kapillerin iç çeperinde çalışma tamponu ile  $\text{SiO}^-$  grupları arasında elektriksel çift tabaka oluşmasıdır. Çalışma tamponundaki pozitif yüklü iyonlar, kapiler çeperine yaklaşır. Çepere çok yakın olan pozitif yüklü iyonlar hareketsizdir. Ancak çeperden uzaklaştıkça, çeperle pozitif yüklü iyonlar arasındaki elektrostatik çekim zayıflar, kapilere uygulanan elektriksel alanın iyonlar üzerindeki kuvveti baskın gelir ve bu pozitif yüklü iyonlar topluca negatif yüklü elektroda (katot) doğru göç ederler. Bu toplu göç, kapiler içindeki tamponun katoda doğru akmasına neden olur. Bu akışa EOF denir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Kapiler içinde elektroosmotik akışın gösterimi.

Elektroosmotik akış hızı ( $U_{EOF}$ ), Formül 2.1.'e göre açıklanır.

$$U_{EOF} = E \cdot \mu_{EOF} \quad (2.1)$$

$U_{EOF}$  : Elektroosmotik akış hızı ( $\text{cm sn}^{-1}$ ),

E: Elektriksel alan ( $\text{V cm}^{-1}$ ),

$\mu_{EOF}$  : Elektroosmotik hareketlilik ( $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{sn}^{-1}$ )

Kapiler çeperine yakın olan hareketsiz tabaka ile merkeze yakın olan hareketli tabakanın meydana getirdiği çift tabaka arasında oluşan potansiyele zeta potansiyeli ( $\xi$ ) adı verilir ve Formül 2.2 ile gösterilir.

$$\xi = 4 \pi \delta e / \varepsilon \quad (2.2)$$

$\delta$  : Difüzyon tabakası kalınlığı

e : Yüzey alana düşen yük

$\varepsilon$  : Tamponun dielektrik sabiti

Elektroosmotik akış hızı ( $V_{EOF}$ ) Formül 2.3 ile de gösterilebilir.

$$U_{EOF} = \varepsilon \xi E / 4 \pi \eta \quad (2.3)$$

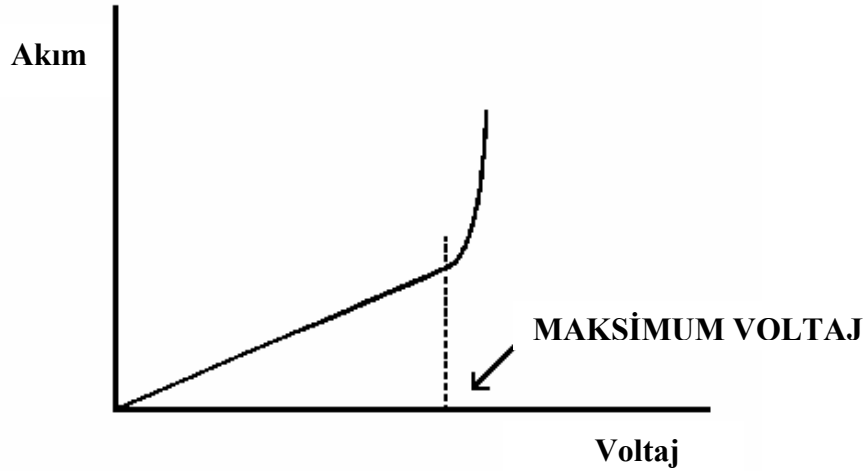
$\eta$ : Tamponun viskozitesi

Elektriksel alan (voltaj/uzunluk) voltaja bağlı olduğundan, EOF voltajla kolayca kontrol edilebilir (Formül 2.1). Artan voltaj ile EOF artar ve göç zamanı azalır. Ayrıca voltajın artması yüksek etkinliği de sağlar. Ancak yüksek voltaj ve bunun sonucu olan yüksek akım kapillerin ısınmasına (Joule ısınması) da neden olur (Formül 2.4).

$$P = V I \quad (2.4)$$

P: Güç, V: Voltaj, I : Akım

Eğer kapilerdeki ısınma çabuk soğutulamazsa, sıcaklık kapiler içinde artar ve bu artış da pik genişlemesine, tekrarlanamayan göç zamanına, numune bozunması ya da içeriğinin değişmesine veya tampon kaynamasına yol açarak elektriksel iletkenliğin önlenmesine neden olabilir. Bu nedenle çalışmalarda dar pik ve kısa analiz süresi için gerekli olan yükseklikteki voltaj (maksimum voltaj) seçilmelidir. Uygulanabilecek maksimum voltaj, voltaja karşı akım grafiğinden (Ohm yasası grafiği) belirlenebilir (Şekil 2.7). Bu grafikte voltaj yerine elektriksel alan da kullanılabilir. Grafikte doğrusallık bozulmadan önceki son voltaj, maksimum voltaj değerini verir. Maksimum voltaj tampon bileşimine, pH'sına ve derişimine, ayrıca kapiler iç çapı ve uzunluğuna bağlıdır.



Şekil 2.7. Voltaja karşı akım (Ohm yasası) grafiği.

EOF üzerinde önemli etkisi olan diğer bir parametre de tampon pH'ıdır. pH'ın artmasıyla EOF artar, çünkü yüksek pH'larda kapiler iç duvarında  $\text{SiOH}$ 'ın  $\text{SiO}^-$ 'ya iyonizasyonu yüksek miktardadır. Formül 2.2'den görüldüğü gibi, kapiler duvarının yüzey yükünde artış zeta potansiyelinin artmasına neden olur. Dolayısıyla, pH'ın artması daha fazla yüklü  $\text{SiO}^-$  gruba, bu da yüksek zeta potansiyeline ve sonuçta da elektroosmotik akış hızının artmasına neden olur (Formül 2.3).

Tamponun iyonik gücünde veya derişiminde artış zeta potansiyelini düşüreceğinden EOF'yi azaltır. Düşük tampon derişimi kısa analiz süresi verir, ancak çok düşük tampon derişiminden kaçınılmalıdır. Eğer tampon derişimi numune

derişiminden fazla değilse, numune ve tampon arasında elektriksel alanda bozukluğa neden olan iletkenlikte farklılıklar olabilir. Bu bozulma pik genişlemesine ya da pik kuyruklanmasına neden olur. Genel kural olarak çalışma tamponunun derişimi numune derişiminin en az 100 katı olmalıdır.

Sıcaklıkta artış tampon viskozitesinin azalmasına, dolayısıyla da EOF'nin artmasına neden olur. Sıcaklık sürekli kontrol altında tutulmalıdır. Çünkü sıcaklıkta artış numune bozulmasına, zon genişlemesine, tampon kaynamasına ve tekrarlanamayan analiz süresine neden olabilir.

Tampona organik çözücü eklenmesi viskozite, dielektrik sabiti ve zeta potansiyeli üzerinde etkili olabilmektedir. Organik çözücünün etkisi, eklenen çözücünün cinsine ve miktarına göre değişir. Suyu % 0-50 arasında metanol eklenmesi çözeltilinin viskozitesinin artmasına neden olur. % 50'den fazla metanol ilavesinde ise viskozite azalır. Buna karşılık % 100'e kadar asetonitril eklenmesinde çözelti viskozitesi azalır.

EOF, kapiler yüzeyinin silanol gruplarının iyonlaşmasını önleyen bir materyalle (poliakrilamid veya metilselüloz) kaplanması ile azaltılabilir veya önlenabilir. Ayrıca EOF ters faz polarite uygulanarak veya tampona değişik maddeler eklenerek ters çevrilebilir.

EOF'yi ölçmenin en kolay yolu, yüksüz bir bileşiğin sisteme enjekte edilmesidir. Bunun için çalışma tamponu pH'ında yüksüz olan ve çözünebilen, kullanılan dedektörle tanımlanabilen, saf, kapiler duvarı ile etkileşmeyen bir bileşik (metanol, mesitil oksit, formamid, fenol gibi) seçilmelidir.

### **Elektroforetik Hareketlilik**

Elektriksel alan altında tampon içindeki elektriksel yüklü maddeler elektroforetik hızla hareket ederler. Elektroforetik hız ( $U_{EP}$ ) Formül 2.5'e göre hesaplanır.

$$U_{EP} = E \mu_{EP} \quad (2.5)$$

$U_{EP}$ : Elektroforetik hız

$\mu_{EP}$ : Elektroforetik hareketlilik

Maddeler kapiler boyunca farklı hızlarda hareket ettiklerinden ayırım gerçekleşir. Elektroforetik hareketlilik Formül 2.6'ya göre verilir.

$$\mu_{EP} = q / 6 \pi \eta r \quad (2.6)$$

q: İyonize maddenin yükü

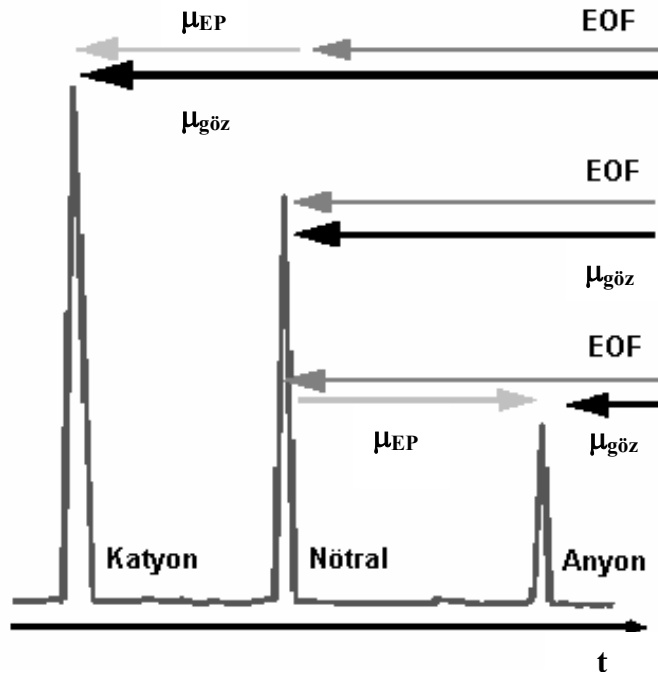
r: Numune yarıçapı

Kapiler içinde küçük ve çok yüklü moleküller hızlı, büyük ve az yüklü moleküller ise yavaş hareket ederler. Nötral moleküllerin yükleri sıfır olduğu için elektroforetik hareketlilikleri sıfırdır. Tampon viskozitesinde artış EOF'yi olduğu gibi elektroforetik hareketliliği de azaltır.

Maddelerin hızı elektroforetik hıza ve elektroosmotik akış hızına bağlıdır. Gözlenen elektroforetik hız ( $v_{göz}$ ) Formül 2.7'ye göre verilir.

$$v_{göz} = v_{EP} + v_{EOF} \quad (2.7)$$

Kapilerin dedektör kısmının negatif yüklü ve EOF'nin dedektöre doğru olduğu “normal” CE'de, anyonların gözlenen hızları, EOF'nin ters yönünde elektroforetik hareketliliğe sahip olduklarından elektroosmotik hızdan düşüktür ( $v_{göz \text{ anyon}} < v_{EOF}$ ). Katyonlarda ise gözlenen hız elektroosmotik hızdan büyüktür ( $v_{göz \text{ katyon}} > v_{EOF}$ ). Çünkü EOF ile aynı yönde hareketliliğe sahiptirler. Nötraller ise kapiler içinde yalnızca EOF ile hareket ederler ve bundan dolayı gözlenen hız EOF'ye eşittir ( $v_{göz \text{ nötral}} = v_{EOF}$ ) (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Elektroforetik ve elektrosmotik hızların göç zamanı üzerine etkisi

(EOF: Elektroosmotik akış,  $\mu_{EP}$  : Elektroforetik hareketlilik,

$\mu_{göz}$  : Gözlenen hareketlilik,  $t$  : Zaman)

Gözlenen elektroforetik hız ( $U_{göz}$ ) Formül 2.8'e göre hesaplanır.

$$U_{göz} = l / t_m \quad (2.8)$$

$l$ : Etkin kapiler uzunluğu

$t_m$ : Maddenin göç zamanı

### 2.7.3. Elektroforetik Parametrelerin Ayırım Parametreleri Üzerine Etkisi (64)

Elektroforetik ayırım parametreleri zaman, etkinlik, seçicilik ve ayırıcılıktır.

#### Zaman

Maddelerin etkin kapiler uzunluğundaki göç zamanı ( $t_m$ ) Formül 2.9'a göre hesaplanır.

$$t_m = l L / (\mu_{EP} + \mu_{EOF}) V \quad (2.9)$$

L: Toplam kapiler uzunluğu

Formül 2.9'dan görüldüğü gibi, yüksek voltaj, kısa kapiler ve yüksek EOF ile kısa analiz süresi elde edilir.

### **Etkinlik**

Etkinlik teorik tabaka sayısı (N) ile belirlenir ve göç zamanı ile pik genişliğinin ölçülmesi ile hesaplanabilir (Formül 2.10).

$$N = 16 (t_m / w)^2 \quad (2.10)$$

w: Pik genişliği

Formül 2.10'a göre dar pik ve uzun analiz süresi ile yüksek etkinlik elde edilir.

### **Seçicilik**

Seçicilik ( $\alpha$ ) komşu iki pikin dedektörden geçerken birbirlerine olan uzaklıklarını gösterir (Formül 2.11).

$$\alpha = (t_2 - t_0) / (t_1 - t_0) \quad (2.11)$$

$t_1$ : Önce gelen maddenin göç zamanı

$t_2$ : Sonra gelen maddenin göç zamanı

$t_0$ : Sadece elektroosmotik akış ile sürüklenen maddenin göç zamanı.

Seçicilikte değişikliğin en etkili yolu tampon pH'ında değişiklik yapmaktır.

### **Ayırıcılık**

En önemli ayırım parametresi olan ayırıcılık ( $R_s$ ) elektroferogramlardan Formül 2.12 ile hesaplanabilir.

$$R_s = 2 (t_2 - t_1) / (w_1 + w_2) \quad (2.12)$$

$w_1$  ve  $w_2$ : Komşu piklerin zemin çizgisindeki pik genişliği

Ayırıcılık, uygulanan voltaj arttırılarak, çalışma tamponunun pH'ı ve bileşimi değiştirilerek, kapiler uzunluğu arttırılarak ve EOF optimize edilerek arttırılabilir.

#### **2.7.4. Kapiler Elektroforez Türleri (64,68)**

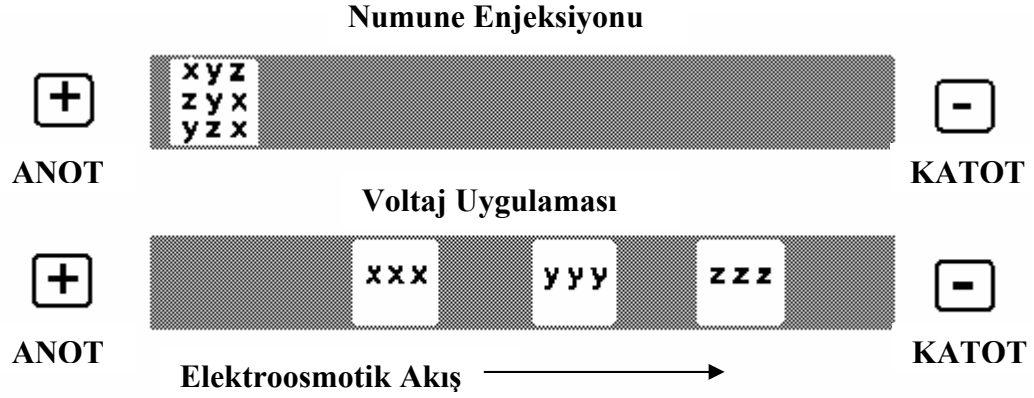
CE türleri aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir.

- 1) Kapiler zon elektroforez (CZE)
- 2) Miseller elektrokinetik kapiler kromatografi (MEKC)
- 3) Kapiler jel elektroforez (CGE)
- 4) Kapiler izoelektrik odaklama (CIEF)
- 5) Kapiler izotakoforez (CITP)

Bu tez çalışmasında analizler CZE yöntemi ile gerçekleştirildiğinden sadece bu yöntem incelenecektir.

#### **Kapiler Zon Elektroforez**

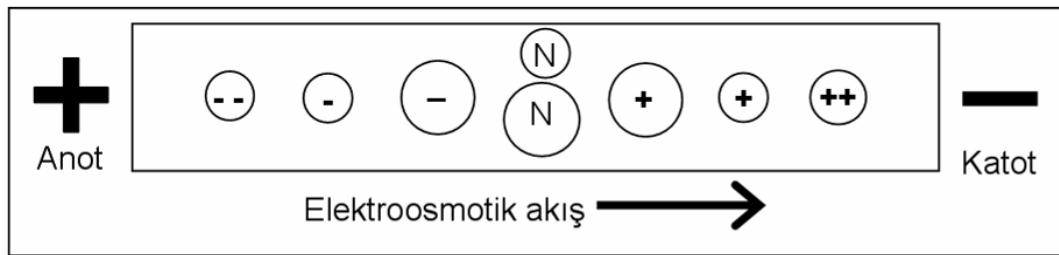
CZE, yaygın olarak kullanılan bir elektroforetik yöntemdir. CZE'de ayırım, içi tampon çözelti ile dolu kapiler boruda gerçekleşir. Kapilerin uçları aynı tampon çözeltiyi içeren giriş ve çıkış viallerine daldırılmıştır. Bu tampon çözeltiye çalışma tamponu denir. Her iki vialle daldırılan elektrotlar ise dış güç kaynağına bağlıdır. Tampon ile dolu kapilere numune enjekte edilip voltaj uygulanırsa parçacıklar kapiler boyunca zonlar halinde hareket ederler (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Kapiler zon elektroforezde numune zonlarının ayırımı.

CZE’de parçacıkların hızlarına elektroforetik ve elektroosmotik iki kuvvet etki eder. Katyonlar negatif yüklü elektroda (katot) doğru, anyonlar pozitif yüklü elektroda (anot) doğru göç ederler. İyonların elektroforetik göç hızları, yük/büyüklik (yük/çap) oranlarına bağlıdır. Aynı yüklü iyonlardan küçük olan büyük olanına göre, büyüklüğü aynı olanlardan ise yükü daha fazla olan daha hızlı hareket eder. Ayrıca elektriksel alan altında, kapiler içinde elektroosmoz ile hareket de söz konusudur. EOF, parçacıkları anottan katota doğru hareket ettirir.

Elektroosmotik ve elektroforetik etkiler sonucunda CZE’de elüsyon sırası katyon, nötral ve anyon şeklinde oluşur. İyonlar yük/büyüklik oranlarına göre ayrıldıklarından nötral bileşikler birbirlerinden ayıramazlar (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Kapiler zon elektroforezde ayırım.

CZE, bir tamponda çözünebilen hemen hemen her iyonize bileşiğin ayırımında kullanılabilir. Küçük inorganik anyonlar ve katyonlar, büyük biyomoleküller, ayrıca suda çözünmeyen bileşikler de susuz tamponlar kullanılarak CZE ile ayrılabilirler.

## 2.8. Kromatografi

Kromatografi, kimyasal bileşenlerin ayrılması, tanınması ve tayini için yaygın olarak kullanılan bir analitik yöntemdir. Bütün kromatografik yöntemlerde ortak olarak bir sabit faz ve bir de hareketli faz vardır. Akış halinde gaz veya sıvı bir fazla birlikte karışımdaki bileşenler, sabit faz üzerinden geçirilir; bileşenlerin göç hızlarına bağlı olarak ayırma gerçekleşir.

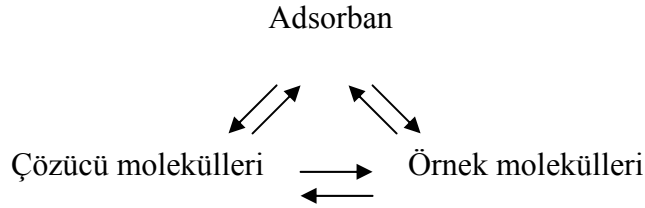
Kromatografik yöntemler iki şekilde sınıflandırılabilir. Hareketli ve sabit fazların fiziksel olarak nasıl temas ettirildikleri esas alındığında, kolon kromatografisi ve düzlemsel kromatografi olmak üzere ikiye ayrılır. Kolon kromatografisinde, sabit faz ince bir kolonda tutulur ve hareketli faz basınç altında bu sabit faz arasından geçmeye zorlanır. Düzlemsel kromatografide ise, sabit faz düz bir plaka üzerine veya bir kağıdın gözenekleri arasına tutturulur ve bu durumda hareketli faz sabit faz arasından kapiler etkisiyle veya yerçekimi etkisiyle hareket eder.

Kromatografinin daha temel bir sınıflandırması kullanılan sabit ve hareketli fazların tiplerine göre, sıvı kromatografi, gaz kromatografi ve süperkritik akışkanlı kromatografi şeklinde yapılabilir. Bu üç teknikte hareketli faz sırasıyla sıvı, gaz ve süperkritik akışkandır. Sıvı kromatografisi, hem kolonlarla hem de düz yüzeyler üzerinde gerçekleştirilebilir; gaz kromatografi ve süperkritik sıvı kromatografi yalnız kolonlarda gerçekleştirilir ve kolonun iç yüzeyinde hareketli faz bulunur (63).

Kromatografik yöntemlerde sabit faz, hareketli faz ve numune arasındaki etkileşimlere bağlı olarak çeşitli mekanizmalar kullanılır. Bu mekanizmalara dayanarak kromatografi, adsorpsiyon, dağılma, iyon çifti, iyon değiştirme, eleme ve afinite kromatografisi şeklinde sınıflandırılır (69).

### 2.8.1. Adsorpsiyon Kromatografisi

Adsorpsiyon kromatografisi bir sıvı/gaz – katı kromatografisidir. Ayırım, sıvı veya gaz hareketli faz ve ayrılacak molekülleri tersinir olarak adsorblayan katı sabit faz arasında gerçekleşir. Ayrılacak madde molekülleri hareketli fazdaki çözücü molekülleri ile sabit faz (adsorban) üzerindeki tutunma yerleri için yarışır. Bu süreç bir dizi dengeyi içine alır;



Bir örnek molekülünün, sabit faz tarafından adsorplanması için bir çözücü molekülünün yüzeyden uzaklaşması gerekir. Eğer adsorban polar bir madde ise (silika veya alümina gibi) apolar moleküller yüzeye az eğilim gösterirler ve sabit fazda alıkonmazlar. Polar fonksiyonel gruplara veya hidrojen bağı yapma kapasitesine sahip moleküller yüzeye güçlü etkileşim gösterirler ve daha uzun süre alıkonurlar. Polar maddeler hidrojen bağı oluşturabilirken, apolar maddelerin ayrılmasında baskın olan London dağılma kuvvetleridir. Polar maddelerin ayrılmasında polar sabit fazlar, apolar maddelerin ayrılmasında apolar sabit fazlar kullanılmaktadır (69,70).

### 2.8.2. Dağılma (Partisyon) Kromatografisi

Sıvı-sıvı kromatografisi olarak da bilinen dağılma kromatografisi, birbirleriyle karışmayan iki sıvı faz arasında maddelerin dağılması temeline dayanmaktadır. Sabit faz olarak, inert bir destek katının üzeri kaplanmış veya destek katıya kimyasal olarak bağlanmış sıvı sabit fazlar kullanılır. Ayrılacak maddeler, sabit faz ve hareketli faz arasında dağılma katsayılarına bağlı olarak dağılırlar, bu dağılım farklı oranda göçe neden olur ve ayırım gerçekleşir.

Sabit faz ve hareketli faz polaritelerinin farklılığına göre dağılma kromatografisi ters faz sıvı kromatografisi ve normal faz sıvı kromatografisi olmak üzere iki alt başlıkta incelenebilir (69,71).

#### Ters Faz Sıvı Kromatografisi

Ters faz sıvı kromatografisinde sabit faz polaritesi hareketli faz polaritesinden daha düşüktür. Bu kromatografi türü, apolar sabit fazda daha fazla kalmayı tercih eden, yani daha fazla alıkonulan apolar maddelerin ayırımında kullanılır.

Kimyasal olarak bağlı alkil zincirlerinin sabit faz olarak kullanıldığı ters faz sıvı kromatografisinde, ODS (18 karbon atomu zincirinden oluşan oktadesil silan) en

fazla kullanılan sabit fazdır. Ayrıca  $C_8$  ve daha kısa alkil zincirleri, sikloheksil ve fenil bağlanmış sabit fazlar da kullanılmaktadır. Fenil gruplar alkil gruplardan daha polardır (72).

Ters faz kromatografisinde hareketli fazlar genellikle su veya sulu tampon çözeltileri ile suyla karışabilen organik çözücü karışımlarından oluşmaktadır.

### Normal Faz Sıvı Kromatografisi

Normal faz sıvı kromatografisinde sabit faz polaritesi hareketli faz polaritesinden daha yüksektir. Sabit faz genellikle silika veya alümina, kullanılan hareketli fazlar ise hekzan, metilen klorür, kloroform, dietil eter ve bunların karışımıdır. Silika jelin üzerine kimyasal bağlarla  $-CN$ ,  $-NO_2$  veya  $-NH_2$  gibi polar fonksiyonel gruplar bağlanarak farklı normal faz sabit fazları elde edilir. Normal faz ayırımlarında polaritesi yüksek olan maddeler, polar olan sabit faz ile daha fazla etkileşmekte, buna bağlı olarak kolonu daha geç terketmektedir (71,73).

Ters faz ve normal faz sıvı kromatografilerindeki farklılıklar Tablo 2.3'de özetlenmiştir.

Tablo 2.3. Ters faz ve normal faz sıvı kromatografilerinin karşılaştırılması (71).

|                                                | <b>Ters Faz</b>          | <b>Normal Faz</b>        |
|------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>Sabit Faz Polaritesi</b>                    | Düşük                    | Yüksek                   |
| <b>Hareketli faz polaritesi</b>                | Ortadan Yüksekçe         | Düşükten Ortaya          |
| <b>Elüsyon Sırası</b>                          | En polar önce            | En az polar önce         |
| <b>Hareketli Faz Polarite Artışının Etkisi</b> | Elüsyon zamanını artırır | Elüsyon zamanını azaltır |

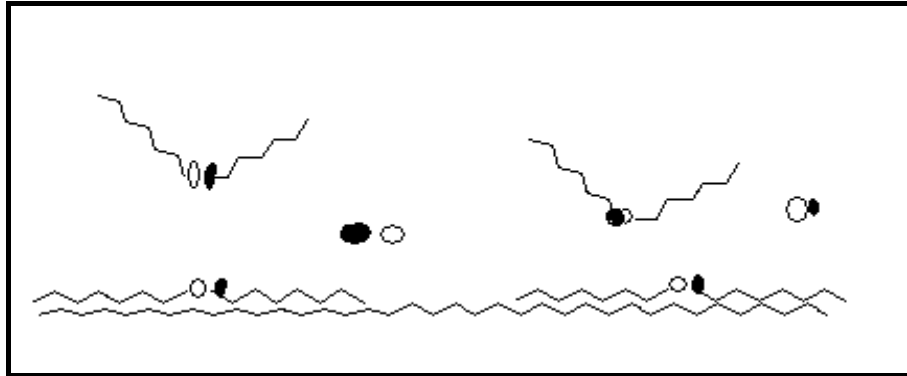
Ters faz sıvı kromatografisi, günümüzde en çok kullanılan ayırım tekniğidir. İlaç analizlerinde de genel olarak ters faz sıvı kromatografisi normal faz sıvı kromatografisine göre tercih edilir. Bunun nedeni; ilaçların genellikle daha apolar yapıda olmaları, ters faz sıvı kromatografisinin uygulamasının ve sistem kontrolünün daha kolay olması, hareketli faz bileşiminde kullanılan organik çözücülerin daha ucuz olması ve sulu tampon çözeltilerinin oranının yüksek tutulmasıdır.

### 2.8.3. İyon Çifti Kromatografisi

İyon çifti kromatografisi, iyonik veya iyonize olabilen türlerin ayrılması ve tayini için kullanılan bir tür ters faz dağılma kromatografisidir. Bu kromatografi türünde hareketli faz, metanol ve asetonitril gibi bir organik çözücü içeren bir sulu tampon ve tayin edilecek analit ile zıt yüklü karşıt iyon içeren bir iyonik bileşikten meydana gelmiştir (63).

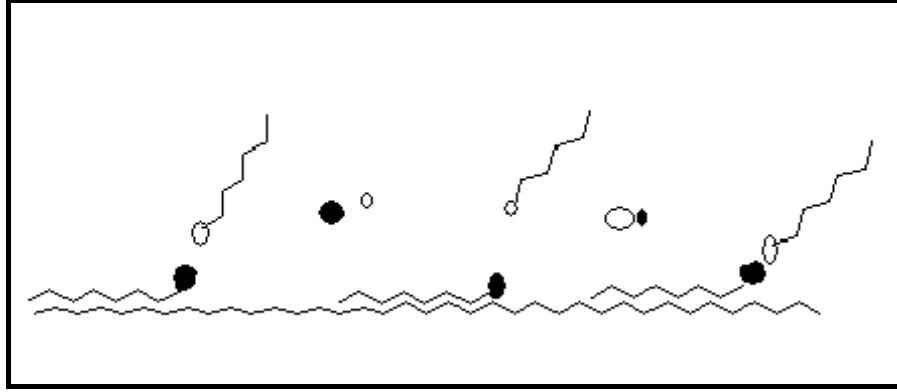
İyon çifti kromatografisinin ayırım mekanizması tam olarak açıklanamamakla beraber kaynaklarda önerilen üç temel model aşağıda açıklanmıştır (74,75).

i. İyon çifti oluşum: İyon çifti oluşum modelinde, iyon çifti oluşumu sulu hareketli fazda meydana gelir ve daha sonra oluşan yüksüz iyon çifti ters faz kolona tutunur. Alıkonma iyon çiftinin polaritesine bağlıdır. Eğer iyon çifti oluşturucu uzun zincirli bir alkilden oluşuyorsa oluşan iyon çifti daha az polardır ve sabit faza daha fazla eğilim göstereceğinden alıkonma artar (Şekil 2.11).



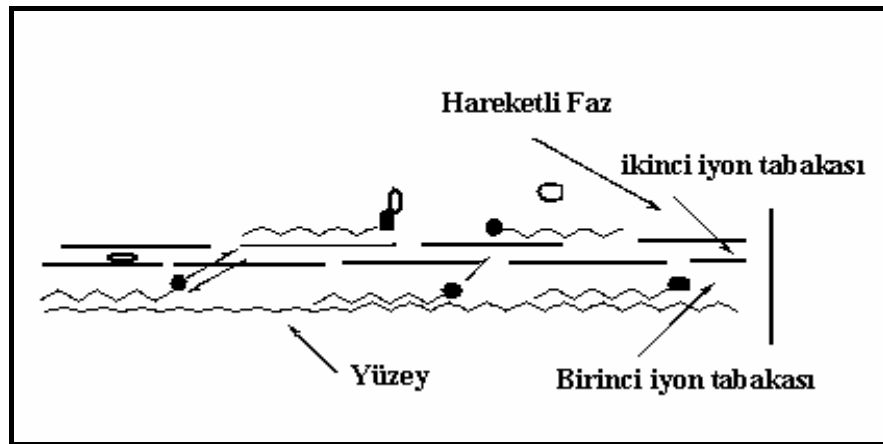
Şekil 2.11. İyon çifti oluşum modeli ( • Pozitif yüklü iyon,  
○ negatif yüklü iyon, ~~~~~• iyon çifti oluşturucu,  
~~~~~○ örnek molekülü)

ii. Dinamik iyon değiştirici: Dinamik iyon değiştirici modelinde, iyon çifti oluşturucunun hidrofobik kısmı hidrofobik sabit faza adsorblanır ve kolonun bir iyon değiştirici olarak davranmasına neden olur. İyon çifti oluşturucunun zincir uzunluğu ne kadar fazla olursa kolonun iyon değiştirici olarak davranması o kadar fazla olur ve iyonik bileşiklerin alıkonması gelişir (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Dinamik iyon değiştirme modeli (  $\bullet$  Pozitif yüklü iyon,  
 $\circ$  negatif yüklü iyon,  $\sim$  iyon çifti oluşturucu,  
 $\sim$  örnek molekülleri)

iii. İyon etkileşimi: Bu modelde iyon çiftinin iki fazda birden oluşmasının gerekmediği savunulur ve sabit faz yüzeyinde lipofilik iyon çifti oluşturucuların neden olduğu iki katmanlı bir elektrik tabakasından kaynaklanan dinamik bir dengenin meydana geldiği düşünülür. Bu yüzeyin yük yoğunluğunun neden olduğu elektrostatik güç maddenin alıkonmasını sağlar (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. İyon etkileşim modeli (  $\bullet$  Pozitif yüklü iyonlar,  
 $\circ$  negatif yüklü iyonlar,  $\sim$  örnek molekülleri)

İyon çifti oluşturunca maddeler sabit faz yüzeyindeki artık silanol gruplarını da örtük pik kuyruklanmasını engeller ve pik keskinliğini arttırmırlar. İyon çifti oluşturunca maddeler genel olarak; kuaterner aminler, tersiyer aminler, alkil sülfonik asitler, alkil sülfonatlarıdır. İyon çifti kromatografisi ile iyonik veya iyonize olabilen maddeler ayrılabilir.

#### **2.8.4. İyon Değişirme Kromatografisi**

Sabit fazdaki iyonlarla numunedeki aynı yükteki iyonların karşılıklı yer değişirmesi esasına dayanır. Maddenin mutlaka iyonik halde olması veya iyonlaşması gerekir. İyon değişirme kromatografisinde iyonik yapılar ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $SO_4^{2-}$ ) ya da belirli pH değerlerinde iyon veya iyonik yapı verebilen moleküller (organik asit veya organik bazlar) ayrılır. Ayrılacak madde ile sabit faz arasında ne kadar kuvvetli iyonik bağ oluşursa alıkonma o kadar güçlüdür.

İyon değişirici dolgu maddeleri silika veya polimer üzerine iyonik fonksiyonel grupların bağlanması ile elde edilir. Negatif yüklü fonksiyonel gruplu dolgu maddeleri katyon değişiriciler, pozitif yüklü fonksiyonel gruplu dolgu maddeleri anyon değişiriciler olarak adlandırılır (69).

#### **2.8.5. Eleme Kromatografisi**

Eleme kromatografisi yönteminde, maddeler molekül büyüklüğüne ve biçimine göre ayrılırlar. Jel geçirgenlik ya da jel filtrasyon adını alan bu yöntemde belli büyüklüğe sahip ve karışımındaki bileşenlerle etkileşmeyen bir madde, katı faz olarak kullanılır. Dolgu maddesinin gözenek büyüklüğü ve numunede bulunan moleküllerin boyutu alıkonma süresini etkiler. Büyük moleküller gözeneklere sığmayarak hareketli fazla birlikte hızla sürüklenerek kolondan ilk önce çıkarlar. Küçük moleküller gözenekleri dolduran hareketli faza difüze olurlar. Bunların ortalama hızları gözeneklerde geçirdikleri zaman miktarına bağlıdır. Orta büyüklükteki moleküller ise sadece bazı gözeneklere difüze olurlar, bu nedenle ortalama bir hızla hareket ederler.

Bu yöntem özellikle kromatografik ayırma sırasında bozunması veya değişikliğe uğraması istenmeyen protein ya da enzim gibi biyolojik moleküllerin birbirinden ayrılması için kullanılır. Bu yöntem ile polimerlerin molekül ağırlığı dağılımı da tayin edilebilir (76).

### 2.8.6. Afinite Kromatografisi

Kromatografik tekniklerin en yenisi olan afinite kromatografisi, bir protein molekülü ile uygun bir ligand arasında spesifik etkileşim kurulması esasına dayanır. Proteine spesifik bağlanma eğilimi gösteren ligand, sabit faz oluşturmak üzere bir jel matrikse bağlanır. Sabit faz, özel bir proteine karşı gelen antikör ise, bir protein karışımı kolondan geçirildiği zaman, sadece antikör ile etkileşen protein kolona bağlanır. Daha sonra bu protein hareketli fazın bileşiminin veya pH'ının değiştirilmesi ile antikörden ayrılarak elüe edilir (69).

### 2.8.7. Kromatografide Temel Parametreler (69-73, 75)

#### A. Alıkonma Zamanı ve Kapasite Faktörü

Numune enjeksiyonundan sonra analitin dedektöre ulaşması için geçen zamana alıkonma zamanı ( $t_R$ ) denir. Alıkonma zamanı terimi yerine alıkonma hacmi de ( $V_R$ ) kullanılmaktadır. Bir maddenin alıkonma hacmi, bir bileşenin sabit fazdan elüe olması için gerekli olan hareketli faz hacmi olup alıkonma zamanı ve hacimsel akış hızından ( $F$ ) hesaplanabilir (Formül 2.13).

$$V_R = t_R F \quad (2.13)$$

Alıkonma hacmi, temel kromatografik parametre olan dağılım katsayısı  $K$  ile aşağıdaki formül gereği doğrudan ilişkilidir.

$$V_R = V_M + K V_S \quad (2.14)$$

Bu eşitlikte  $V_M$  kolondaki hareketli faz hacmi,  $V_S$  kolondaki sabit faz hacmidir.

Dağılım katsayısı ( $K$ ) ise, çözünenin sabit fazdaki molar derişiminin ( $C_S$ ), hareketli fazdaki molar derişimine ( $C_M$ ) oranlanması ile hesaplanır (Formül 2.15).

$$K = C_S / C_M \quad (2.15)$$

Bir maddenin alıkonma hacmi, ölü hacim ( $V_0$ ) terimini içerecek biçimde de tanımlanabilir. Kapasite faktörü ( $k'$ ) olarak bilinen bu kavram formül 2.16'da verilmiştir.

$$k' = (V_R - V_0) / V_0 \quad (2.16)$$

Elüsyon sırasında hacimsel akış hızı (F) sabitse formül;

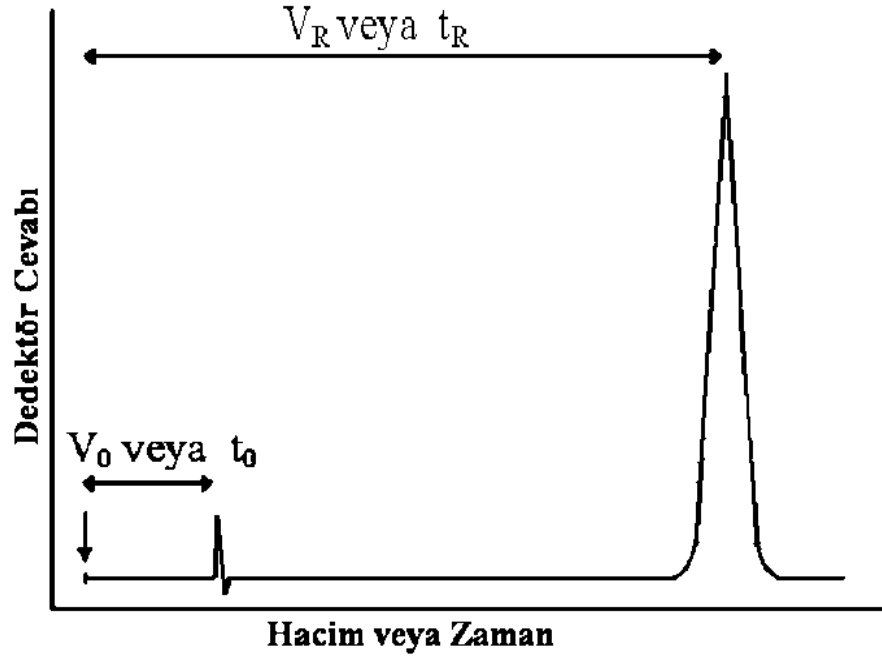
$$k' = (t_R - t_0) / t_0 \quad (2.17)$$

biçiminde yazılabilir. Kolon ile herhangi bir etkileşmeye girmeyen maddeler ölü hacim veya boş hacimde ( $V_0$ ) elüe edilirler. Formül 2.16 ve 2.17’de  $V_0$  ve  $t_0$  sırasıyla ölü hacim ve ölü zaman olarak tanımlanmıştır (Şekil 2.14).

Kapasite faktörü, maddenin hareketli ve sabit faz arasındaki dağılım katsayısına bağlıdır.

$$k' = K V_s / V_m \quad (2.18)$$

Kapasite faktörü her maddenin kendine özgüdür ve kromatografik parametrelerin optimizasyonunda dikkat edilmesi gereken en önemli parametrelerden biridir. Bir kromatografik ayırimda hesaplanan kapasite faktörü değerinden faydalanarak ayırım hakkında bilgi sahibi olunabilir. İyi bir ayırım için kapasite faktörünün 1 ile 10 arasında olması gerekmektedir.



Şekil 2.14. Kapasite faktörünün hesaplanması.

### B. Seçicilik

Bir karışımdaki iki maddenin ayırımını değerlendirmek için kullanılır. A ve B bileşenli bir karışımda seçicilik faktörü ( $\alpha$ ), her iki bileşenin kapasite faktörü oranına eşittir.

$$\alpha = k'_B / k'_A \quad (2.19)$$

$k'_B$  : Alıkonma zamanı uzun olan maddenin kapasite faktörü

$k'_A$  : Alıkonma zamanı kısa olan maddenin kapasite faktörü

Bu tanıma göre,  $\alpha$  daima 1'den büyüktür.

Seçiciliği etkileyen ana faktör sabit fazdır. Hareketli fazın bileşimi ve az da olsa sıcaklık da seçiciliği etkiler.

### C. Kolon Etkinliği

Kromatografik kolon etkinliğinin nicel bir ölçüsü olarak, birbiriyle ilgili iki terim kullanılmaktadır. Bunlar, teorik tabaka yüksekliği  $H$  ve teorik tabaka sayısı  $N$ 'dir. Bu iki terim arasında Formül 2.20'deki bağıntı vardır.

$$N = L / H \quad (2.20)$$

$L$  : Kolon dolgu uzunluğu

Kromatografik kolonun etkinliği teorik tabaka sayısı arttıkça ve teorik tabaka yüksekliği azaldıkça artar. Kolon tipi ve boyutu, hareketli faz bileşimi ve akış hızına bağılı olarak kolon etkinliği değişmektedir.

Teorik tabaka sayısını elde edebilmek için aşığıdaki formül kullanılabilir:

$$N = 16 (t_R / W)^2 \quad (2.21)$$

$t_R$  : Alıkonma zamanı

$W$ : Pik zemin genişliği

Pik genişliğinin ölçülmesinde karşılaşılabilecek hatalardan kaçınmak için  $N$  değeri hesaplamada başka bir seçenek,  $W_{1/2}$ , yani yarı yükseklikteki pik genişliği değeri kullanılır. Böylece teorik tabaka sayısı aşığıdaki formülle ifade edilir.

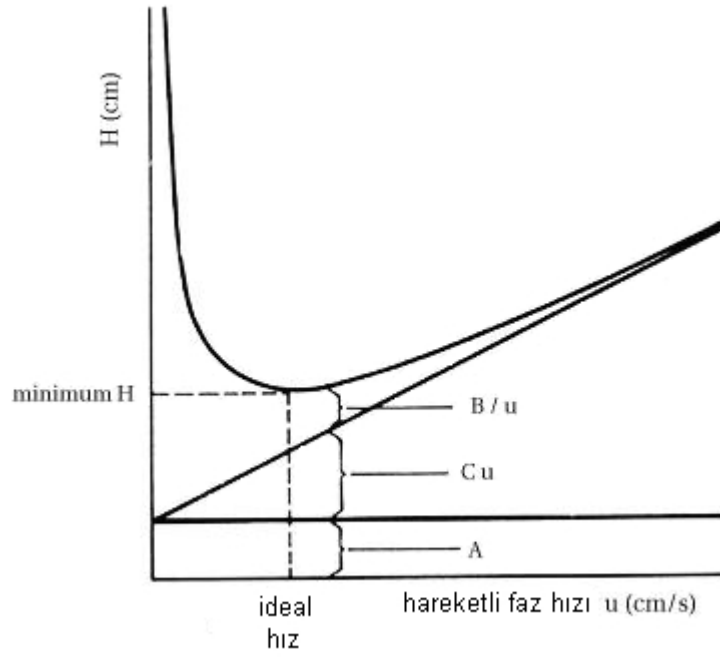
$$N = 5.54 (t_R / W_{1/2})^2 \quad (2.22)$$

Kromatografik kolondaki ayırma olaylarına matematiksel yaklaşım, 1950'li yıllarda Hollandalı kimya mühendisi Van Deemter'in kendi adı ile anılan eşitliğin bulunması ile sonuçlanan incelemeleri ile başlamıştır (Formül 2.23).

$$H = A + B/u + C u \quad (2.23)$$

- H: Teorik tabaka yüksekliği (cm)  
 A: Çoklu akış yolları ve Eddy difüzyonu  
 B: Boyuna difüzyon  
 C: Fazlar arasındaki kütle aktarımı  
 u: Çizgisel hız

Bir kromatografi kolonunun verimli çalışması için önce bu kolon için kullanılacak optimum akış hızının saptanması gerekir. H değerinin küçültülmesi için bir dizi önlem alınarak kolonun etkinliği artırılabilir. Formül 2.23'deki akış hızından bağımsız olan A değeri, madde moleküllerinin kolonda ilerlerken farklı yollar izlemesi nedeniyle büyür. Farklı uzunluktaki yolları izleyen madde moleküllerinin kolonda hızları da farklı olur. Bütün moleküllerin kolonun sonuna ulaşmasında bantta genişleme gözlenir. Bu olaya eddy difüzyonu denir. Kolon dolgu maddesinin çok küçük tanecikli olarak alınması ile A'nın değeri küçültülebilir. Formüldeki ikinci terim boyuna difüzyon terimi olup özellikle düşük akış hızlarında önem kazanır. Bu terimin katkısı, bileşenlerin hareketli faz içindeki difüzyon katsayılarının değerleri ile doğru orantılı olarak artar. B'nin değeri kolon sıcaklığının azaltılması ile küçülür. Kolona basınç uygulayarak da B'nin değerinin küçültülmesi mümkündür. Formülün üçüncü terimi yüksek akış hızlarında önem kazanan kütle aktarımı terimidir. Akış hızı arttıkça bileşenlerin iki faz arasında dağılma dengelerine ulaşabilmeleri için gereken süre azalır ve dolayısı ile dağılma dengesine tam olarak erişilemez. Bu terimdeki C değerinin küçültülebilmesi için hareketli sıvı fazın viskozitesinin az olması, kolon sıcaklığının artırılması, sabit faz ince bir sıvı film ile kaplıysa bu filmin kalınlığının çok küçük bir değere sahip olması gerekir (Şekil 2.15).



Şekil 2.15. Van Deemter eğrisi.

#### D. Ayırıcılık

Kromatografide amaç karışım içindeki maddeleri ayırmaktır. Ayırıcılık terimi ( $R_s$ ) bu amacın ne derecede gerçekleştiğinin bir ölçütüdür. Ayırıcılık teorik tanım olarak, alıkonma zamanları arasındaki farkın ortalama pik genişliğine oranıdır (Formül 2.24).

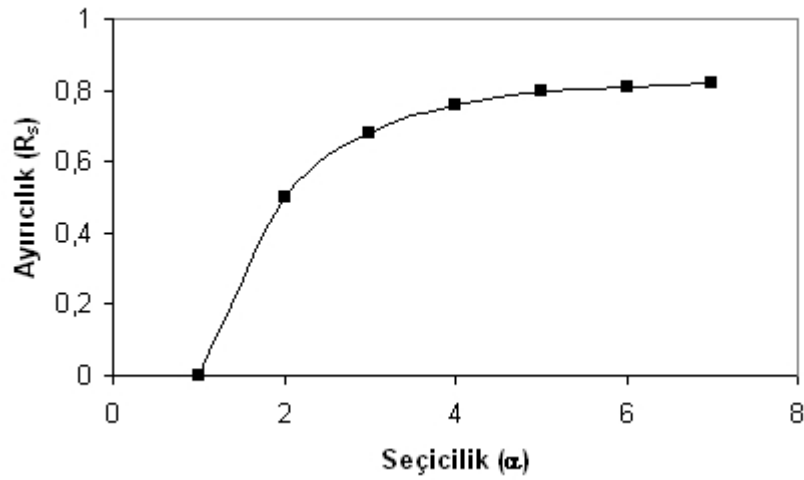
$$R_s = 2 (t_{R2} - t_{R1}) / (W_1 + W_2) \quad (2.24)$$

$R_s = 1.5$  olması halinde iki pik birbirinden tamamen ayrılmış sayılır. Nicel analizler için pikler arasındaki ayırıcılığın 1.5'den büyük ( $R_s \geq 1.5$ ) olması önerilir.

Formül 2.25'e göre ayırıcılığı etkileyen üç faktör; seçicilik ( $\alpha$ ), tabaka sayısı ( $N$ ) ve kapasite faktörü ( $k'$ )'dür.

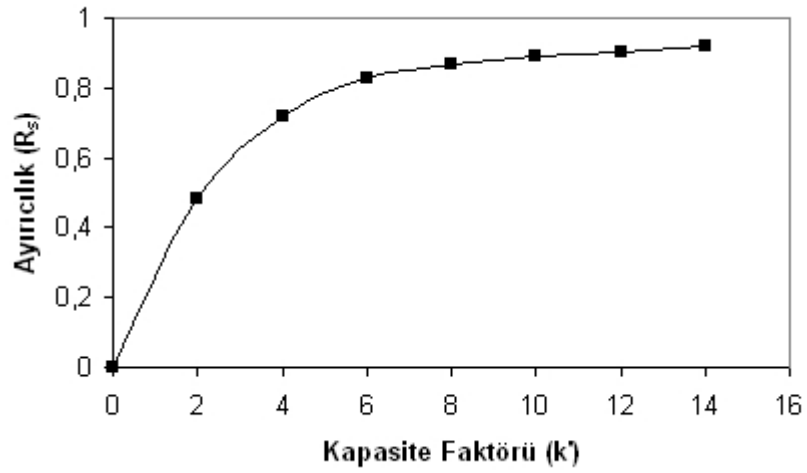
$$R_s = (1/4) [(\alpha-1) / \alpha] [k' / (k'+1)] N^{1/2} \quad (2.25)$$

**Seçiciliğin Ayırıcılık Üzerine Etkisi:** Formül 2.25'e göre, seçicilik arttıkça ayırıcılığın artması beklenir. Ancak seçiciliğin belli bir değerden sonra artması ayırıcılıkta çok fazla bir değişme yaratmaz (Şekil 2.16). Seçicilik 1'e eşit olduğu zaman iki madde arasında termodinamik olarak bir fark yoktur ( $K_1 = K_2$ ) ve dolayısıyla ayırım da gerçekleşmez. Bu nedenle kromatografik bir ayırımın başarılabilmesi için seçiciliğin 1'den büyük olması gerekir.



Şekil 2.16. Seçiciliğin ayırıcılık üzerine etkisi.

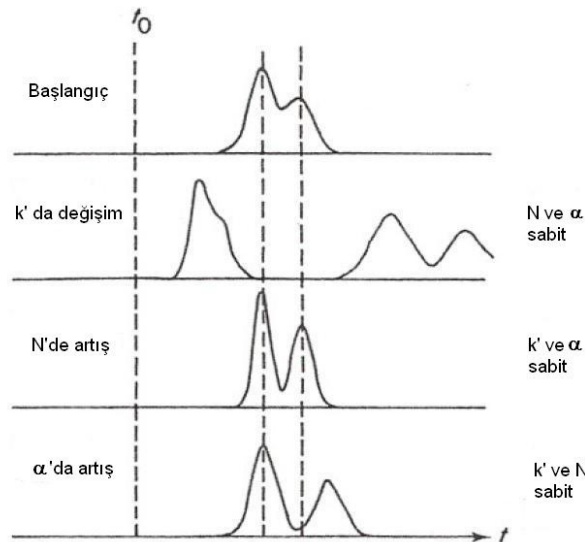
**Kapasite Faktörünün Ayırıcılık Üzerine Etkisi:** Kapasite faktörünün ( $k'$ ), ayırıcılığa etkisi Şekil 2.17'de verilmiştir. Grafikten de anlaşılabacağı gibi  $k' = 0$  olduğunda ayırım yoktur, ayrıca  $k'$  değeri arttıkça  $k' / (k'+1) \rightarrow 1$ 'e yaklaşır ve kapasite faktöründeki artışın ayırıcılığa etkisi kalmaz.  $k'$  değerini daha fazla arttırmak sadece alıkonma zamanını arttırır. Optimum  $k'$  değerleri 1-10 arasındadır.



Şekil 2.17. Kapasite faktörünün ayırıcılık üzerine etkisi.

**Etkinliğin Ayırıcılık Üzerine Etkisi:** Etkinlik faktörü; akış hızı, kolon uzunluğu veya dolgu maddesinin tanecik boyutu ile değişir. Ayırıcılık,  $N$ 'nin karekökünün bir fonksiyonu olduğu için  $N$ 'deki büyük artışlar ayırıcılıkta küçük değişiklikler meydana getirir. Etkinlik arttıkça ayırıcılık artar ve dar pikler elde edilir.

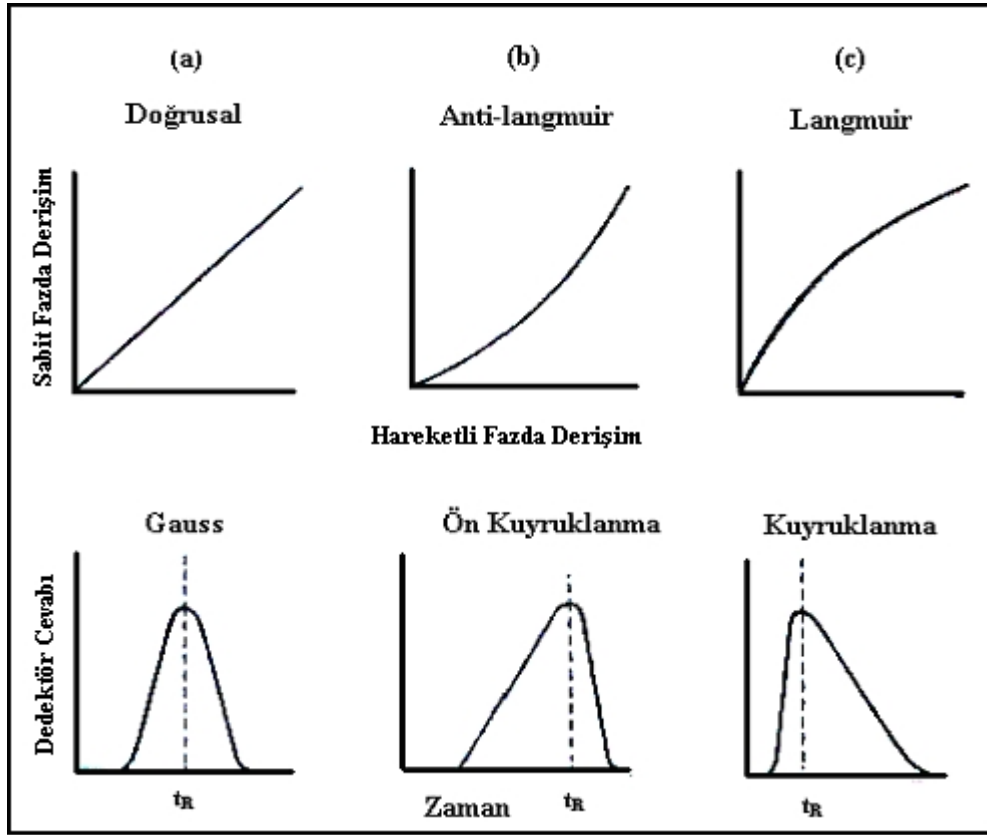
Şekil 2.18, kapasite faktörü, etkinlik ve seçiciliğin değiştirilmesinin kromatograma etkilerini göstermektedir.



Şekil 2.18. Kapasite faktörünün, etkinliğin ve seçiciliğin kromatogram üzerine etkisi.

### E. Pik Simetri Oranı

Analitin hareketli fazdaki denge derişimi ( $C_m$ ) sabit fazdaki denge derişimine ( $C_s$ ) karşı grafiğe geçirildiğinde bir dizi izoterm elde edilir. Şekil 2.19 a'daki izoterm doğrusal olup eğimi dağılım katsayısını ( $K$ ) verir. Bütün  $C_m$  değerlerinde  $K$  sabit olduğu için kromatografik bant bütün derişimlerde aynı hızda hareket eder ve simetrik bir elüsyon piki elde edilir.



Şekil 2.19. Temel üç izoterm şekilleri ile alıkonma zamanı ve pik şekline etkileri.

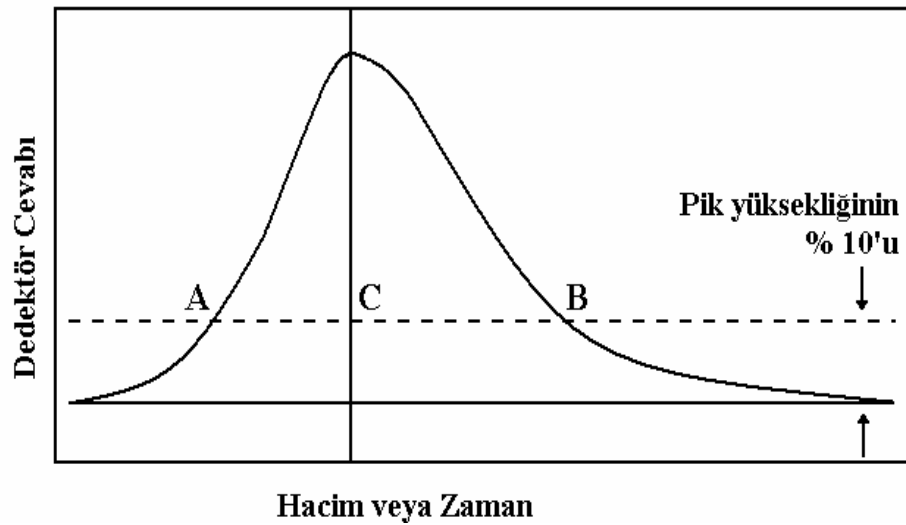
Dışbükey izoterm (Şekil 2.19 b), kolonda fazla miktarda madde olduğunu gösterir. Bu durumda sabit fazdaki madde-madde etkileşimleri madde-çözücü etkileşimlerinden daha baskındır. Bu durum  $K$  değerinin artmasına ve doğrusal olmayan izoterm elde edilmesine neden olur. Elüsyon eğrisinin önünde bir alan oluşur. Bu duruma ön kuyruklanma denir ve ayrılan maddenin alıkonma süresi derişimle artar.

Eğer moleküller arası kuvvetler maddeyi sabit faz yüzeyinde bir katman oluşturacak biçimde tutuyorsa izoterm içbükey olur (Şekil 2.19 c) ve elüsyon eğrisinde pik kuyruklanması görülür, böylece artan madde derişimiyle alıkonma zamanı azalır. Doğrusallıktan sapma nicel analizi güçleştirdiği ve alıkonma sürelerinin nitel analizde kullanımını engellediği için kromatografik koşullar simetrik elüsyon piki sağlanacak şekilde düzenlenir. Pik simetrisinin belirlenmesi için pik asimetri oranının hesaplanması, madde elüsyon pikinin çan (Gauss) eğrisi olup olmadığının denetlenmesi açısından önemlidir.

Pik asimetri oranı ( $A_s$ )

$$A_s = (CB / AC) \quad (2.26)$$

olarak verilir. CB ve AC uzunlukları Şekil 2.20’de tanımlanmıştır. Tam simetrik bir pik için  $A_s = 1$ ’dir. Pratikte 0.9-1.4 arasında  $A_s$  değerleri kabul edilmektedir (70,73, 75).



Şekil 2.20. Pik asimetri oranının hesaplanması

Genel olarak bir kromatogramda geç gelen pikler önce gelen piklere nazaran daha yayvan ve geniş olurlar. Alıkonma zamanının artması pik şeklinin bozulmasına neden olabileceğinden, bir pikin geç gelmesi istenen bir durum değildir. Böyle durumlarda pik şeklinde kuyruklanma da gözlenebilir. Alıkonma zamanının öne

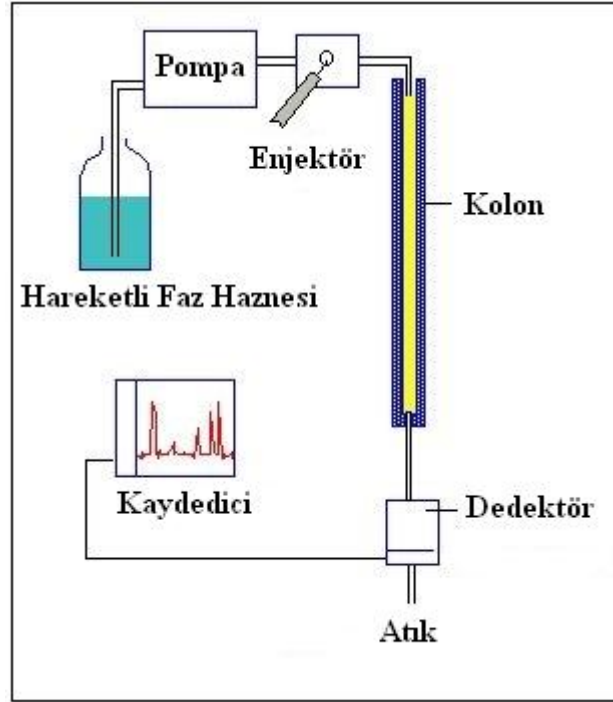
alınmasında hareketli faz bileşimi ve akış hızı değiştirilebilir ya da gradient elüsyon işlemi uygulanabilir.

#### **2.8.8. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) (63,72,73)**

Kromatografik ayırımın etkinliği, sabit fazdaki tanecik çapının ve kolon çapının küçültülmesi ile artmaktadır. Teknolojinin ilerlemesiyle ayırma işleminde tanecik çapı 3-10  $\mu\text{m}$  olan dolgu maddelerinin yaklaşık 5 mm çapındaki kolonlarda kullanılması mümkün olmuştur. Bu şartlar altında, kolon boyunca hareketli fazın ilerlemesini sağlamak için yüksek basınç gerekmektedir. Bu tür kolonlarda yüksek basınç altında (100-400 atm) gerçekleştirilen kromatografi türüne yüksek basınçlı (performanslı) sıvı kromatografisi (HPLC) adı verilir. Yüksek performans, yüksek hız ve yüksek ayırıcılığı ifade eder. HPLC, bütün analitik ayırma teknikleri arasında en yaygın kullanılanıdır. Yöntemin bu kadar yaygın olmasının sebepleri; duyarlılığı, doğruluğu, nicel analizlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan türlerin veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen türlerin ayrılmasına uygun olması ve hepsinden de önemlisi sanayinin, birçok bilim dalının ve halkın ilgilendiği maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir. Bu gibi maddelere örnek olarak; amino asitler, proteinler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, ilaçlar, metal-organik türler ve çeşitli inorganik bileşikler sayılabilir.

#### **A. HPLC Sistemi**

Şekil 2.21’de şematik olarak gösterilen bir HPLC cihazı temel olarak, hareketli faz haznesi, pompa, enjektör, kolon, dedektör ve kaydediciden oluşur.



Şekil 2.21. HPLC cihazının şematik gösterimi.

### Hareketli Faz Haznesi

Bir HPLC cihazı, bir veya daha fazla, her biri 200-1000 mL çözücü içeren camdan veya çelikten yapılmış hareketli faz hazneleri içerir. Bu hazneler çoğu zaman kolonda veya dedektör sisteminde bozucu etkilere neden olan çözünmüş gazların (özellikle oksijen ve azot) giderilmesi için bir bölüm (gaz giderici) ile donatılmıştır. Hareketli fazın cihaza verilmeden önce süzülmesi ve çözünmüş gazların giderilmesi gerekir. Süzme işlemi için 0.45-0.6  $\mu\text{m}$  çapında membran veya teflon filtreler kullanılır. Bu uygulama, süspansiyon halindeki maddeleri uzaklaştırmanın yanı sıra gazları da giderir. Sistemde gaz giderici yoksa, hareketli fazdaki gazları uzaklaştırmak amacıyla ultrasonikatörde bekletme veya çözücünden inert bir gaz geçirme işlemleri uygulanabilir.

Sabit bileşimde tek bir çözücü kullanılarak yapılan ayırma izokratik elüsyon olarak adlandırılır. Sisteme gönderilen hareketli faz bileşiminin veya akış hızının zamanla sürekli veya kesikli olarak değiştirilmesi ile yapılan ayırma işlemine gradient elüsyon denir. Elüsyon başladıktan sonra belli bir programa göre, bazen sürekli olarak, bazen de bir seri basamaklar şeklinde çözücülerin oranı değiştirilir. Modern HPLC cihazları, çözücülerin hacimsel oranı zamanla doğrusal olarak veya

üstel olarak değiştirilebilecek şekilde, iki veya daha fazla hazneden aldığı çözücülerini bir karıştırma odasında sürekli olarak değişen oranlarda bir araya getiren sistemlerle donatılmıştır. İzokratik elüsyon ile ayrılamayan maddeler gradient elüsyonla ayrılabilen, farklı kapasite faktörüne sahip madde karışımlarının alıkonma zamanları kısaltılabilmektedir.

Hareketli faz su ve/veya sulu tampon içeriyorsa kimyasal bozunmanın yanı sıra mikrobiyolojik üreme sonucunda kolonu tıkayabilir. Bu nedenle, HPLC analizleri sırasında taze hazırlanmış hareketli faz kullanılır.

### **Pompa**

Bir HPLC sisteminde pompanın görevi hareketli fazın kolon boyunca akışını sağlamaktır. Bir HPLC pompalama sistemi için gerekli şartlar şunlardır:

1. 400 atm'e kadar basınç üretimi,
2. Puls içermeyen basınç çıkışı,
3. 0.1-10 mL dk<sup>-1</sup> aralığında akış hızları,
4. % 0.5 veya daha iyi bir bağıl tekrarlanabilirlikle akış kontrolü,
5. Korozyona dayanıklı parçalar.

Bir HPLC sisteminde kullanılan pompalar sabit hacim pompaları ve sabit basınç pompaları olmak üzere iki ana başlıkta toplanabilir. Çalışma farklılığına bağlı olarak ise; pistonlu pompalar, şırınga pompalar ve pnömatik pompalar olmak üzere üçe ayrılırlar.

**a) Pistonlu pompalar:** Pistonlu pompalar, genellikle motor kontrollü bir pistonun ileri ve geri hareketiyle çözücünün pompalandığı küçük bir silindirden meydana gelmiştir. Pistonlu pompaların üstünlüğü, küçük iç hacimleri (35-400 µL), yüksek çıkış basıncı (700 atm'e kadar), gradient elüsyona uyarlanmaya hazır oluşları ve kolon geri basıncından ve çözücü viskozitesinden büyük ölçüde bağımsız olan sabit akış hızlarıdır.

**b) Şırınga pompalar:** Şırınga pompalar, bir kademeli motordan güç alan vidalı güdüm mekanizması ile kumanda edilen sızdırmaz bir sürgüsü olan, şırınga benzeri silindirik bir kaptan ibarettir. Bu pompalar da viskoziteden ve geri basınçtan bağımsız bir akış üretirler. Ayrıca çıkış akımı pulssuzdur. Dezavantajları; sınırlı

çözücü kapasitesi ( $\approx 250$  mL) ve çözücü değiştirilmesi gerektiğinde karşılaşılan güçlüklerdir.

**c) Pnömatik pompalar:** En basit pnömatik pompalarda, sıvı hareketli, sıkıştırılmış bir gaz ile basınçlandırılabilen bir kap içine yerleştirilmiş, portatif bir kap içine konur. Bu tip pompalar, pahalı değildir ve pulssuzdur, ancak kapasitesi sınırlı olup, çıkış basıncı düşüktür ve çıkış hızı çözücü viskozitesi ile kolon geri basıncına bağlıdır. Ayrıca bu pompalar gradient elüsyona uygun değildir ve basınçları 135 atm'den daha düşüktür.

### Enjektör

HPLC analizlerinde ölçümlerin kesinliğini belirleyen faktör, numunenin kolon dolgu maddesine gönderilmesinin tekrarlanabilirliğidir. Aşırı numune yüklenmiş kolonlarda görülen bant genişlemesi de kesinliği etkiler. Bu yüzden kullanılan hacim çok küçük olmalıdır ve sistemin basıncını düşürmeden numunenin sisteme girişinin sağlanması gereklidir.

Temel olarak, manuel ve otomatik olmak üzere iki tip enjektör vardır.

**a) Manuel enjeksiyon valfleri:** Enjeksiyon valfleri yüksek basınçlı bir ortama numune aktarmak amacıyla kullanılan sistemlerdir. Enjeksiyon valfinin numune yükleme ve enjeksiyon olmak üzere iki konumu vardır. Yükleme konumunda *loop* basınçlı ortamdan izole edilir ve bir şırınga yardımı ile istenilen numune miktarı *loop*'a doldurulur. Enjeksiyon konumunda *loop* tekrar yüksek basınçlı ortama dönerek numuneyi sisteme aktarır.

**b) Otomatik Enjektör:** Basit otomatik enjektörlerde, manuel enjeksiyon valfine benzer bir valf kullanılır. Bu sistemde numune şişesine azot basıncı uygulayarak *loop* doldurulur ve valfin dönmesi ile numune enjekte edilir. Enjeksiyon hacmi sabittir, *loop* hacmi ile sınırlıdır.

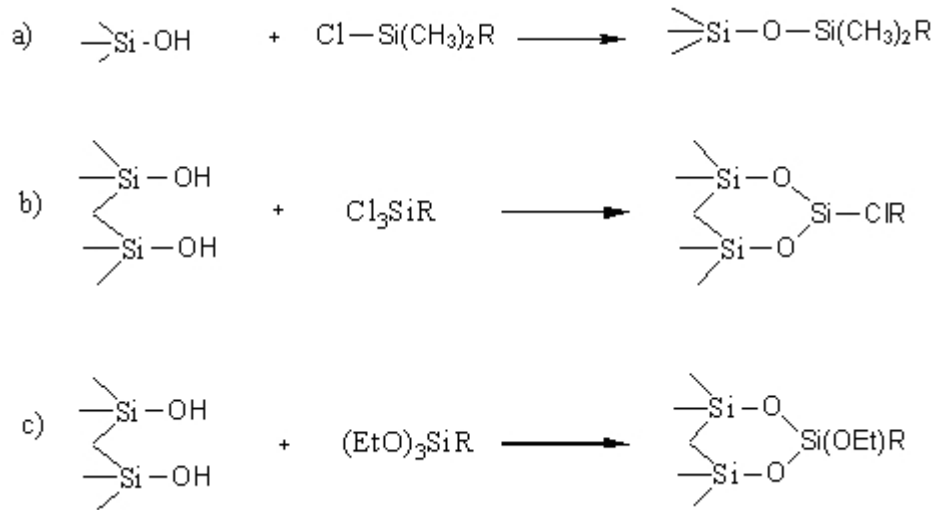
Programlanabilen otomatik enjeksiyon sistemleri, numune *loop*'unu doldurmak için hassas motor ile hareket ettirilen şırıngalar kullanılır. Enjektörle çekilen hacim kontrol edilerek istenilen miktarda numune *loop*'a doldurulur. Küçük miktarlardaki numune enjeksiyonları gerçekleştirilebilmekte ve numune kayıpları minimum olmaktadır. İstenilen sayıda enjeksiyon yapmak mümkündür.

### Kolon

HPLC kolonlarının çoğu paslanmaz çelikten yapılır. Pek çok üretici tarafından üretilen analitik kolonlar 2-5 mm iç çaplı, 5-30 cm boyundadır. Tanecik çapları ise 3-10 µm arasında değişmektedir.

Kolon dolgu maddeleri, film dolgular ve gözenekli dolgular olmak üzere iki tiptir. Film dolgular, gözenekli olmayan cam veya polimer tanelerinden oluşur. Yüzeylerine gözenekli yapıda silika, alümina veya iyon değiştirici reçineden oluşan ince bir gözenekli film kaplanmıştır. Gözenekli dolgular, silika, alümina ve iyon değiştirici reçineden yapılır. En çok kullanılan dolgu maddesi silikadır. Silika yüzeyine kimyasal veya fiziksel olarak ince organik bir film kaplanır.

Dağılma kromatografisinde en sık olarak silika temelli bağlı fazlar kullanılır. Silika temelli bağlı fazlar, yüzeyde bulunan silanol gruplarının organosilanlarla Şekil 2.22’de gösterilen reaksiyonları sonucu elde edilir. En çok kullanılan, klorodimetilsilanların yüzey silanol grupları ile reaksiyonudur. Ters faz sıvı kromatografisi için kullanılan çeşitli alkil ve substitüe alkil silikalar bu yolla elde edilir.



Şekil 2.22. Bağlı faz dolgu maddelerinin elde edilmesi. a) Yüzey silanolünün klorodimetilsilanla reaksiyonu, b) Yüzey silanollerinin trifonksiyonel klorosilanla reaksiyonu, c) Yüzey silanollerinin trifonksiyonel alkoksisisilanla reaksiyonu.

Bağılı faz dolguları, bağlanan katman apolar karakterde olduğu zaman ters faz olarak, bu katman polar fonksiyonlu gruplar içerdiği zaman ise normal faz olarak sınıflandırılırlar. Uzun alkil zincirli sabit fazlar ters faz sıvı kromatografisinde kullanılırlar.

Silika yüzeyinde kalan reaksiyona girmemiş artık silanoller, yüzeye istenmeyen bir polarlık verirler. Bu durum, özellikle bazik maddelerde kromatografi piklerinde kuyruklanmaya sebep olmaktadır. Bu etkiyi azaltmak için klorometilsilanla ek bir reaksiyon yapılarak artık silanoller kapatılır. Bu işleme *end-capped* denir.

Analitik kolonun kullanım ömrünü arttırmak amacıyla, analitik kolondan önce genellikle kısa bir kolon yerleştirilir. Bu kolonun görevi, sadece partikül haldeki maddeleri ve çözücü içindeki yabancı maddeleri tutmak değil, aynı zamanda numune içinde bulunan ve sabit faza tersinmez olarak bağlanan bileşenleri de tutmaktır. Ek olarak, bu ön kolonlar, hareketli fazı sabit fazla doyurarak analitik kolonda sabit sıvı faz kaybını en aza indirir.

Sıvı kromatografisinde kolon sıcaklığının kontrolü önemlidir. Özellikle ters faz ve iyon değiştirme kromatografisinde sıcaklığın alıkonma zamanına ve tekrarlanabilirliğe etkisi anlamlıdır. Bir çok HPLC cihazı, kolon sıcaklığını oda sıcaklığından 100-150 °C'ye kadar her sıcaklıkta sabit tutabilen kolon ısıtıcıları ile donatılmıştır.

### **Dedektör**

HPLC sisteminin en önemli parçalarından biridir ve iki grup altında toplanırlar:

#### ***a) Maddeye Yönelik Dedektörler***

Hareketli faz içindeki maddenin özelliklerini tayin ederler ve en yaygın kullanılan türleri aşağıda verilmiştir:

1. Fotometrik dedektörler (UV/GB, Floresans, dizi diyot, Infrared)
2. Elektrokimyasal dedektörler
3. Ayırım sonrası tepkime dedektörleri
4. Radyoaktivite dedektörleri
5. Kütle spektrometreleri

### ***b) Çözeltiye Yönelik Dedektörler***

Örnek özelliklerinin ölçülmesine yönelik dedektörlerdir ve aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir:

1. Refraktif indeks dedektörleri
2. Dielektrik sabiti dedektörleri
3. İletkenlik dedektörleri
4. Yoğunluk dedektörleri

Dedektör seçimi numunenin kimyasal yapısına ve yöntemin gereksinimlerine bağlıdır. Numune bileşenleri kromofor gruplar içeriyorsa, UV/GB dedektör ilk tercih olacaktır. Bununla birlikte, bir veya daha fazla bileşen UV/GB ışığı absorplamıyorsa alternatif dedektörler düşünülmelidir. Eser miktarda analizlerde floresans veya elektrokimyasal dedektör kullanılmalıdır. Preparatif çalışmalarda genellikle refraktif indeks dedektörler, cevap aralığı aşılmadan yüksek derişimlerin kullanılabilmesi nedeniyle tercih edilir.

Bu çalışmada UV/GB dedektörü kullanıldığından, sadece bu dedektörden bahsedilecektir.

#### ***UV/GB Dedektör***

Yüksek duyarlılığı, geniş bir doğrusal aralığa sahip olması, sıcaklık dalgalanmalarından nispeten etkilenmemesi ve gradient elüsyon için uygun olması nedeniyle UV-GB dedektörleri en sık kullanılan dedektör tipidir. Bu dedektörler, maddenin ultraviyole veya görünür bölge ışığı absorpsiyonu temeline dayanır. Ayrıca, UV-GB dedektörleri bir ya da daha fazla dalga boyunda ölçüm yapabilme olanağı da sağlar. Değişken dalga boyunda ışın yayabilen dedektörlerde 190-400 nm aralığında döteryum lambası, 350-700 nm aralığında kuartz-iyot/tungsten lambası kullanılmaktadır.

Dizi diyot dedektör (DAD) bir tür gelişmiş UV/GB dedektörüdür. Optik sistemi, döteryum lambasından yayılan polikromatik ışığı, akış hücresinin üzerine yollar. Bu ışık daha sonra optik ağ üzerinde dağılır ve çok sayıda diyottan oluşan foto diyot dizisi üzerine düşer. Analiz edilecek maddelerin maksimum dalga boyları farklı olduğunda DAD'ler birden fazla dalga boyunda ölçüm alabilir. Kromatografik piklerin saflık kontrolünde veya birden fazla pikten oluşup oluşmadıklarının

taininde oldukça sık kullanılır. Bu amaçla, piklerin elüsyonu sırasında birkaç spektrum kayıt edilerek, spektrumlar üst üste konup karşılaştırılabilir. Bütün dalga boylarında spektrumlar üst üste çakışıyorsa madde piki saftır. Eğer enjekte edilen piklerin sayısından daha az pik elde edilmişse saflık kontrolleri yararlı ipuçları verir.

### **Kaydedici**

Mikroişlemciler ve bilgisayarların kullanıldığı sistemlerde hareketli faz akış hızı, enjektör, kolon fırını, örnek alma sistemi, dedektör ve veri kaydı sistemi merkezi bir veri kayıt cihazı ile kontrol edilmektedir. Mikroişlemciler ve bilgisayarların kullanılması kromatografik sistemde tekrarlanabilirliği arttırmakta, sistem validasyon parametrelerinde daha doğru değerler elde edilmesine olanak sağlamaktadır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Rosiglitazon ( $C_{18}H_{19}N_3O_3S.C_4H_4O_4$ , GlaxoSmithKline)
- Metformin ( $C_4H_{11}N_5.HCl$ , Sigma)
- Verapamil ( $C_{25}H_{28}N_2O_4$ , Acros)
- Metil paraben ( $C_8H_8O_3$ , Aklar Kimya)
- Metanol ( $CH_3OH$ , Merck)
- Asetonitril ( $CH_3CN$ , Riedel-deHaen)
- Glasiyel asetik asit ( $CH_3COOH$ , Merck)
- Sodyum asetat ( $CH_3COONa$ , Merck)
- Potasyum dihidrojen fosfat ( $KH_2PO_4$ , Merck)
- Disodyum hidrojen fosfat ( $Na_2HPO_4.2H_2O$ , Merck)
- Sodyum dodesil sülfat ( $C_{12}H_{25}O_4SNa$ , Sigma)
- Sodyum hidroksit ( $NaOH$ , Merck)
- Ortofosforik asit ( $H_3PO_4$ , J.T. Baker)
- Hidroklorik asit ( $HCl$ , Merck)
- Nitrik asit ( $HNO_3$ , Birpa)

#### 3.2. Kullanılan Cihazlar

- CE cihazı (Agilent  $^{3D}$ CE)
- HPLC cihazı (Thermo Separation Products)
- HPLC cihazı (Shimadzu)
- UV spektrofotometre (Agilent 8453)
- Erime noktası tayin cihazı (Büchi 535)
- pH metre (Mettler Toledo MA 235)
- Hassas terazi (Mettler Toledo AG 285)
- Terazi (Shimadzu Libror EB-330H)
- Ultrasonik banyo (Bandelin, Sonorex, RK514 BH)
- Santrifüj (Hettich, EBA 20)
- Vorteks karıştırıcı (IDL RS2)
- Saf su sistemi (Barnstead NanoPure Diamond)

- Otomatik mikropipet (Biohit)
- Derin donduruculu buzdolabı (Bosch)

### 3.3. Kullanılan Cam Malzemeler ve Diğer Sarf Malzemeleri

- Eritilmiş silika kapiler (Agilent, 80.5 x 75 µm i.ç., 72 cm etkin uzunluk)
- HPLC kolonu (Ace 5, fenil, 250 mm x 4.60 mm i.ç., 5 µm)
- HPLC kolonu (Phenomenex, Nucleosil C<sub>18</sub>, 150 mm x 4.60 mm i.ç., 5 µm)
- HPLC ön kolonu (Phenomenex, fenil, 4.0 x 3.0 mm)
- Vial (Agilent, cam, 1 mL)
- Şırınga filtresi (Titan, Selüloz, 0.45 µm, 25 mm)
- Membran filtre (Advantec MFS, Naylon, 0.45 µm, 47 mm)
- Enjektör (Hamilton, 50 µL)
- Katı faz ekstraksiyon kartuşu (Waters Oasis HLB 1 mL/30 mg)
- Katı faz ekstraksiyon kartuşu (Macherey-Nagel, C<sub>18</sub> ve C<sub>8</sub>, 1 mL/100 mg)
- Eppendorf tüp (Polipropilen, 1.5 mL)
- Balon joje (İldam)
- Cam santrifüj tüpü (İldam)
- Mezür (Bomex, 100 mL)
- Beher (İldam)
- Havan (Cam)
- Spatül (Metal)
- Tartım kabı (Cam)
- Otomatik pipet ucu (100 ve 1000 µL)

### 3.4. Farmasötik Preparatlar

Bu çalışmada kullanılan Avandamet<sup>®</sup> tabletler GlaxoSmithKline A.Ş.'den temin edilmiştir.

### 3.5. Kullanılan Standart Maddelerin Saflığının Araştırılması

ROS ve MET standartlarının saflık kontrolleri sağlandıkları firmalar tarafından yapılmıştır. Her iki maddenin de saflıkları, erime noktası tayini yapılarak tekrar kontrol edilmiştir.

### 3.6. Çözeltilerin Hazırlanması

***Stok ROS Çözeltisi ( $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ):*** 25 mg standart ROS tartılıp 10 mL metanol ile çözüldükten sonra aynı çözücü ile 25 mL'ye tamamlanmış ve 4 °C'de buzdolabında saklanmıştır. Standart ROS çözeltileri, bu stok çözeltiden istenen derişime CE yönteminde çalışma tamponu ile, HPLC yönteminde ise hareketli faz ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

***Stok MET Çözeltisi ( $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ):*** 25 mg standart MET tartılıp 10 mL su ile çözüldükten sonra aynı çözücü ile 25 mL'ye tamamlanmış ve 4 °C'de buzdolabında saklanmıştır. Standart MET çözeltileri, bu stok çözeltiden istenen derişime CE yönteminde çalışma tamponu ile, HPLC yönteminde ise hareketli faz ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

***Stok Verapamil Çözeltisi ( $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ):*** 25 mg standart verapamil tartılıp 10 mL su ile çözüldükten sonra aynı çözücü ile 25 mL'ye tamamlanmış ve 4 °C'de buzdolabında saklanmıştır. Standart verapamil çözeltileri, bu stok çözeltiden istenen derişime CE yönteminde çalışma tamponu ile, HPLC yönteminde ise hareketli faz ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

***250 mM Sodyum Asetat Çözeltisi (CE Yöntemi için):*** 1.025 g sodyum asetat ( $M_A=82.03 \text{ g/mol}$ ) tartılıp bir miktar suda çözüldükten sonra aynı çözücü ile 50 mL'ye tamamlanmıştır.

***5 mM Sodyum Asetat Çözeltisi (HPLC Yöntemi için):*** 0.205 g sodyum asetat ( $M_A=82.03 \text{ g/mol}$ ) tartılıp bir miktar suda çözüldükten sonra aynı çözücü ile 500 mL'ye tamamlanmıştır.

***1 M Glasiyel Asetik Asit:*** Balon joje içerisine bir miktar su konulduktan sonra üzerine 5.7 mL derişik glasiyel asetik asit çözeltisi eklenmiş ve su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

***10 mM Potasyum dihidrojenfosfat Çözeltisi:*** 0.340 g potasyum dihidrojen fosfat ( $M_A=136.09 \text{ g/mol}$ ) tartılıp bir miktar suda çözüldükten sonra aynı çözücü ile 250 mL'ye tamamlanmıştır.

**10 mM Disodyum hidrojenfosfat Çözeltisi:** 0.178 g disodyum hidrojen fosfat ( $M_A=177.99$  g/mol) tartılıp bir miktar suda çözüldükten sonra aynı çözücü ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

**1 M Sodyum Hidroksit Çözeltisi:** 10.0 g NaOH ( $M_A=40.0$  g/mol) tartılarak su ile çözüldükten sonra hacim 250 mL'ye tamamlanmıştır.

**2 M Nitrik Asit Çözeltisi:** Balon joje içerisine bir miktar su konulduktan sonra üzerine 170.4 mL derişik % 55'lik nitrik asit çözeltisi eklenmiş ve su ile bir litreye tamamlanmıştır.

**CE Yönteminde Çalışma Tamponu Hazırlanması:** 250 mM sodyum asetat çözeltisinden 1 mL alınıp 10 mL'lik balon jojeye aktararak üzerine bir miktar su eklenmiştir. Derişik glasiyel asetik asitle pH 4.0'e ayarlandıktan sonra 10 mL'ye su ile tamamlanmıştır.

**HPLC Yönteminde Hareketli Faz Hazırlanması (farmasötik preparat analizi için):** Günlük hazırlanmış 10 mM  $KH_2PO_4$  çözeltisinin pH'ı 10 mM  $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$  çözeltisi ile 5.5'a ayarlandıktan sonra tampon:asetonitril oranı hacimce 30:70 olacak şekilde asetonitril ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

**HPLC Yönteminde Hareketli Faz Hazırlanması (biyolojik materyal analizi için):** Günlük hazırlanmış 5 mM sodyum asetat çözeltisinin pH'ı 1 M glasiyel asetik asitle 5.5'a ayarlanmıştır. Gradient elüsyon için bu çözelti ve asetonitril farklı hareketli faz haznelerine konulmuştur.

CE yönteminde kullanılan bütün çözeltiler 0.45  $\mu$ m'lik şırınga filtresinden geçirildikten ve ultrasonik banyoda 5 dk bekletilerek çözünmüş gazlar uzaklaştırıldıktan sonra kullanılmıştır.

HPLC yönteminde kullanılan bütün çözeltiler membran filtreden geçirildikten ve ultrasonik banyoda 15 dk bekletilerek çözünmüş gazlar uzaklaştırıldıktan sonra kullanılmıştır.

### 3.7. Farmasötik Preparat Çözeltilerinin Hazırlanması

10 adet tablet tartılarak havanda toz haline getirilmiştir. Bir tablete eşdeğer miktarda tartılan toz 100 mL'lik balon jojeye aktararak üzerine yaklaşık 75 mL

metanol eklenmiş ve ultrasonik banyoda 15 dk bekletilmiştir. Daha sonra hacim metanolla 100 mL'ye tamamlanmıştır. Bu çözeltiden bir miktar santrifüj tüpüne aktararak 5000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir.

Bu işlem, 1 mg ROS / 500 mg MET içerdiği belirtilen tabletlere uygulandığında, 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ROS ve 5000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  MET, 2 mg ROS / 500 mg MET içerdiği belirtilen tabletlere uygulandığında 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ROS ve 5000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  MET, 4 mg ROS / 500 mg MET içerdiği belirtilen tabletlere uygulandığında ise 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ROS ve 5000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  MET içermesi gereken çözeltiler elde edilmiştir. CE yönteminde, bu çözeltilerden 100  $\mu\text{L}$  ve 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  VER stok çözeltisinden 20.0  $\mu\text{L}$  alınıp viallere aktarılmış ve çalışma tamponu ile 1000  $\mu\text{L}$ 'ye tamamlandıktan sonra analiz yöntemi uygulanmıştır. HPLC yönteminde ise bu çözeltilerden 10  $\mu\text{L}$  ve 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  VER stok çözeltisinden 25.0  $\mu\text{L}$  alınıp viallere aktarılmış ve hareketli faz ile 1000  $\mu\text{L}$ 'ye tamamlandıktan sonra sisteme enjekte edilmiştir.

### 3.8. Sentetik Preparatların Hazırlanması

Hipromelloz 2910, laktoz monohidrat, magnezyum stearat, mikrokristalin selüloz, polietilen glikol 400, povidon 29-32, sodyum nişasta glikolat, titanyum dioksit ve kırmızı demir oksit belirli miktarlarda tartılıp, bu karışıma standart ROS ve MET'den bilinen miktarlarda (1 mg ROS / 500 mg MET, 2 mg ROS / 500 mg MET ve 4 mg ROS / 500 mg MET) eklenerek üç farklı sentetik tablet çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan sentetik tablet çözeltilerinin analize hazır hale getirilmesi için Bölüm 3.7.'de anlatılan farmasötik preparatlara yapılan işlemler uygulanmıştır. Plasebo çözeltisi ise yukarıda belirtilen yardımcı maddelere ROS ve MET eklenmeden hazırlanmıştır.

### 3.9. Kullanılan Malzemelerin Temizliği

#### 3.9.1. Cam Malzemelerin Temizlenmesi

Kullanılan cam malzemeler çeşme suyu ve deterjanlı su ile yıkandıktan sonra çeşme suyu ile durulanmıştır. Daha sonra 2 N  $\text{HNO}_3$  çözeltisi içinde en az bir gece bekletilmiş ve tekrar deiyonize su ile yıkanarak oda sıcaklığında kurutulmuştur.

#### 3.9.2. Kapilerin Temizlenmesi

Çalışma sonrasında cihaz kapatılmadan önce kapilerden 20 dk su geçirilerek

temizlenmiştir. Analizlere uzun süre ara verileceği zaman, temizlendikten sonra kapilerden 30 dk hava geçirilerek kurutulmuştur.

### 3.9.3. HPLC Kolonunun Temizlenmesi

HPLC sisteminde kullanılan kolondan çalışma öncesi 30 dk deiyonize su geçirildikten sonra hareketli faza geçilmiştir. Çalışma sonrasında ise kolon 30 dk deiyonize su ve 30 dk metanol geçirilmesi ile temizlenmiştir. Kolonun yıkama aşamalarında akış hızı 1 mL dk<sup>-1</sup>'dir.

## 3.10. Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi

### 3.10.1. CE Yöntemi ile Yapılan Çalışmalar

#### A. Kapilerin Şartlandırılması

Analizler, Agilent <sup>3D</sup>CE marka CE sisteminde 75 µm iç çaplı eritilmiş silika kapiler kullanılarak yapılmıştır. Kapilerin toplam uzunluğu 80.5 cm, etkin uzunluğu 72 cm'dir.

Kapilerin ilk kullanımında 30 dk 1 M NaOH ve 20 dk su geçirilmiştir. Her çalışma gününün başlangıcında, 15 dk 0.1 M NaOH, 10 dk su ve 10 dk çalışma tamponu geçirilmiştir. Her enjeksiyon öncesinde de, 0.1 M NaOH'un 2 dk, suyun 2 dk ve çalışma tamponunun 4 dk geçirilmesini içeren bir ön şartlandırma programı uygulanmıştır (64).

#### B. Yöntemin Optimizasyonu

ROS ve MET'in aynı anda analizi için seçilen CZE yönteminde çalışma tamponuna (çalışma tamponu türü, pH'ı, derişimi ve organik çözücü etkisi) ve cihaza (enjeksiyon süresi, uygulanan voltaj, analiz sıcaklığı ve dedektör dalga boyu) ait parametrelerin değiştirilmesi ile uygun şartlar araştırılmıştır. Bu çalışmalar sırasında ROS, MET ve iç standart (İS) olarak seçilen verapamil'in (VER) derişimi 10 µg mL<sup>-1</sup> olarak alınmıştır.

#### C. Deneyin Yapılışı

Bölüm 3.10.1.A'da anlatıldığı gibi kapiler enjeksiyon öncesi şartlandırıldıktan sonra ROS, MET ve VER içeren örnek 3 sn, 50 mbar basınçla hidrodinamik olarak enjekte edilmiştir. Daha sonra kapiler uçları çalışma tamponu

(25 mM pH 4.0 asetat tamponu) çözeltisine daldırılarak 25 °C’de 25 kV potansiyel uygulanıp dizi diyot dedektörle 203 nm’de analizler gerçekleştirilmiştir.

### **3.10.2. HPLC Yöntemi ile Yapılan Çalışmalar**

#### **A. Yöntemin Optimizasyonu**

ROS ve MET’in HPLC ile farmasötik preparatlardan aynı anda analizi için kromatografik koşullar optimize edilmiştir. Bu amaçla sabit faz seçimi, hareketli fazın bileşimi, pH’ı ve akış hızının ROS ve MET’in kromatografik davranışı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu çalışmalar sırasında ROS ve MET’in derişimi  $2.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , İS olarak seçilen VER’in ise  $10.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ’dir.

#### **B. Deneyin Yapılışı**

Analiz, Thermo Separation Products marka HPLC sisteminde Ace 5 fenil kolonda (250 x 4.6 mm i.ç., 5  $\mu\text{m}$ ), ön kolon olarak Phenomenex fenil kartuş (4.0 x 3.0 mm i.ç.) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Farmasötik preparatların analizinde, hareketli faz olarak asetonitril : 10 mM pH 5.5 fosfat tamponu (70:30, h/h) kullanılmıştır. Akış hızı 1 mL dk<sup>-1</sup>’dır.

Enjeksiyon manuel olup hacmi 20  $\mu\text{L}$ ’dir. Kromatogramlar UV dedektör kullanılarak 245 nm’de elde edilmiştir.

Analiz öncesi kolondan sırasıyla su ve hareketli faz geçirilerek kolonun dengelenmesi sağlanmıştır. Bunun için gürültünün en aza indiği zemin değeri elde edilinceye kadar hareketli faz geçirilmiş ve analizlere başlanmıştır. Çalışma sonunda kolon, Bölüm 3.9.3’de anlatıldığı gibi temizlenmiştir.

### **3.11. Geliştirilen Yöntemlerin Validasyonu**

Geliştirilen yöntemlerin geçerliliğinin kanıtlanması için kararlılık, doğrusallık, duyarlılık, kesinlik, doğruluk, geri kazanım, özgünlük, sağlamlık ve tutarlılık gibi validasyon parametreleri incelenmiş ve istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır (77-83).

#### **Kararlılık**

ROS ve MET’in kısa dönem kararlılığını test etmek için, stok çözelti-lerden hazırlanan çözelti-ler 24 saat boyunca oda sıcaklığında saklanmıştır. Bu süre sonunda

geliştirilen her iki yöntemle de ROS ve MET'in UV spektrumları ve dedektör cevapları taze çözeltilerinkilerle karşılaştırılmıştır.

ROS ve MET'in uzun dönem kararlılığını test etmek için, 4 °C'de saklanan 1000 µg mL<sup>-1</sup>'lik stok çözeltilerinin kararlılığı 4 ay boyunca çeşitli zaman aralıklarında değerlendirilmiştir. Bu çözeltilerden 20 µg mL<sup>-1</sup>'lik çözeltiler hazırlanarak UV spektrumları alınmış ve taze hazırlanmış çözeltilerin spektrumları ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca geliştirilen her iki yöntemle de ROS ve MET'in dedektör cevaplarındaki değişiklikler izlenmiştir.

### **Doğrusallık**

CZE yönteminde, 1.0 µg mL<sup>-1</sup> ROS - 100.0 µg mL<sup>-1</sup> MET, 2.0 µg mL<sup>-1</sup> ROS - 200.0 µg mL<sup>-1</sup> MET, 4.0 µg mL<sup>-1</sup> ROS - 400.0 µg mL<sup>-1</sup> MET, 6.0 µg mL<sup>-1</sup> ROS - 600.0 µg mL<sup>-1</sup> MET, 8.0 µg mL<sup>-1</sup> ROS - 800.0 µg mL<sup>-1</sup> MET, 10.0 µg mL<sup>-1</sup> ROS - 1000.0 µg mL<sup>-1</sup> MET ve 12.0 µg mL<sup>-1</sup> ROS - 1200.0 µg mL<sup>-1</sup> MET içeren çözeltiler, stok ROS ve MET çözeltilerinden gerekli miktarlar alınıp her bir çözeltinin içine 1000 µg mL<sup>-1</sup> VER stok çözeltisinden 20.0 µL eklendikten sonra 1000 µL'ye çalışma tamponu ile tamamlanarak hazırlanmıştır. Kalibrasyon eğrileri, derişime karşı pik normalizasyon oranları [(pik alanı ROS veya MET / göç zamanı ROS veya MET) / (pik alanı VER / göç zamanı VER)] grafiğe geçirilerek oluşturulmuştur.

Farmasötik preparat analizi için geliştirilen HPLC yönteminde, 0.05 µg mL<sup>-1</sup> ROS - 5.0 µg mL<sup>-1</sup> MET, 0.1 µg mL<sup>-1</sup> ROS - 10.0 µg mL<sup>-1</sup> MET, 0.2 µg mL<sup>-1</sup> ROS - 20.0 µg mL<sup>-1</sup> MET, 0.4 µg mL<sup>-1</sup> ROS - 30.0 µg mL<sup>-1</sup> MET, 0.6 µg mL<sup>-1</sup> ROS - 40.0 µg mL<sup>-1</sup> MET, 0.8 µg mL<sup>-1</sup> ROS - 50.0 µg mL<sup>-1</sup> MET, 1.0 µg mL<sup>-1</sup> ROS - 60.0 µg mL<sup>-1</sup> MET ve 1.2 µg mL<sup>-1</sup> ROS - 80.0 µg mL<sup>-1</sup> MET içeren çözeltiler, stok ROS ve MET çözeltilerinden gerekli miktarlar alınıp her bir çözeltinin içine 200 µg mL<sup>-1</sup> VER stok çözeltisinden 25.0 µL eklendikten sonra 1000 µL'ye hareketli faz ile tamamlanarak hazırlanmıştır. Kalibrasyon eğrileri, derişime karşı pik alan oranları (pik alanı ROS veya MET / pik alanı VER) grafiğe geçirilerek oluşturulmuştur.

Her iki yöntemde de kalibrasyon eğrisine ait regresyon denklemi ve korrelasyon katsayısı hesaplanmıştır. İstatistiksel olarak korrelasyon katsayısının ve doğrusallıktan ayrılışın önem kontrolü testleri yapılmıştır (82).

### **Duyarlılık**

LOD, sinyal/gürültü (S/G) oranının 3 olduğu derişimdir (77-81).

LOQ, kabul edilebilir doğruluk ve kesinlik değerlerinde ( $\leq \%20$ ) tayin edilebilen en düşük derişim değeri olarak tanımlanmaktadır (78). Kalibrasyon eğrilerindeki en düşük derişimler için, bağıl standart sapma (BSS) ve bağıl hata % 20'nin altında bulunduğundan, kalibrasyon eğrisindeki en düşük derişim değeri LOQ olarak kabul edilmiştir.

### **Kesinlik**

Kesinlik çalışmaları için, öncelikle cihaz veya enjeksiyon tekrarlanabilirliği olarak adlandırılan çalışma yapılmıştır. Bu amaçla, doğrusal aralık içerisinde bir derişim değeri hazırlanan (CZE yönteminde  $20.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  ROS ve MET, HPLC yönteminde  $2.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  ROS ve MET) aynı standart çözeltiden 10 enjeksiyon yapılmış ve her iki cihazda da cihaz parametreleri değerlendirilmiştir. Sonuçlar, ortalama, standart hata (SH), standart sapma (SS) ve bağıl standart sapma (BSS) ile verilmiştir.

Yöntemlerin tekrarlanabilirlik çalışmaları için; geliştirilen yöntemlerde doğrusallık aralığına giren bir derişim seviyesinde (CZE yönteminde  $10.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  ROS ve MET, HPLC yönteminde  $2.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  ROS ve MET) on ayrı çözelti hazırlanmış ve bunların aynı gün içinde tekrarlı analizleri yapılmıştır. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Yöntemlerin kesinliği için, ayrıca gün içi ve günler arası çalışmalar yapılmıştır. Gün içi çalışmalarda, doğrusallık aralığına giren 3 farklı derişim seviyesinde (CZE yönteminde ROS için  $2.0$ ,  $6.0$  ve  $10.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , MET için  $200.0$ ,  $600.0$  ve  $1000.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , HPLC yönteminde ROS için  $0.1$ ,  $0.4$  ve  $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , MET için  $10.0$ ,  $30.0$  ve  $60.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) 6'şar çözelti hazırlanmış ve bu çözeltiler aynı gün içinde 3 tekrarlı olarak analiz edilmiştir. Günler arası çalışmalarda, 6 farklı günde ve 3 farklı derişim seviyesinde hazırlanan çözeltiler kullanılarak 3 tekrarlı analizler yapılmıştır. Kesinlik sonuçları, ortalama, SH, SS, BSS ve güven aralığı ile verilmiştir.

### **Doğruluk**

Doğruluk, ilk olarak gün içi ve günler arası çalışmalar yapılarak

belirlenmiştir. Gün içi çalışmalarda, doğrusallık aralığına giren 3 farklı derişim (CZE yönteminde ROS için 2.0, 6.0 ve 10.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , MET için 200.0, 600.0 ve 1000.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , HPLC yönteminde ROS için 0.1, 0.4 ve 1.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , MET için 10.0, 30.0 ve 60.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) seviyesinde 6'şar çözelti hazırlanmış ve bu çözeltiler aynı gün içinde 3 tekrarlı olarak analiz edilmiştir. Günler arası çalışmalarda, 6 farklı günde ve 3 farklı derişim seviyesinde hazırlanan çözeltiler kullanılarak 3 tekrarlı analizler yapılmıştır. Doğruluk, eklenen standart madde miktarları ile bulunan standart madde miktarları karşılaştırılarak % bağıl hata değerlerinin hesaplanması ile değerlendirilmiştir.

Doğruluğun kanıtlanması için diğeri bir yol da, sonuçların doğruluğu kanıtlanmış, kaynaklarda bulunan başka bir yöntemle karşılaştırılmasıdır. Bu amaçla, geliştirilen CZE yönteminin 3 farklı dozaj formundaki farmasötik preparatlara uygulanmasıyla bulunan analiz sonuçları, kaynaklarda bulunan HPLC yönteminin (53) aynı farmasötik preparatlara uygulanmasıyla bulunan analiz sonuçlarıyla istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. t testi uygulanarak yöntemler arasında fark olup olmadığı araştırılmıştır (83). Ayrıca geliştirilen HPLC yöntemi ile yapılan 2 mg ROS / 500 mg MET içeren farmasötik preparatların analiz sonuçları da, diğeri iki yöntemle bulunan analiz sonuçları ile tek yönlü varyans analizi uygulanarak istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (83).

### **Geri Kazanım**

Sentetik preparatlar hazırlanarak geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bölüm 3.8'de hazırlanışı anlatılan sentetik preparatların analizi, 3 farklı dozaj formunda 6'şar çözelti hazırlanarak CZE ve HPLC yöntemleriyle sırasıyla bölüm 3.10.1. C'de ve 3.10.2. B'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

### **Özgünlük (Seçicilik)**

Özgünlük, olası bütün matriks bileşenlerinin varlığında ROS ve MET'in cevaplarının incelenmesi ile gösterilmiştir. Bunun için farmasötik preparat analizinde plasebo, sentetik preparat, tablet ve standart maddelerin hazırlanan çözeltilerinin elektroferogramları ve kromatogramları karşılaştırılarak özgünlük kanıtlanmıştır.

Ayrıca yöntemin özgünlüğü, standart ekleme yöntemi ile elde edilen doğruların eğimleri, kalibrasyon doğrularının eğimleri ile karşılaştırılarak gösterilmiştir.

### **Sağlamlık ve Tutarlılık**

Yöntemlerin sağlamlık çalışmaları için, belirlenen optimum deney koşullarında küçük değişiklikler yapılarak analiz sonuçlarına etkisi incelenmiştir. Bu amaçla CZE yönteminde çalışma tamponunun pH'ı ve derişimi, uygulanan voltaj, dedektör dalga boyu, HPLC yönteminde ise hareketli faz bileşimi, tamponun pH'ı, derişimi ve akış hızında değişiklikler yapılmıştır. Her seferinde bir parametrede değişiklik yapılarak doğrusallık aralığına giren bir derişimde (CZE'de  $6.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  ROS ve  $600.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  MET, HPLC'de  $0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$  ROS ve  $30.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  MET) miktar tayini yapılmıştır.

Tutarlılık çalışmalarında ise farklı bir analizci tarafından hazırlanan çözeltilerin analizleri yapılmıştır. Bunun için geliştirilen yöntemlerde doğrusallık aralığına giren bir derişim seviyesinde (CZE yönteminde  $6.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  ROS,  $600.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  MET, HPLC yönteminde  $0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$  ROS,  $30.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  MET) altı ayrı çözelti hazırlanmış ve bunların aynı gün içinde analizleri yapılmıştır. İki analizci tarafından elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilerek aralarında fark olup olmadığı araştırılmıştır.

### **3.12. Geliştirilen Yöntemlerin Farmasötik Preparatlara Uygulanması**

Geliştirilen CZE ve HPLC yöntemi, Avandamet<sup>®</sup> tabletlere uygulanmıştır. Bu tabletlerin 1 mg ROS / 500 mg MET, 2 mg ROS / 500 mg MET ve 4 mg ROS / 500 mg MET içeren formlarının CZE yönteminde, 2 mg ROS / 500 mg MET içeren formunun da HPLC yönteminde analizleri yapılmıştır.

Farmasötik preparat numuneleri, bölüm 3.7'de anlatıldığı gibi analiz edilmiştir.

### **Standart Ekleme Yöntemi**

Farmasötik preparat analizleri, standart ekleme yöntemi ile de yapılmıştır. Bu yöntemde, aynı miktarda numune içeren bir dizi çözelti hazırlanmıştır. İlk çözeltiliye standart maddeler eklenmemiş, diğerlerine artan derişimlerde bilinen miktarda standart maddeler eklenip CZE yönteminde çalışma tamponu, HPLC yönteminde hareketli faz ile aynı hacme tamamlanmıştır. Bütün çözeltilere aynı miktarda VER eklenmiştir. Analiz sonuçları (CZE'de pik normalizasyon oranları, HPLC'de pik alan oranları) eklenen standart madde derişimine karşı grafiğe geçirilmiştir. Grafikte elde edilen

doğru, x eksenini negatif yönde kesmiştir. Bu noktanın mutlak değeri numunedeki madde derişimini vermiştir. Standart ekleme ve kalibrasyon doğrularının eğimleri karşılaştırılmıştır.

### 3.13. Karşılaştırma Yöntemi

ROS ve MET'in farmasötik preparatlardan analizinde karşılaştırma yöntemi olarak kaynaklarda bulunan HPLC yöntemi kullanılmıştır (53). Bu yöntemde hareketli faz olarak asetonitril:5 mM SDS içeren 10 mM disodyum hidrojen fosfat (34:66 h/h) kullanılmış, pH 7.1'e ortofosforik asitle ayarlanmıştır. Kaynakta kullanılan kolon Zorbax XDB C<sub>18</sub> (150 x 4.6 mm i.ç., 5 µm) kolondur. Uygulama sırasında aynı özelliklerde Nucleosil 100A C<sub>18</sub> kolon kullanılmıştır. Akış hızı 1 mL dk<sup>-1</sup>, kolon sıcaklığı 40 °C ve dedektör dalga boyu 226 nm'dir. Enjeksiyon hacmi 25 µL'dir. İç standart olarak metil paraben kullanılmıştır. Yöntemde kolon fırını kullanılması gerektiğinden analizler Shimadzu HPLC sisteminde gerçekleştirilmiştir.

Kaynakta yer alan bilgiler ışığında, standart ve örnek çözeltilerinin hazırlanmasında iki tip çözücü kullanılmıştır. Çözücü A, 5 mM SDS:asetonitril (50:50 h/h)'den oluşmaktadır, pH 2.0'ye HCl ile ayarlanmıştır. Çözücü B, 5 mM SDS: asetonitril (70:30 h/h)'den oluşmaktadır, pH 2.3'e HCl ile ayarlanmıştır. Standart stok ROS (400 µg mL<sup>-1</sup>), MET (2500 µg mL<sup>-1</sup>) ve metil paraben (250 µg mL<sup>-1</sup>, İS) çözeltileri çözücü A ile, kalibrasyon eğrisi için hazırlanan karışım standart çözeltileri ise çözücü B ile seyreltilmiştir. Kalibrasyon eğrisi için 25-150 µg mL<sup>-1</sup> MET, 0.2-1.2 µg mL<sup>-1</sup> ROS ve 5 µg mL<sup>-1</sup> metil paraben içeren çözeltiler hazırlanmıştır.

Farmasötik preparat analizinde, 10 adet tablet tartılarak havanda toz haline getirilmiştir. Bir tablete eşdeğer miktarda tartılan toz 100 mL'lik balon jöjeye aktarılarak üzerine yaklaşık 75 mL çözücü A eklenmiş ve ultrasonik banyoda 15 dk bekletilmiştir. Daha sonra hacim çözücü A ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Bu çözeltiden bir miktar santrifüj tüpüne aktararak 5000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. 20 µL'lik berrak santrifüj vialine aktarılmış, üzerine 20 µL stok iç standart çözeltisinden eklenerek çözücü B ile 1000 µL'ye tamamlanmıştır.

Kalibrasyon eğrileri, derişime karşı pik alan oranları (pik alanı ROS veya

MET / pik alanı metil paraben) grafiğe geçirilerek oluşturulmuştur.

### **3.14. Biyolojik Materyal Analizi**

#### **3.14.1. Ekstraksiyon Yöntemi Seçimi**

ROS ve MET'in plazmadan analizi HPLC yöntemi ile yapılmıştır. Bu amaçla;

- Farklı reaktiflerle (asetonitril, etanol, metanol, aseton ve perklorik asit) proteinlerin çöktürülmesi işlemi,
- Farklı organik çözücüler (Etil asetat, diklorometan ve n-hekzan) kullanılarak sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi,
- Çeşitli tipte kartuşlar ( $C_{18}$ ,  $C_8$ ) kullanılarak katı-sıvı ekstraksiyon işlemleri denenmiştir (84).

#### **3.14.2. Analiz Yöntemi**

ROS ve MET'in HPLC yöntemiyle plazmadan analizinde ekstraksiyon işlemi olarak asetonitrille proteinlerin çöktürülmesi seçilmiştir.

Analiz, Thermo Separation Products marka HPLC sisteminde Ace 5 fenil kolonda (250 x 4.6 mm i.ç, 5  $\mu$ m), ön kolon olarak Phenomenex fenil kartuş (4.0 x 3.0 mm i.ç.) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon manuel olup hacmi 20  $\mu$ L'dir. Kromatogramlar UV dedektör kullanılarak 245 nm'de elde edilmiştir.

Biyolojik materyal analizinde, hareketli faz olarak asetonitril : 5 mM pH 5.5 sodyum asetat kullanılarak Tablo 3.1'de verilen basamaklı gradient elüsyon uygulanmıştır.

Tablo 3.1. Geliştirilen HPLC yönteminde biyolojik materyal analizi için uygulanan basamaklı gradient elüsyon sistemi.

| Zaman (dk) | Asetonitril (%) | 5 mM pH 5.5       |                             |
|------------|-----------------|-------------------|-----------------------------|
|            |                 | Sodyum Asetat (%) | Akış (mL dk <sup>-1</sup> ) |
| 0          | 75              | 25                | 1.0                         |
| 0.7        | 70              | 30                | 1.0                         |
| 1.0        | 65              | 35                | 1.0                         |
| 4.5        | 70              | 30                | 1.0                         |
| 4.7        | 75              | 25                | 1.0                         |

Analiz öncesi kolondan sırasıyla su ve hareketli faz (gradient elüsyondaki ilk hareketli faz bileşimi) geçirilerek kolonun dengelenmesi sağlanmıştır. Bunun için gürültünün en aza indiği zemin değeri elde edilinceye kadar hareketli faz geçirilmiş ve analizlere başlanmıştır. Çalışma sonunda kolon, bölüm 3.9.3'de anlatıldığı gibi temizlenmiştir.

Hacettepe Üniversitesi Kan Bankasından alınan boş plazmadan 500 µL Eppendorf tüplere alınıp üzerine standart ROS, MET ve VER çözeltilerinden uygun miktarlarda eklenerek plazma örnekleri hazırlanmıştır. Bu örneklerin üzerine 1000 µL asetonitril eklenip 30 sn vorteks karıştırıcıda karıştırılmıştır. 6000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra üstteki berrak kısımdan HPLC kolonuna direkt enjeksiyon yapılmıştır.

Hastalardan alınan kan örnekleri de, 5000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra üst kısımdan 500 µL plazma Eppendorf tüplere alınmıştır. Üzerlerine 20 µL 200 µg mL<sup>-1</sup> VER ve 1000 µL asetonitril eklenip 30 sn vorteks karıştırıcıda karıştırılmıştır. 6000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra üstteki berrak kısımdan HPLC kolonuna direkt enjeksiyon yapılmıştır.

#### 3.14.3. Biyolojik Materyalden Analiz Yönteminin Validasyonu

Yöntem validasyonu için kararlılık, doğrusalılık, duyarlılık, kesinlik, doğruluk, geri kazanım, özgünlük, sağlamlık ve tutarlılık parametreleri değerlendirilmiştir (85-89).

### **Kararlılık**

Plazma örneklerinin kararlılığı, kalibrasyon eğrisinin düşük ve yüksek derişim seviyelerinde olmak üzere iki derişim seviyesinde incelenmiştir (ROS için 250.0 ve 500.0 ng mL<sup>-1</sup>, MET için 1000.0 ve 2000.0 ng mL<sup>-1</sup>). Plazma üzerine ekleme yapılarak her derişimden 3'er tane hazırlanan çözeltilere asetonitril eklenerek bölüm 3.14.2'de anlatılan işlemler uygulanmıştır.

Kısa dönem kararlılık testi için çözeltiler 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiş ve bu süre sonunda ROS ile MET'in dedektör cevabındaki değişiklikler incelenmiştir.

Uzun dönem kararlılık testi için çözeltiler -20 °C'de 20 gün bekletilmiş ve bu süre sonunda ROS ile MET'in dedektör cevabındaki değişiklikler incelenmiştir.

Donma ve erime kararlılık testi için, ROS ve MET'in derişimindeki değişiklikler 3 donma-erime döngüsü içerisinde incelenmiştir. -20 °C'de saklanan çözeltiler oda sıcaklığında çözünmeye bırakılmış, en az 1 saat oda sıcaklığında bırakıldıktan sonra tekrar -20 °C'de dondurulmuştur. 3. döngü sonunda ROS ve MET'in dedektör cevabındaki değişiklikler incelenmiştir.

### **Doğrusallık**

Biyolojik materyal analizi için geliştirilen HPLC yönteminde, standart ROS ve MET çözeltilerinden 100.0 ng mL<sup>-1</sup> ROS ve MET, 250.0 ng mL<sup>-1</sup> ROS ve MET, 500.0 ng mL<sup>-1</sup> ROS ve MET, 800.0 ng mL<sup>-1</sup> ROS ve MET, 1000.0 ng mL<sup>-1</sup> ROS ve MET, 1500.0 ng mL<sup>-1</sup> ROS ve MET, 2000.0 ng mL<sup>-1</sup> ROS ve MET, 2500.0 ng mL<sup>-1</sup> ROS ve MET içerecek şekilde gerekli miktarlar alınıp, boş plazma ile 500 µL'ye tamamlanmıştır. Her bir plazma çözeltilisinin içine 200.0 µg mL<sup>-1</sup> VER stok çözeltilisinden 25.0 µL eklenmiştir. Bu çözeltiler Bölüm 3.14.2'de anlatılan işlemlerden geçirildikten sonra HPLC sistemine enjekte edilerek kromatogramları alınmıştır.

Kalibrasyon eğrileri, derişime karşı pik alan oranları (pik alanı ROS veya MET / pik alanı VER) grafiğe geçirilerek oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrisine ait regresyon denklemi ve korrelasyon katsayısı hesaplanmıştır. İstatistiksel olarak korrelasyon katsayısının ve doğrusallıktan ayrılışın önem kontrolü testleri yapılmıştır (82).

### **Duyarlılık**

LOD, S/G oranının 3 olduğu derişim olarak bulunmuştur. LOQ ise, kabul edilebilir doğruluk ve kesinlik değerlerinde olmak üzere kalibrasyon eğrisinde yer alan en düşük derişim değeri olarak alınmıştır.

### **Kesinlik**

Yöntemin kesinliği için, gün içi ve günler arası çalışmalar yapılmıştır. Gün içi çalışmalarda, doğrusallık aralığına giren 3 farklı derişim seviyesinde (ROS için 100.0, 250.0 ve 500.0 ng mL<sup>-1</sup>, MET için 500.0, 1000.0 ve 2000.0 ng mL<sup>-1</sup>) plazmaya eklenen standartlarla 6'şar çözelti hazırlanmış ve bu çözeltiler aynı gün içinde 3 tekrarlı olarak analiz edilmiştir. Günler arası çalışmalarda, 6 farklı günde ve yine 3 farklı derişim seviyesinde hazırlanan eklenmiş plazma çözeltileri kullanılarak 3 tekrarlı analizler yapılmıştır. Kesinlik sonuçları, ortalama, SH, SS, BSS ve güven aralığı ile verilmiştir.

Cihaz tekrarlanabilirliğinin test edilebilmesi için doğrusal aralık içerisinde bir derişim değeri (ROS için 250.0 ng mL<sup>-1</sup>, MET için 1000.0 ng mL<sup>-1</sup>) ROS ve MET eklenmiş plazma çözeltisi kullanılarak 10 enjeksiyon yapılmış ve cihaz parametreleri değerlendirilmiştir. Sonuçlar, ortalama, SH, SS ve BSS ile verilmiştir.

Yöntemin tekrarlanabilirlik çalışması için geliştirilen yöntemle doğrusallık aralığına giren bir derişim seviyesinde (ROS için 250.0 ng mL<sup>-1</sup>, MET için 1000.0 ng mL<sup>-1</sup>) on ayrı çözelti hazırlanmış ve bunların aynı gün içinde tekrarlı analizleri yapılmıştır. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

### **Doğruluk**

Doğruluk, ilk olarak gün içi ve günler arası çalışmalar yapılarak belirlenmiştir. Gün içi çalışmalarda, doğrusallık aralığına giren 3 farklı derişim (ROS için 100.0, 250.0 ve 500.0 ng mL<sup>-1</sup>, MET için 500.0, 1000.0 ve 2000.0 ng mL<sup>-1</sup>) seviyesinde plazmaya eklenen standartlarla 6'şar çözelti hazırlanmış ve bu çözeltiler aynı gün içinde 3 tekrarlı olarak analiz edilmiştir. Günler arası çalışmalarda, 6 farklı günde ve yine 3 farklı derişim seviyesinde plazmaya eklenen standartlarla hazırlanan çözeltiler kullanılarak analizler 3 tekrarlı yapılmıştır. Doğruluk, eklenen standart madde miktarları ile bulunan standart madde miktarları karşılaştırılarak % bağıl hata değerlerinin hesaplanması ile değerlendirilmiştir.

### **Geri Kazanım**

ROS ve MET'in plazmadan analizinde geri kazanım çalışmaları, üç farklı derişimde (ROS için 100.0, 250.0 ve 500.0 ng mL<sup>-1</sup>, MET için 500.0, 1000.0 ve 2000.0 ng mL<sup>-1</sup>) iki şekilde yapılmıştır. Birincisinde, plazmaya eklenmiş ROS'un (veya MET) pik alanının iç standardın pik alanına oranı ile plazma yerine suya aynı miktarda eklenmiş ROS'un (veya MET) pik alanının iç standardın pik alanına oranı karşılaştırılarak ekstraksiyon verimi (bağıl geri kazanım) hesaplanmıştır. İkincisinde ise plazmaya eklenmiş ROS'un (veya MET) pik alanının iç standardın pik alanına oranı ile aynı derişimde hareketli fazda hazırlanan ROS (veya MET) standart çözeltisinin pik alanının iç standardın pik alanına oranı karşılaştırılarak mutlak geri kazanım bulunmuştur (86).

### **Özgünlük (Seçicilik)**

Yöntemin özgünlüğünü göstermek amacıyla boş plazma, plazmaya eklenmiş standartlar ve hastalardan alınan plazma örneklerinden hazırlanan çözeltilerin kromatogramları karşılaştırılmıştır.

### **Sağlamlık ve Tutarlılık**

Sağlamlık çalışmalarında, belirlenen optimum deney koşullarında küçük değişiklikler yapılarak analiz sonuçlarına etkisi incelenmiştir. Bu amaçla gradient elüsyonda ilk ve son hareketli faz bileşimi, tamponun pH'sı, derişimi ve akış hızında değişiklikler yapılmıştır. Her seferinde bir parametrede değişiklik yapılarak doğrusallık aralığına giren bir derişimde (ROS için 250.0 ng mL<sup>-1</sup>, MET için 1000.0 ng mL<sup>-1</sup>) miktar tayini yapılmıştır.

Tutarlılık çalışmalarında ise farklı bir analizci tarafından hazırlanan standart eklenmiş plazma çözeltilerinin analizleri yapılmıştır. Bunun için geliştirilen HPLC yöntemi ile doğrusallık aralığına giren bir derişim seviyesinde (250.0 ng mL<sup>-1</sup> ROS, 1000.0 ng mL<sup>-1</sup> MET) altı ayrı çözelti hazırlanmış ve bunların aynı gün içinde analizleri yapılmıştır. İki analizci tarafından elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilerek fark olup olmadığı araştırılmıştır.

#### **3.14.4. Etik Kurul İzni**

ROS ve MET etken maddelerini içeren ilaçları kullanan diyabet hastalarından plazma örneklerinin alınabilmesi için Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi, Cerrahi ve İlaç Araştırmaları Etik Kurulundan LUT 05/73-10 sayılı kararla etik kurul onayı alınmıştır (Ek 1).

#### **3.14.5. İlaç Uygulama Protokolü**

Plazma örnekleri, ROS etken maddesini içeren Avandia® (4 mg) ve MET etken maddesini içeren Glucophage® (850 mg) ilaçlarını kullanan 37-63 yaşları arasında 11'i kadın 14 adet diyabet hastasından temin edilmiştir. Hastaların kanları ilaçları içmelerinden 1 saat sonra EDTA'lı tüplere yaklaşık 2.5 mL olacak şekilde alınmıştır. Alınan kanlar bekletilmeden analiz edilmiştir.

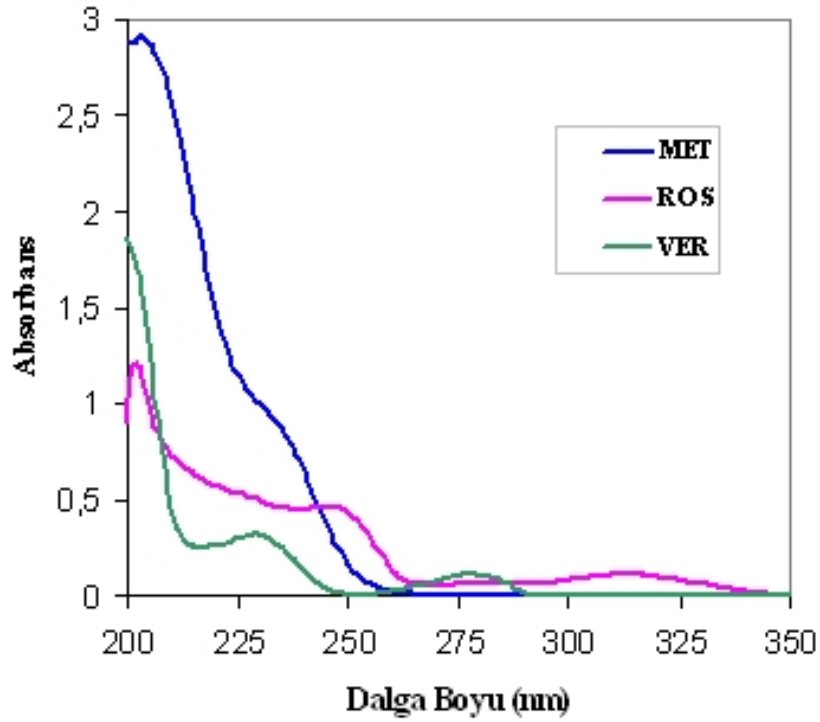
#### 4. BULGULAR

##### 4.1. Saflık Kontrolü

Rosiglitazon'un erime noktası 123 °C, metformin'in erime noktası 225 °C olarak tayin edilmiştir.

##### 4.2. Rosiglitazon, Metformin ve İç Standart'ın (Verapamil) Dalga Boyu Taraması

ROS, MET ve VER'in 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'lık stok çözeltilerinden 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik çözeltiler ROS için metanolde, diğerleri için suda hazırlanarak 200-350 nm arasında UV spektrumları alınmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. ROS, MET ve VER'in UV spektrumları.

### 4.3. CZE Yöntemine Ait Bulgular

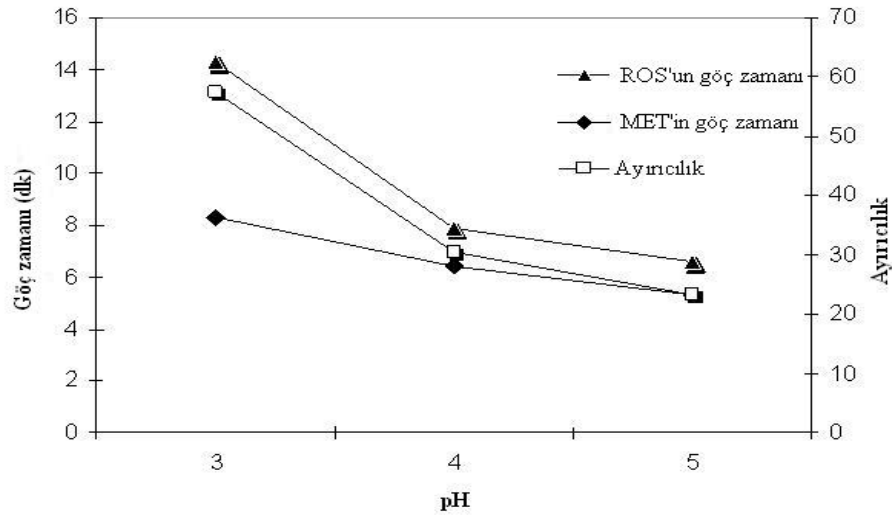
#### 4.3.1. İç Standart Seçimi

ROS ve MET'in CZE'de aynı anda analizi amacıyla öncelikle iç standart seçimi için çalışmalar yapılmıştır. Meloksikam, diflunisal, alendronat ve verapamil denenmiş, sadece verapamil piki ROS ve MET ile birlikte elde edilebilmiştir.

#### 4.3.2. Çalışma Tamponuna Ait Parametreler

Çalışma tamponunun türünün belirlenmesi amacıyla fosfat (pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0), asetat (pH 3.0, 4.0, 5.0), sitrat (pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0) ve format (pH 3.0, 4.0, 5.0) çalışma tamponları denenmiştir. Göç zamanları, pik şekilleri ve ayırıcılık parametreleri değerlendirilerek en iyi sonuçların asetat tamponu ile elde edildiği görülmüştür.

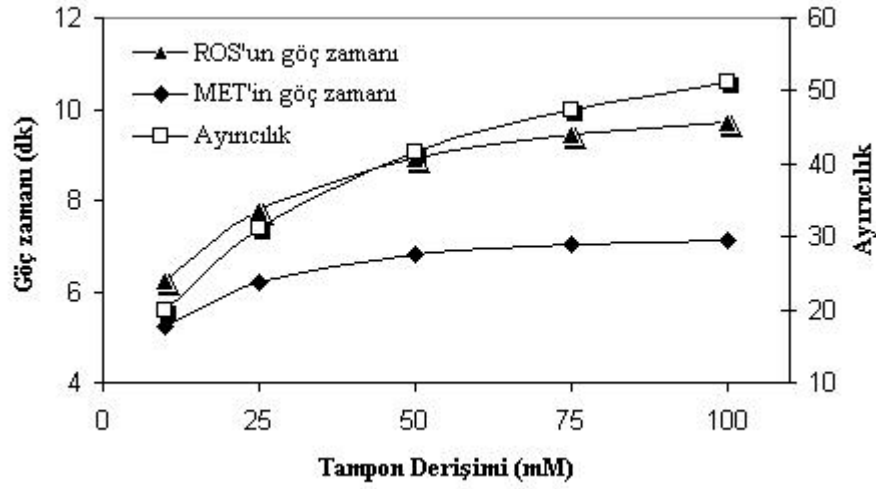
Çalışma tamponu olarak seçilen asetat tamponunda göç zamanı ve ayırıcılığa pH'nın etkisi pH 3.0-5.0 arasında (Şekil 4.2), derişimin etkisi 10-100 mM arasında (Şekil 4.3) incelenmiş, organik çözücü etkisini incelemek amacıyla da metanol ve asetonitril % 5, 10 ve 15 oranlarında eklenmiştir.



Şekil 4.2. Çalışma tamponu pH'nın göç zamanı ve ayırıcılık üzerine etkisi.

Koşullar: 25 mM asetat tamponu, hidrokinamik enjeksiyon (50 mbar, 3 sn), 25 kV,

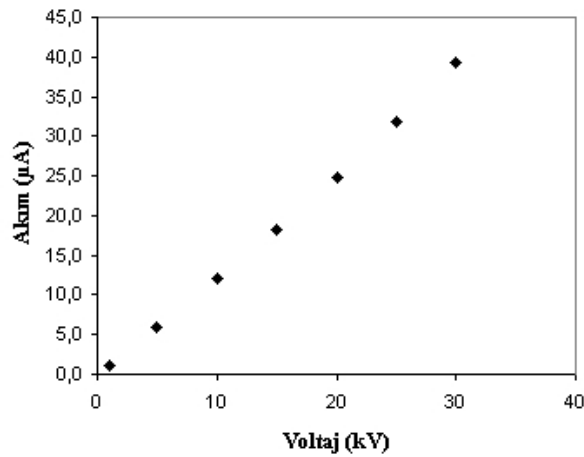
25 °C,  $\lambda$ : 203 nm, ROS, MET ve VER derişimi: 10.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .



Şekil 4.3. Çalışma tamponu derişiminin göç zamanı ve ayırıcılık üzerine etkisi. Koşullar: pH 4.0 asetat tamponu, hidrokinamik enjeksiyon (50 mbar, 3 sn), 25 kV, 25 °C,  $\lambda$ : 203 nm, ROS, MET ve VER derişimi: 10.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### 4.3.3. Cihaza Ait Parametreler

Çalışmalarda uygulanacak maksimum voltajı belirlemek için voltaja karşı akım grafiğı çizilmiştir (Şekil 4.4) ve uygulanacak voltaj 25 kV olarak seçilmiştir.



Şekil 4.4. Çalışma tamponuna uygulanan voltaja karşı akım ilişkisi.

Enjeksiyon süresini belirlemek amacıyla, hidrodinamik enjeksiyonla 50 mbar sabit basınç uygulanarak farklı enjeksiyon süreleri denenmiş ve en uygun enjeksiyon süresinin 3 sn olduğuna karar verilmiştir.

Kapilerin çalışma sıcaklığı olarak 20 °C, 25 °C ve 30°C denenerek en uygun sıcaklık olarak 25°C seçilmiştir.

Dedektör dalga boyunun belirlenmesi için 203, 220 ve 240 nm’de denemeler yapılmış ve ROS, MET ve iç standart VER’in en yüksek absorbands gösterdiği 203 nm seçilmiştir.

Çalışma tamponu ve cihaz parametrelerinin en uygun koşulları; 25 mM pH 4.0 asetat tamponu, 50 mbar 3 sn enjeksiyon süresi, 25 kV voltaj uygulaması, 25 °C çalışma sıcaklığı ve 203 nm (bant genişliği  $\pm 10$  nm) dalga boyu olarak belirlenmiştir.

Bu koşullar altında MET’in  $6.20 \pm 0.01$  dk, ROS’un  $7.79 \pm 0.01$  dk ve iç standart VER’in  $8.49 \pm 0.01$  dk göç zamanına sahip olduğu görülmüştür.

ROS, MET ve VER’e ait elektroforetik ayırım parametreleri Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1. Geliştirilen CZE yöntemiyle elde edilen ROS, MET ve VER pikleri ile ilgili bilgiler\* (ROS, MET ve VER derişimi  $20.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , n=10).

|                                        | <b>MET</b>                    | <b>ROS</b>            | <b>VER</b>            |
|----------------------------------------|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| <b>Göç Zamanı (dk)</b>                 | $6.20 \pm 0.01$               | $7.79 \pm 0.01$       | $8.49 \pm 0.01$       |
| <b>Pik Alanı</b>                       | $19.22 \pm 0.24$              | $26.37 \pm 1.02$      | $26.28 \pm 0.61$      |
| <b>Pik Genişliği</b>                   | 0.03                          | 0.04                  | 0.04                  |
| <b>Pik Simetrisi</b>                   | $0.87 \pm 0.01$               | $0.91 \pm 0.01$       | $0.93 \pm 0.01$       |
| <b>Pik Saflığı</b>                     | $0.93 \pm 0.01$               | $0.95 \pm 0.01$       | $0.96 \pm 0.01$       |
| <b>Seçicilik (<math>\alpha</math>)</b> | $1.27 \pm 0.01$               |                       | $1.09 \pm 0.01$       |
| <b>Tabaka Sayısı (N)</b>               | $274655 \pm 10212.51$         | $279811 \pm 10368.51$ | $271874 \pm 11221.12$ |
| <b>Ayırıcılık (<math>R_s</math>)</b>   | $31.19 \pm 0.56$ (ROS ve MET) |                       | $10.71 \pm 0.21$      |

\*Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata şeklinde verilmiştir.

Belirlenen koşullarda  $20.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  ROS, MET ve VER içeren standart çözeltisi 10 kez enjekte edilmiş ve göç zamanı, pik alanı, pik normalizasyonu, pik normalizasyon oranları ve pik alan oranları değerlendirilmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Elektroferogramlardan elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmesi\*  
(ROS, MET ve VER derişimi 20.0 µg mL<sup>-1</sup>, n=10).

|                  | ROS          |              |             |              |                |
|------------------|--------------|--------------|-------------|--------------|----------------|
|                  | t (dk)       | Pik Alanı    | PN          | PN Oranı     | Pik Alan Oranı |
| $\bar{x} \pm SH$ | 7.79 ± 0.002 | 26.37 ± 1.02 | 3.38 ± 0.13 | 1.09 ± 0.003 | 1.00 ± 0.003   |
| SS               | 0.01         | 3.24         | 0.42        | 0.01         | 0.01           |
| BSS              | % 0.13       | % 12.29      | % 12.43     | % 0.92       | % 1.0          |
|                  | MET          |              |             |              |                |
|                  | t (dk)       | Pik Alanı    | PN          | PN Oranı     | Pik Alan Oranı |
| $\bar{x} \pm SH$ | 6.20 ± 0.001 | 19.22 ± 0.72 | 3.10 ± 0.12 | 0.99 ± 0.003 | 0.73 ± 0.003   |
| SS               | 0.003        | 2.28         | 0.37        | 0.01         | 0.01           |
| BSS              | % 0.05       | % 11.86      | % 11.94     | % 0.99       | % 1.37         |

\*t=Göç zamanı,  $\bar{x} \pm SH$ =Ortalama ± standart hata, SS=Standart sapma, BSS=Bağıl standart sapma, PN (Pik Normalizasyonu)=Pik alanı / Göç zamanı, PN Oranı=ROS veya MET'in pik normalizasyonu / İS'nin pik normalizasyonu, Pik Alan Oranı= ROS veya MET'in pik alanı / İS'nin pik alanı (Hesaplamalar Ek 2'de gösterilmiştir).

#### 4.3.4. CZE Yönteminin Validasyonu

##### A. Kararlılık

Bölüm 3.11'de bahsedildiği şekilde izlenen ROS ve MET'in kısa ve uzun dönem kararlılık sonuçları Tablo 4.3'de verilmiştir.

Tablo 4.3. ROS ve MET'in CZE yöntemi ile elde edilen kararlılık bulguları (n=3).

|     | Kısa dönem kararlılık<br>(24 saat, oda sıcaklığı) |         | Uzun dönem kararlılık<br>(4 ay, 4 °C) |         |
|-----|---------------------------------------------------|---------|---------------------------------------|---------|
|     | % Kalan                                           | BSS (%) | % Kalan                               | BSS (%) |
| ROS | 101.02 ± 0.56                                     | 2.02    | 102.00 ± 1.44                         | 2.79    |
| MET | 99.06 ± 0.34                                      | 1.34    | 98.46 ± 0.12                          | 0.21    |

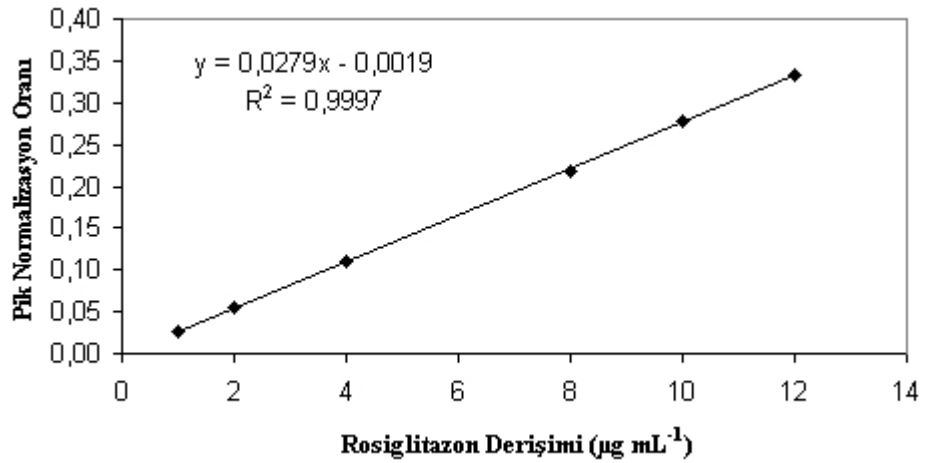
% Kalan=(Belirtilen süre sonunda çözeltinin dedektör cevabı / Taze çözeltinin dedektör cevabı)x100

### B. Doğrusallık

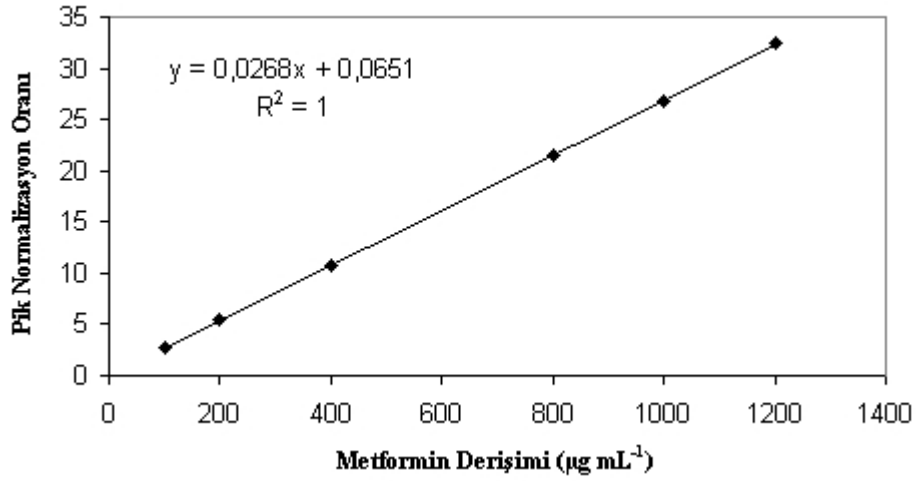
Optimize edilen analiz koşullarında, farmasötik preparatlardaki miktarlar göz önünde bulundurularak, ROS için 1.0-12.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ve MET için 100.0-1200.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  derişim aralıklarında kalibrasyon doğruları oluşturulmuş ve her durumda 20.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  VER iç standart olarak eklenmiştir. ROS ve MET'in iç standarda göre pik normalizasyon oranları grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.5 ve 4.6).

Farklı çözeltiler hazırlanarak elde edilen 10 kalibrasyon eğrisinin ortalama denklemleri ve istatistiksel değerleri Tablo 4.4'de verilmiştir.

Kalibrasyon eğrilerinin doğrusallıktan ayrılış ve korrelasyon katsayılarının önem kontrolüne ait istatistiksel değerlendirme sonuçları Tablo 4.5 ve Tablo 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.5. ROS'un CZE yöntemi ile analizinde elde edilen kalibrasyon eğrisi.



Şekil 4.6. MET'in CZE yöntemi ile analizinde elde edilen kalibrasyon eğrisi.

Tablo 4.4. Geliştirilen CZE yöntemine ait kalibrasyon eğrilerinin özellikleri (n=10).

|                                            | ROS                          | MET                          |
|--------------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Regresyon denklemi*                        | $y = 0.0279x - 0.0019$       | $y = 0.0268x + 0.0651$       |
| Eğimin standart hatası                     | 0.001                        | 0.0002                       |
| Kesişimin standart hatası                  | 0.0004                       | 0.002                        |
| Korrelasyon katsayısı (r)                  | 0.9998                       | 1                            |
| Tanımlayıcılık katsayısı (R <sup>2</sup> ) | 0.9997                       | 1                            |
| Doğrusallık aralığı                        | 1.0-12.0 µg mL <sup>-1</sup> | 1.0-1200 µg mL <sup>-1</sup> |
| LOD                                        | 0.5 µg mL <sup>-1</sup>      | 0.5 µg mL <sup>-1</sup>      |
| LOQ                                        | 1.0 µg mL <sup>-1</sup>      | 1.0 µg mL <sup>-1</sup>      |

\* $y = bx + a$ ;  $x$  : µg mL<sup>-1</sup> biriminde derişim,  $y$  : Pik normalizasyon oranları,  $a$  : Kesişim,  $b$  : Eğim.

Tablo 4.5. Geliştirilen CZE yöntemine ait kalibrasyon eğrilerinin doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü\*.

|                      | <b>ROS</b>                           | <b>MET</b>                           |
|----------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| <b>RKT</b>           | 0.0785                               | 725.72                               |
| <b>YOAKT</b>         | 0.0786                               | 725.75                               |
| <b>RAKT</b>          | 0.0001                               | 0.033                                |
| <b>RKO</b>           | 0.0785                               | 725.72                               |
| <b>RAKO</b>          | 0.000025                             | 0.008                                |
| <b>F<sub>H</sub></b> | 3140                                 | 87966.06                             |
| <b>F<sub>T</sub></b> | 7.71                                 | 7.71                                 |
| <b>Karar</b>         | İlişki doğrusaldır<br>( $p < 0.05$ ) | İlişki doğrusaldır<br>( $p < 0.05$ ) |

\*İstatistiksel terimler ve hesaplamalar Ek 3’de açıklanmıştır.

Tablo 4.6. Geliştirilen CZE yöntemine ait kalibrasyon eğrilerinin korrelasyon katsayılarının önem kontrolü\*.

|                      | <b>ROS</b>                                               | <b>MET</b>                                               |
|----------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| <b>n</b>             | 6                                                        | 6                                                        |
| <b>r</b>             | 0.9998                                                   | 1                                                        |
| <b>S<sub>r</sub></b> | 0.009                                                    | 0.003                                                    |
| <b>t<sub>H</sub></b> | 111.09                                                   | 333.33                                                   |
| <b>t<sub>T</sub></b> | 2.78                                                     | 2.78                                                     |
| <b>Karar</b>         | “r” tesadüfen bulunmuş bir değer değildir ( $p < 0.05$ ) | “r” tesadüfen bulunmuş bir değer değildir ( $p < 0.05$ ) |

(\*İstatistiksel terimler ve hesaplamalar için Bkz. Ek 3).

### **C. Duyarlılık**

ROS ve MET'in CZE yöntemi ile tayininde LOD ve LOQ değerleri Tablo 4.4'de verilmiştir.

### **D. Doğruluk ve Kesinlik**

Kullanılan CZE sisteminin tekrarlanabilirliğinin test edilmesi için doğrusal aralık içerisinde bir derişim değerinde hazırlanan ( $20.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  ROS ve MET) aynı standart çözeltiden 10 enjeksiyon yapılmış ve cihaz parametreleri değerlendirilmiştir (Bkz. Tablo 4.2).

ROS ve MET'in CZE ile tayini için yapılan doğruluk ve kesinlik çalışmalarına ait gün içi ve günler arası değerlendirme sonuçları Tablo 4.7 ve 4.8'de verilmiştir.

ROS ve MET'in CZE ile tayininde yöntem tekrarlanabilirliğine ait sonuçlar Tablo 4.9'da verilmiştir.

Tablo 4.7. Geliştirilen CZE yöntemiyle ROS analizi için elde edilen gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk bulguları.

| ROS miktarı<br>( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | Gün İçi<br>Bulunan Miktar<br>( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )                                                                                                   | Günler Arası<br>Bulunan Miktar<br>( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )                                                                                                 |
|------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2.0                                      | 2.01<br>2.01<br>1.92<br>1.98<br>1.94<br>2.01<br><br>$\bar{x} = 1.98 \pm 0.02$<br>SS = 0.04<br>BSS = % 2.02<br>% Bağıl Hata = -1.00<br>GA = 1.93-2.03     | 1.95<br>1.94<br>2.05<br>1.98<br>2.01<br>2.05<br><br>$\bar{x} = 2.00 \pm 0.02$<br>SS = 0.05<br>BSS = % 2.50<br>% Bağıl Hata = 0<br>GA = 1.95-2.05            |
| 6.0                                      | 6.06<br>6.00<br>6.07<br>5.97<br>5.93<br>5.95<br><br>$\bar{x} = 6.00 \pm 0.02$<br>SS = 0.06<br>BSS = % 1.00<br>% Bağıl Hata = 0<br>GA = 5.95-6.05         | 6.06<br>5.98<br>6.05<br>6.03<br>6.10<br>6.00<br><br>$\bar{x} = 6.04 \pm 0.02$<br>SS = 0.04<br>BSS = % 0.66<br>% Bağıl Hata = 0.67<br>GA = 5.99-6.09         |
| 10.0                                     | 10.06<br>9.93<br>10.09<br>10.11<br>9.99<br>9.90<br><br>$\bar{x} = 10.01 \pm 0.04$<br>SS = 0.09<br>BSS = % 0.90<br>% Bağıl Hata = 0.10<br>GA = 9.91-10.11 | 9.94<br>10.37<br>10.44<br>10.08<br>10.43<br>10.32<br><br>$\bar{x} = 10.26 \pm 0.09$<br>SS = 0.21<br>BSS = % 2.05<br>% Bağıl Hata = 2.60<br>GA = 10.03-10.49 |

$\bar{x} \pm SH$ =Ortalama  $\pm$  standart hata, SS=Standart sapma, BSS=Bağıl standart sapma, GA=Güven aralığı (Hesaplamalar için Bkz. Ek 2)

Tablo 4.8. Geliştirilen CZE yöntemiyle MET analizi için elde edilen gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk bulguları.

| <b>MET miktarı<br/>(<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b> | <b>Gün İçi<br/>Bulunan Miktar<br/>(<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>                                                                                               | <b>Günler Arası<br/>Bulunan Miktar<br/>(<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>                                                                                              |
|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 200.0                                                     | 195.40<br>198.45<br>202.62<br>197.40<br>199.91<br>201.47<br><br>$\bar{x} = 199.21 \pm 1.09$<br>SS = 2.67<br>BSS = % 1.67<br>% Bağıl Hata = -0.40<br>GA = 196.41-202.01 | 199.07<br>204.72<br>199.44<br>203.87<br>203.75<br>195.68<br><br>$\bar{x} = 201.09 \pm 1.46$<br>SS = 3.58<br>BSS = % 1.78<br>% Bağıl Hata = 0.55<br>GA = 197.34-204.84      |
| 600.0                                                     | 599.65<br>601.78<br>596.32<br>595.72<br>596.03<br>599.99<br><br>$\bar{x} = 598.25 \pm 1.04$<br>SS = 2.55<br>BSS = % 0.43<br>% Bağıl Hata = -0.29<br>GA = 595.58-600.92 | 589.64<br>598.30<br>599.93<br>603.41<br>595.30<br>605.24<br><br>$\bar{x} = 598.64 \pm 2.31$<br>SS = 5.66<br>BSS = % 1.78<br>% Bağıl Hata = -0.23<br>GA = 592.70-604.58     |
| 1000.0                                                    | 991.93<br>986.96<br>997.78<br>997.83<br>995.72<br>992.03<br><br>$\bar{x} = 993.71 \pm 1.72$<br>SS = 4.22<br>BSS = % 0.42<br>% Bağıl Hata = -0.63<br>GA = 989.29-998.13 | 992.60<br>994.59<br>1003.38<br>1004.24<br>1006.59<br>999.37<br><br>$\bar{x} = 1000.13 \pm 2.29$<br>SS = 5.61<br>BSS = % 0.56<br>% Bağıl Hata = 0.01<br>GA = 994.24-1006.02 |

$\bar{x} \pm SH$ =Ortalama  $\pm$  standart hata, SS=Standart sapma, BSS=Bağıl standart sapma, GA=Güven aralığı (Hesaplamalar için Bkz. Ek 2)

Tablo 4.9. Geliştirilen CZE yönteminin tekrarlanabilirliğine ait analiz bulguları (Eklenen ROS ve MET derişimi:  $10.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $n=10$ ).

| ROS                                                                                                | MET                                                                                              |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Bulunan ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )                                                                  | Bulunan ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )                                                                |
| 10.21                                                                                              | 9.85                                                                                             |
| 10.03                                                                                              | 9.90                                                                                             |
| 10.18                                                                                              | 9.82                                                                                             |
| 10.21                                                                                              | 10.04                                                                                            |
| 10.22                                                                                              | 9.91                                                                                             |
| 10.21                                                                                              | 9.92                                                                                             |
| 10.02                                                                                              | 9.90                                                                                             |
| 10.04                                                                                              | 9.81                                                                                             |
| 10.02                                                                                              | 10.03                                                                                            |
| 10.02                                                                                              | 9.92                                                                                             |
| $\bar{x} = 10.12 \pm 0.03$<br>SS = 0.10<br>BSS = % 0.94<br>% Bağıl Hata = 1.20<br>GA = 10.05-10.19 | $\bar{x} = 9.91 \pm 0.02$<br>SS = 0.08<br>BSS = % 0.78<br>% Bağıl Hata = -0.90<br>GA = 9.86-9.96 |

$\bar{x}$ =Ortalama  $\pm$  standart hata, SS=Standart sapma, BSS=Bağıl standart sapma, GA=Güven aralığı (Hesaplamalar için Bkz. Ek 2).

### E. Geri Kazanım

Geri kazanım deneyleri Bölüm 3.8’de anlatıldığı gibi hazırlanan sentetik preparat çözeltisine farmasötik preparatlarda belirtilen miktarlara uygun olarak 3 farklı derişim oranında olmak üzere (1 mg ROS / 500 mg MET, 2 mg ROS / 500 mg MET, 4 mg ROS / 500 mg MET) ROS, MET ve aynı derişimde VER’in eklenmesi ile yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.10’da gösterilmiştir.

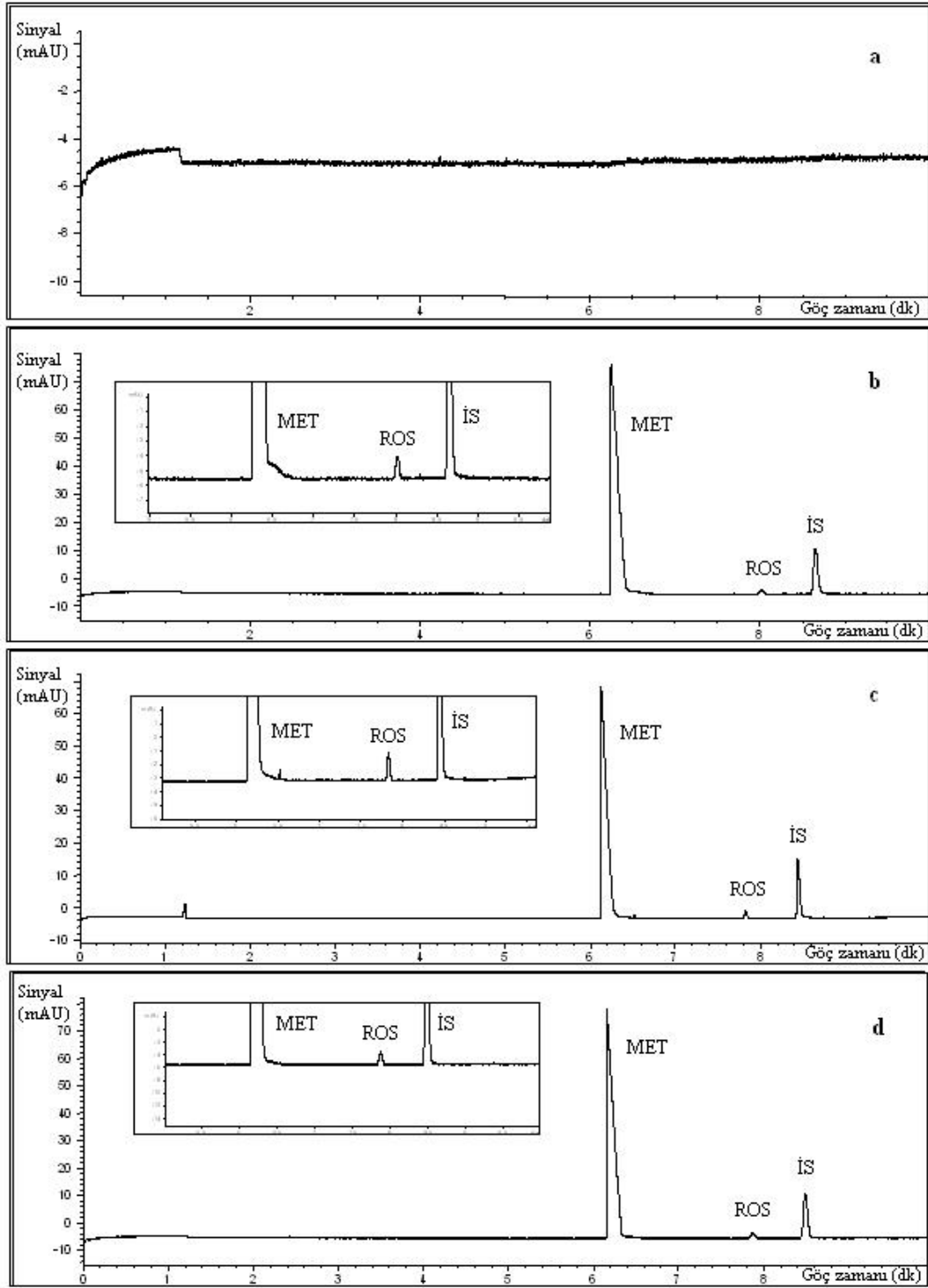
Tablo 4.10. Geliştirilen CZE yönteminde ROS ve MET için geri kazanım verileri (n=6).

|     | <b>Eklenen<br/>(mg)</b> | <b>Geri Kazanım<br/>(%)*</b> | <b>BSS<br/>(%)</b> |
|-----|-------------------------|------------------------------|--------------------|
| ROS | 1.0                     | 100.40 ± 0.60                | 1.46               |
| MET | 500.0                   | 101.96 ± 0.17                | 0.40               |
| ROS | 2.0                     | 98.22 ± 0.77                 | 1.91               |
| MET | 500.0                   | 101.80 ± 0.37                | 0.90               |
| ROS | 4.0                     | 100.11 ± 0.23                | 1.90               |
| MET | 500.0                   | 101.65 ± 0.43                | 1.03               |

\*Geri kazanım sonuçları ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. BSS=Bağıl standart sapma (Hesaplamalar için Bkz. Ek 2).

#### F. Özgünlük (Seçicilik)

Geliştirilen CZE yönteminin seçiciliğinin kanıtlanması için standart çözeltilerle plasebo, sentetik preparat ve tablet çözeltilerinin elektroferogramları karşılaştırılmıştır. Şekil 4.7’de görüldüğü gibi ROS, MET ve VER pikleri zeminden ve birbirlerinden tam olarak ayrılabilmişlerdir ve farmasötik preparatlarda bulunan yardımcı maddelerle herhangi bir etkileşim olmamıştır.



Şekil 4.7. Geliştirilen CZE yöntemiyle elde edilen elektroferogramlar.

a) Plasebo, b) Sentetik preparat ve İS, c) Standart ROS, MET ve İS (VER), d) Farmasötik preparat (Avandamet® tablet) ve İS. Koşullar: 25 mM asetat tamponu (pH 4.0), hidrokinamik enjeksiyon (50 mbar, 3 sn), 25 kV, 25 °C,  $\lambda$ : 203 nm. (ROS:  $4.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , MET:  $500.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  ve İS (VER):  $20.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

### G. Sağlamlık ve Tutarlılık

Geliştirilen CZE yönteminin sağlamlık çalışmaları için tampon pH'ı, tampon derişimi, voltaj ve dedektör dalga boyu gibi deneysel parametrelerde küçük değışiklikler yapılarak analiz sonuçlarına etkisi incelenmiştir. Her bir değışiklikle yapılan analiz sonuçları optimum koşullarda bulunan analiz sonuçları ile karşılaştırılmıştır (Tablo 4.11). Tutarlılık çalışmalarında ise, doğrusallık aralığına giren bir derişim seviyesinde farklı iki analizci tarafından yapılan analiz sonuçları karşılaştırılmıştır (Tablo 4.12).

Tablo 4.11. Geliştirilen CZE yönteminin sağlamlık bulguları (Eklenen ROS derişimi:  $6.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , MET derişimi:  $600.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $n=3$ ).

|                                                                                                                                                                                                                                 | ROS                                    |            |                         | MET                                    |            |                         |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|------------|-------------------------|----------------------------------------|------------|-------------------------|
|                                                                                                                                                                                                                                 | Bulunan<br>( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) * | BSS<br>(%) | $t_{\text{hesap}}^{**}$ | Bulunan<br>( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) * | BSS<br>(%) | $t_{\text{hesap}}^{**}$ |
| Normal şartlar                                                                                                                                                                                                                  | $6.04 \pm 0.09$                        | 0.80       | -                       | $601.38 \pm 1.06$                      | 1.24       | -                       |
| Tampon pH 3.9                                                                                                                                                                                                                   | $5.96 \pm 0.06$                        | 1.67       | 1.24                    | $595.49 \pm 1.86$                      | 0.49       | 1.27                    |
| Tampon pH 4.1                                                                                                                                                                                                                   | $5.95 \pm 0.11$                        | 1.77       | 1.29                    | $596.01 \pm 4.20$                      | 1.47       | 0.81                    |
| T. Derişimi 22.5 mM                                                                                                                                                                                                             | $5.96 \pm 0.10$                        | 0.86       | 1.96                    | $595.02 \pm 3.56$                      | 0.41       | 1.40                    |
| T. Derişimi 27.5 mM                                                                                                                                                                                                             | $5.90 \pm 0.02$                        | 1.72       | 2.17                    | $596.42 \pm 4.38$                      | 1.61       | 0.71                    |
| Voltaj 24 kV                                                                                                                                                                                                                    | $6.02 \pm 0.02$                        | 0.81       | 0.64                    | $599.13 \pm 1.21$                      | 0.30       | 0.51                    |
| Voltaj 26 kV                                                                                                                                                                                                                    | $5.92 \pm 0.05$                        | 0.83       | 1.16                    | $595.65 \pm 2.26$                      | 0.60       | 1.20                    |
| $\lambda$ : 201 nm                                                                                                                                                                                                              | $6.07 \pm 0.06$                        | 1.50       | 1.84                    | $595.65 \pm 2.12$                      | 1.53       | 0.84                    |
| $\lambda$ : 205 nm                                                                                                                                                                                                              | $5.89 \pm 0.05$                        | 1.67       | 0.96                    | $604.93 \pm 3.18$                      | 0.35       | 0.79                    |
| <b>Karşılaştırma Sonucu:</b> Her bir sonuç, normal şartlarla bulunan sonuçla karşılaştırılmıştır.<br>$t_{\text{tablo}} = 2.78$ ( $p > 0.05$ ) Sonuçlar arasında fark yoktur (** $t_{\text{hesap}}$ : Hesapla bulunan t değeri). |                                        |            |                         |                                        |            |                         |

\*Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir. BSS=Bağıl standart sapma, istatistiksel karşılaştırma t testi ile yapılmıştır (Hesaplamalar için Bkz. Ek 2 ve Ek 4).

Tablo 4.12. Geliştirilen CZE yönteminin tutarlılık bulguları (Eklenen ROS derişimi: 6.0 µg mL<sup>-1</sup>, MET derişimi: 600.0 µg mL<sup>-1</sup>, n=6).

| ROS                                                                                                                  |                                                                                                 | MET                                                                                                                  |                                                                                                       |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Analizci<br>Bulunan (µg mL <sup>-1</sup> )                                                                        | 2. Analizci<br>Bulunan (µg mL <sup>-1</sup> )                                                   | 1. Analizci<br>Bulunan (µg mL <sup>-1</sup> )                                                                        | 2. Analizci<br>Bulunan (µg mL <sup>-1</sup> )                                                         |
| 6.01                                                                                                                 | 6.05                                                                                            | 598.42                                                                                                               | 601.65                                                                                                |
| 6.08                                                                                                                 | 5.96                                                                                            | 600.43                                                                                                               | 600.13                                                                                                |
| 6.04                                                                                                                 | 6.10                                                                                            | 602.16                                                                                                               | 598.93                                                                                                |
| 6.11                                                                                                                 | 6.12                                                                                            | 596.68                                                                                                               | 601.39                                                                                                |
| 6.14                                                                                                                 | 6.07                                                                                            | 601.24                                                                                                               | 596.86                                                                                                |
| 5.97                                                                                                                 | 6.04                                                                                            | 600.89                                                                                                               | 602.20                                                                                                |
| $\bar{x} = 6.04 \pm 0.02$<br>SS = 0.06<br>BSS = % 0.99<br>% Bağıl Hata = 0.67<br>GA = 5.99-6.09                      | $\bar{x} = 6.06 \pm 0.02$<br>SS = 0.06<br>BSS = % 0.93<br>% Bağıl Hata = 1.00<br>GA = 6.01-6.11 | $\bar{x} = 599.97 \pm 0.83$<br>SS = 2.03<br>BSS = % 0.34<br>% Bağıl Hata = -0.01<br>GA = 597.84-602.10               | $\bar{x} = 600.19 \pm 0.82$<br>SS = 2.01<br>BSS = % 0.34<br>% Bağıl Hata = 0.03<br>GA = 598.08-602.30 |
| <b>Karşılaştırma sonucu:</b> $t_{hesap}=0.58$ , $t_{tablo}= 2.23$<br>Ortalamalar arasında fark yoktur ( $p > 0.05$ ) |                                                                                                 | <b>Karşılaştırma sonucu:</b> $t_{hesap}=0.19$ , $t_{tablo}= 2.23$<br>Ortalamalar arasında fark yoktur ( $p > 0.05$ ) |                                                                                                       |

$\bar{x}$ =Ortalama  $\pm$  standart hata, SS=Standart sapma, BSS=Bağıl standart sapma, GA=Güven aralığı, istatistiksel karşılaştırma t testi ile yapılmıştır (Hesaplamalar için Bkz. Ek 2 ve Ek 4).

#### 4.3.5. CZE Yöntemi ile Farmasötik Preparatların Analiz Bulguları

1 mg ROS / 500 mg MET, 2 mg ROS / 500 mg MET ve 4 mg ROS / 500 mg MET içeren Avandamet<sup>®</sup> tabletlerin analizi geliştirilen CZE yöntemi ve kaynaklarda bulunan HPLC yöntemi (53) ile yapılarak sonuçlar Tablo 4.13’de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar t testi uygulanarak karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ) (83).

Tablo 4.13. Geliştirilen CZE yöntemi ve karşılaştırma (HPLC) yöntemi ile elde edilen farmasötik preparat analiz sonuçları (n=6).

|        |                     | Bulunan (mg)     |         |              |                            |         |              |                                   |
|--------|---------------------|------------------|---------|--------------|----------------------------|---------|--------------|-----------------------------------|
| İçerik | Etiket Miktarı (mg) | CZE Yöntemi      |         |              | Karşılaştırma Yöntemi (53) |         |              | İstatistiksel Karşılaştırma       |
|        |                     | $\bar{X} \pm SH$ | BSS (%) | % Bağlı Hata | $\bar{X} \pm SH$           | BSS (%) | % Bağlı Hata |                                   |
| ROS    | 1.0                 | 1.03 ± 0.01      | 1.94    | 3.00         | 1.03 ± 0.01                | 2.91    | 3.00         | $t_{hesap} = 0$ , Fark yoktur.    |
| MET    | 500.0               | 508.15 ± 1.43    | 0.69    | 1.63         | 496.50 ± 5.30              | 2.61    | -0.90        | $t_{hesap} = 2.12$ , Fark yoktur. |
| ROS    | 2.0                 | 1.98 ± 0.02      | 2.02    | -1.00        | 1.96 ± 0.02                | 2.55    | -2.00        | $t_{hesap} = 0.77$ , Fark yoktur. |
| MET    | 500.0               | 495.36 ± 2.24    | 1.11    | -0.93        | 500.28 ± 3.42              | 1.68    | 0.06         | $t_{hesap} = 1.20$ , Fark yoktur. |
| ROS    | 4.0                 | 4.03 ± 0.02      | 1.24    | 0.75         | 3.93 ± 0.03                | 2.29    | -4.25        | $t_{hesap} = 2.14$ , Fark yoktur. |
| MET    | 500.0               | 499.26 ± 0.74    | 0.36    | -0.15        | 502.76 ± 3.76              | 1.83    | 0.55         | $t_{hesap} = 0.91$ , Fark yoktur. |

$\bar{x} \pm SH$ =Ortalama  $\pm$  standart hata, BSS=Bağıl standart sapma. Sonuçlar t testi ile karşılaştırılmıştır (Hesaplamalar için Bkz. Ek 2 ve Ek 4).

### **Standart Ekleme Yöntemi**

Geliştirilen CZE yöntemi ile farmasötik preparat analizi, standart ekleme yöntemi uygulanarak da yapılmıştır. Pik normalizasyon oranları eklenen standart ROS ve MET derişimine karşı grafiğe geçirildiğinde elde edilen regresyon denklemleri şu şekildedir: ROS için  $y = (0.0257 \pm 0.0002)x + (0.1135 \pm 0.001)$ ,  $r=0.9999$  ve MET için  $y = (0.0256 \pm 0.001)x + (11.536 \pm 0.209)$ ,  $r=0.9993$  ( $n=3$ ).

Standart ekleme doğrularının eğimleri kalibrasyon doğrularının eğimlerine çok yakın bulunduğundan katkı maddelerinin analizi etkilemediğine karar verilmiş ve farmasötik preparat analizleri doğrudan kalibrasyon yöntemiyle yapılmıştır.

## **4.4. HPLC Yöntemine Ait Bulgular**

### **4.4.1. Kromatografik Koşulların Optimizasyonu**

ROS ve MET'in HPLC yöntemi ile aynı anda analizi için en uygun kromatografik koşulların belirlenmesinde, sabit faz seçimi, hareketli fazın bileşimi, pH'sı ve akış hızının ROS ve MET'in kromatografik davranışı üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Kromatografik sistemin test edilen kromatografik koşullardaki  $t_0$  değerinin saptanması için metanol sisteme enjekte edilmiş ve metanolün alıkonma zamanı  $t_0$  değeri olarak alınmıştır.

#### **A. Sabit Faz Seçimi**

MET yüksek polariteye sahip olduğundan, ters faz kromatografisi ile analizinde çok kısa alıkonma zamanı elde edilmektedir. Ters faz kromatografisi ile ayırım çalışmalarında, sabit faz olarak fenil kolon kullanımı ile  $C_{18}$  kolondan daha uygun alıkonma zamanı elde edildiğinden çalışmalara Ace 5 marka fenil kolon (250 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m) ile devam edilmiştir.

#### **B. Hareketli Fazın Belirlenmesi**

##### **1. Organik Çözücü Türü ve Miktarının Belirlenmesi**

Organik çözücü etkisinin incelenmesi için asetonyitril:fosfat tamponu ve metanol:fosfat tamponu ikili sistemleri kullanılmıştır. Bu amaçla pH'ı 5.5 olan 10

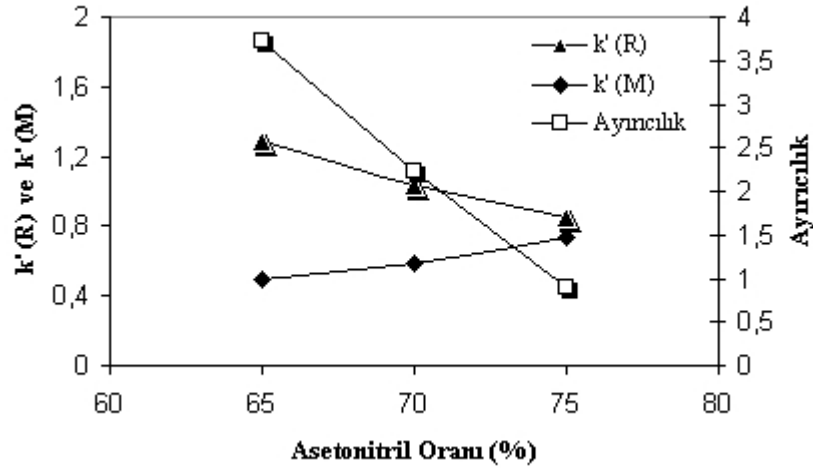
mM fosfat tamponuna değişik oranlarda asetonitril veya metanol eklenerek hareketli fazlar hazırlanmıştır. Analiz işlemleri 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızında yapılmıştır.

Hareketli faz sisteminde metanol kullanıldığında ROS'un alıkonma zamanının çok fazla artması nedeniyle organik çözücü olarak asetonitril kullanılmasına karar verilmiştir. Hareketli fazın asetonitril miktarındaki değişimin kromatografik parametrelere etkisi Tablo 4.14'de verilmiştir. % 65, 70 ve 75 oranlarında eklenen asetonitril hacmine göre kapasite faktörü ve ayırıcılık değişimi Şekil 4.8'de gösterilmiştir. Bu verilere göre en uygun oran % 70 asetonitril olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.14. Hareketli faz asetonitril oranının kromatografik parametrelere etkisi.

|                | ROS               |                   |                   | MET               |                   |                   |
|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| % ACN          | 65                | 70                | 75                | 65                | 70                | 75                |
| t (dk)         | 4.81              | 4.26              | 3.89              | 3.15              | 3.33              | 3.63              |
| k'             | 1.29              | 1.03              | 0.85              | 0.50              | 0.59              | 0.73              |
| $\alpha$       | 1.42<br>(ROS-VER) | 1.59<br>(ROS-VER) | 2.15<br>(ROS-VER) | 2.58<br>(ROS-MET) | 1.75<br>(ROS-MET) | 1.16<br>(ROS-MET) |
| R <sub>s</sub> | 2.09<br>(ROS-VER) | 2.69<br>(ROS-VER) | 4.0<br>(ROS-VER)  | 3.73<br>(ROS-MET) | 2.24<br>(ROS-MET) | 0.90<br>(ROS-MET) |
| N              | 12054             | 11542             | 11298             | 6356              | 8130              | 9658              |
| PSO            | 1.19              | 1.21              | 1.22              | 1.26              | 1.35              | 1.30              |

ACN: Asetonitril, t: Alıkonma zamanı, k': Kapasite faktörü,  $\alpha$ : Seçicilik, R<sub>s</sub>: Ayırıcılık, N: Teorik tabaka sayısı, PSO: Pik simetri oranı (h yüksekliğinin % 10 değerinde hesaplanmıştır).



Şekil 4.8. Hareketli faz asetonitril oranı ile kapasite faktörü ve ayırıcılığın değişimi [k' (R): ROS'un kapasite faktörü, k' (M): MET'in kapasite faktörü], Koşullar: Hareketli faz: Asetonitril:10 mM pH 5.5 fosfat tamponu, 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı, ROS, MET derişimi: 2.0 µg mL<sup>-1</sup>, VER derişimi: 10.0 µg mL<sup>-1</sup>.

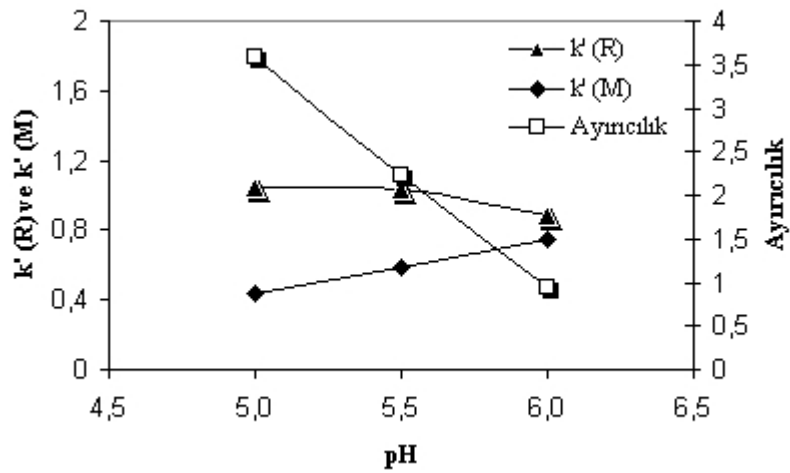
## 2. Hareketli Faz pH'nın Belirlenmesi

Hareketli faz pH'nın en uygun değerinin saptanması amacıyla asetonitril ve 10 mM fosfat tamponu (70:30, h/h) içeren hareketli faz bileşimi kullanılmış, hareketli faz akış hızı 1 mL dk<sup>-1</sup> olarak ayarlanmış ve fosfat tamponunun pH değeri 5.0, 5.5 ve 6.0 olarak değiştirilmiştir. Kromatografik bulgular Tablo 4.15'de verilmiştir. pH değerindeki değişimin kapasite faktörü ve ayırıcılık üzerine etkileri Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Bu verilere göre en uygun olan pH 5.5 seçilmiştir.

Tablo 4.15. Hareketli faz tampon pH'ının kromatografik parametrelere etkisi.

|                | ROS               |                   |                   | MET               |                   |                   |
|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| pH             | 5.0               | 5.5               | 6.0               | 5.0               | 5.5               | 6.0               |
| t (dk)         | 4.31              | 4.26              | 3.97              | 3.02              | 3.33              | 3.68              |
| k'             | 1.05              | 1.03              | 0.89              | 0.44              | 0.59              | 0.75              |
| $\alpha$       | 1.18<br>(ROS-VER) | 1.59<br>(ROS-VER) | 2.36<br>(ROS-VER) | 2.39<br>(ROS-MET) | 1.75<br>(ROS-MET) | 1.19<br>(ROS-MET) |
| R <sub>s</sub> | 1.0<br>(ROS-VER)  | 2.69<br>(ROS-VER) | 6.62<br>(ROS-VER) | 3.58<br>(ROS-MET) | 2.24<br>(ROS-MET) | 0.95<br>(ROS-MET) |
| N              | 11573             | 11542             | 11108             | 4787              | 8130              | 9588              |
| PSO            | 1.22              | 1.21              | 1.23              | 1.13              | 1.35              | 1.32              |

t: Alıkonma zamanı, k': Kapasite faktörü,  $\alpha$ : Seçicilik, R<sub>s</sub>: Ayırıcılık, N: Teorik tabaka sayısı, PSO: Pik simetri oranı (h yüksekliğinin % 10 değerinde hesaplanmıştır).



Şekil 4.9. Hareketli faz pH'ı ile kapasite faktörü ve ayırıcılığın değişimi

[k' (R): ROS'un kapasite faktörü, k' (M): MET'in kapasite faktörü],

Koşullar: Hareketli faz: Asetonitril:10 mM fosfat tamponu (70:30 h/h),

1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı, ROS, MET derişimi: 2.0 µg mL<sup>-1</sup>, VER derişimi:10.0

µg mL<sup>-1</sup>.

### 3. Tampon Türü ve Derişiminin Belirlenmesi

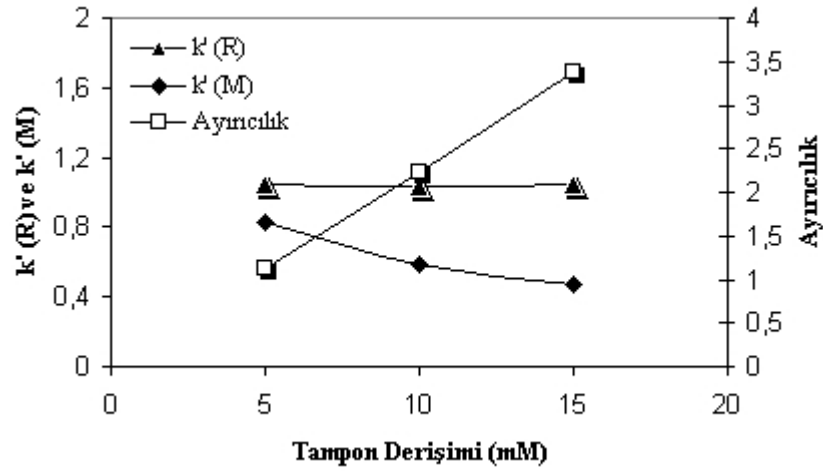
Tampon türü seçimi için pH'ı 5.5 olan 10 mM fosfat, asetat, sitrat tamponları ve asetonitril karışımından (30:70, h/h) oluşan hareketli fazlar denenmiştir. Alıkonma süreleri ve ayırıcılık faktörleri göz önünde tutulduğunda fosfat tamponu en iyi sonuçları vermiştir.

Fosfat tamponu derişiminin ROS ve MET'in analizine etkisinin araştırılması için pH'ı 5.5 olan 5 mM, 10 mM ve 15 mM fosfat tamponu ve asetonitril (30:70, h/h) içeren çözeltiler hareketli faz olarak denenmiştir. Bu koşullarda elde edilen kromatografik bulgular Tablo 4.16'da verilmiştir. Tampon derişimindeki değişimin kapasite faktörü ve ayırıcılık üzerine etkileri Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Bu verilere göre en uygun derişim 10 mM olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.16. Hareketli faz tampon derişiminin kromatografik parametrelere etkisi.

|                | ROS               |                   |                   | MET               |                   |                   |
|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Derişim        | 5 mM              | 10 mM             | 15 mM             | 5 mM              | 10 mM             | 15 mM             |
| t (dk)         | 4.30              | 4.26              | 4.31              | 3.85              | 3.33              | 3.08              |
| k'             | 1.05              | 1.03              | 1.05              | 0.83              | 0.59              | 0.47              |
| $\alpha$       | 2.10<br>(ROS-VER) | 1.59<br>(ROS-VER) | 1.33<br>(ROS-VER) | 1.27<br>(ROS-MET) | 1.75<br>(ROS-MET) | 2.23<br>(ROS-MET) |
| R <sub>s</sub> | 4.50<br>(ROS-VER) | 2.69<br>(ROS-VER) | 1.74<br>(ROS-VER) | 1.13<br>(ROS-MET) | 2.24<br>(ROS-MET) | 3.37<br>(ROS-MET) |
| N              | 11538             | 11542             | 11674             | 9771              | 8130              | 6124              |
| PSO            | 1.22              | 1.21              | 1.21              | 1.37              | 1.35              | 1.23              |

t: Alıkonma zamanı, k': Kapasite faktörü,  $\alpha$ : Seçicilik, R<sub>s</sub>: Ayırıcılık, N: Teorik tabaka sayısı, PSO: Pik simetri oranı (h yüksekliğinin % 10 değerinde hesaplanmıştır).



Şekil 4.10. Hareketli faz tampon derişimi ile kapasite faktörü ve ayırıcılığın değışimi [k' (R): ROS'un kapasite faktörü, k' (M): MET'in kapasite faktörü], Koşullar: Hareketli faz: Asetonitril: pH 5.5 fosfat tamponu (70:30 h/h), 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı, ROS, MET derişimi: 2.0 µg mL<sup>-1</sup>, VER derişimi: 10.0 µg mL<sup>-1</sup>.

### C. Hareketli Faz Akış Hızının Belirlenmesi

ROS ve MET'in analizinde hareketli faz akış hızının ayırma etkisinin incelenmesi amacıyla asetonitril ve 10 mM pH 5.5 fosfat tamponu (70:30, h/h) içeren hareketli faz. 0.8, 1.0 ve 1.2 mL dk<sup>-1</sup> akış hızlarında HPLC sistemine verilmiştir. Seçilen akış hızı ayırıcılığın en yüksek değerde olduğu 1.0 mL dk<sup>-1</sup>'dir.

### D. İç Standart Seçimi

ROS ve MET'in HPLC yöntemi ile aynı anda analizinde kullanılacak iç standardın seçimi için sefepim, sülfizaksazol, diflunisal, mikonazol, metronidazol, diklofenak ve verapamil denenmiştir. Verapamil, denen diğer maddeler gibi ROS veya MET ile birlikte gelmemesi ve analiz süresini çok fazla uzatmaması nedeniyle seçilmiştir.

### E. Dedektör Dalga Boyunun Seçilmesi

Dedektör dalga boyunun seçilmesi için ROS, MET ve VER'in UV spektrumları incelenerek seçilen 225, 235 ve 245 nm'de analizler yapılmıştır. Üç maddenin de en yüksek absorbans gösterdiği dalga boyu olan 225 nm'de 2.1 dakikada hareketli fazdan kaynaklanan pik gözleendiğinden girişimleri önlemek için bu pikin gözlenmediği 245 nm dedektör dalga boyu olarak seçilmiştir.

Sonuç olarak ROS ve MET'in HPLC yöntemi ile aynı anda analizinde hareketli faz olarak asetonitril ve 10 mM pH 5.5 fosfat tamponu (70:30 h/h) seçilmiştir ve akış hızı 1.0 mL dk<sup>-1</sup>'dir. UV dedektörle 245 nm'de yapılan analizlerde ROS, MET ve iç standart VER'in alıkonma zamanları sırasıyla 4.26 dk, 3.33 dk ve 5.54 dk'dır.

Belirlenen koşullarda 2 µg mL<sup>-1</sup> ROS, 2 µg mL<sup>-1</sup> MET ve 10 µg mL<sup>-1</sup> VER içeren standart çözeltisi sisteme 10 kez enjekte edilmiş ve kromatografik parametreler değerlendirilmiştir (Tablo 4.17).

Tablo 4.17. Geliştirilen HPLC yönteminde ROS ve MET için elde edilen kromatografik parametreler (n=10).

|                      | <b>ROS</b>                                                        | <b>MET</b>                                                        |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| <b>t (dk)</b>        | $\bar{x} = 4.26 \pm 0.001$<br>SS = 0.004<br>BSS = % 0.10          | $\bar{x} = 3.33 \pm 0.002$<br>SS = 0.005<br>BSS = % 0.15          |
| <b>Pik Alanı</b>     | $\bar{x} = 136274.67 \pm 316.69$<br>SS = 950.07<br>BSS = % 0.70   | $\bar{x} = 164559.56 \pm 441.82$<br>SS = 1325.46<br>BSS = % 0.81  |
| <b>k'</b>            | $\bar{x} = 1.03 \pm 0.001$<br>SS = 0.004<br>BSS = % 0.43          | $\bar{x} = 0.59 \pm 0.001$<br>SS = 0.003<br>BSS = % 0.57          |
| <b>PSO</b>           | $\bar{x} = 1.21 \pm 0.003$<br>SS = 0.008<br>BSS = % 0.69          | $\bar{x} = 1.35 \pm 0.004$<br>SS = 0.011<br>BSS = % 0.83          |
| <b>R<sub>s</sub></b> | $\bar{x} = 2.74 \pm 0.01$ (ROS-VER)<br>SS = 0.020<br>BSS = % 0.62 | $\bar{x} = 2.26 \pm 0.01$ (ROS-MET)<br>SS = 0.019<br>BSS = % 0.77 |
| <b>N</b>             | $\bar{x} = 11542.11 \pm 16.72$<br>SS = 52.86<br>BSS = % 0.46      | $\bar{x} = 8130.56 \pm 25.79$<br>SS = 81.55<br>BSS = % 1.00       |

t: Alıkonma zamanı, k': Kapasite faktörü (metanol enjeksiyonu ile bulunan ölü hacim (t<sub>0</sub>): 2.1 dk), PSO: Pik simetri oranı (h yüksekliğinin % 10 değerinde hesaplanmıştır), R<sub>s</sub>: Ayırıcılık, N: Teorik tabaka sayısı.

#### 4.4.2. HPLC Yönteminin Validasyonu

##### A. Kararlılık

Bölüm 3.11’de bahsedildiği gibi izlenen ROS ve MET’in kısa ve uzun dönem kararlılık sonuçları Tablo 4.18’de verilmiştir.

Tablo 4.18. ROS ve MET’in HPLC yöntemi ile elde edilen kararlılık bulguları (n=3).

|            | <b>Kısa dönem kararlılık<br/>(24 saat, oda sıcaklığı)</b> |         | <b>Uzun dönem kararlılık<br/>(4 ay, 4 °C)</b> |         |
|------------|-----------------------------------------------------------|---------|-----------------------------------------------|---------|
|            | % Kalan                                                   | BSS (%) | % Kalan                                       | BSS (%) |
| <b>ROS</b> | 98.14 ± 0.24                                              | 1.48    | 99.09 ± 0.18                                  | 0.94    |
| <b>MET</b> | 99.44 ± 0.35                                              | 2.14    | 101.91 ± 0.55                                 | 1.34    |

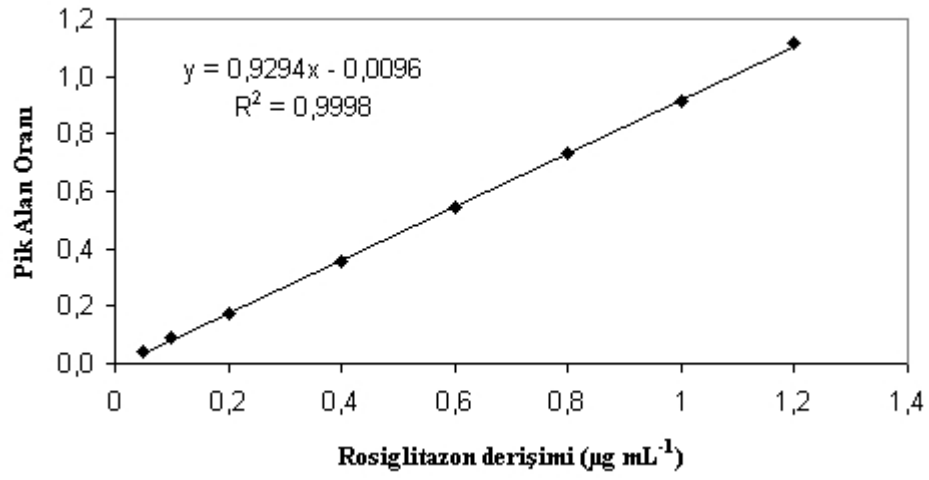
% Kalan=(Belirtilen süre sonunda çözeltinin dedektör cevabı / Taze çözeltinin dedektör cevabı)x100).

##### B. Doğrusallık

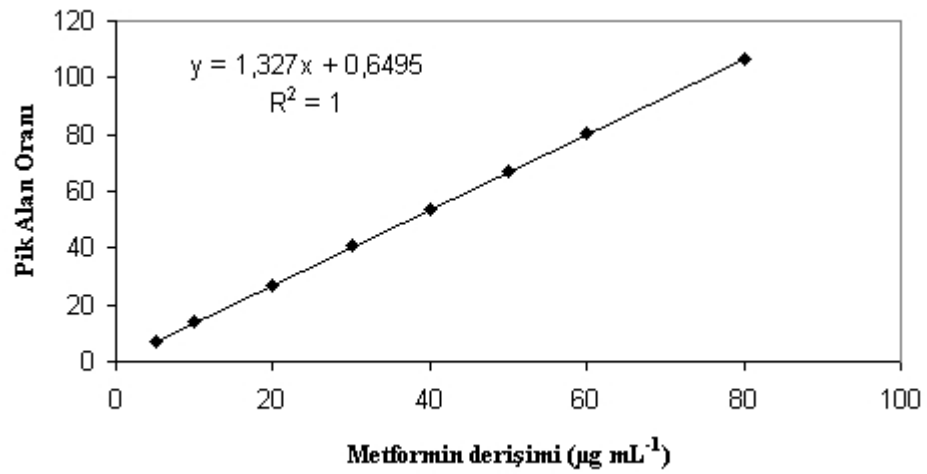
Optimize edilen HPLC analiz koşullarında, farmasötik preparatlardaki miktarlar göz önünde bulundurularak, ROS için 0.05-1.2 µg mL<sup>-1</sup> ve MET için 5.0-80.0 µg mL<sup>-1</sup> derişim aralıklarında ROS ve MET’in iç standarda göre pik alan oranları grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğruları oluşturulmuş ve her durumda 5.0 µg mL<sup>-1</sup> VER iç standart olarak eklenmiştir (Şekil 4.11 ve 4.12).

Farklı çözeltiler hazırlanarak elde edilen 10 kalibrasyon eğrisinin ortalama denklemleri ve istatistiksel değerleri Tablo 4.19’da verilmiştir.

Kalibrasyon eğrilerinin doğrusallıktan ayrılış ve korrelasyon katsayılarının önem kontrolüne ait istatistiksel değerlendirme sonuçları Tablo 4.20 ve Tablo 4.21’de gösterilmiştir.



Şekil 4.11. Farmasötik preparat analizi için geliştirilen HPLC yönteminde ROS için elde edilen kalibrasyon eğrisi.



Şekil 4.12. Farmasötik preparat analizi için geliştirilen HPLC yönteminde MET için elde edilen kalibrasyon eğrisi.

Tablo 4.19. Farmasötik preparat analizi için geliştirilen HPLC yöntemine ait kalibrasyon eğrilerinin özellikleri (n=10).

|                                            | <b>ROS</b>                   | <b>MET</b>                    |
|--------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Regresyon denklemi*                        | $y = 0.9294x - 0.0096$       | $y = 1.327x + 0.6495$         |
| Eğimin standart hatası                     | 0.018                        | 0.012                         |
| Kesişimin standart hatası                  | 0.0015                       | 0.1335                        |
| Korrelasyon katsayısı (r)                  | 0.9999                       | 1                             |
| Tanımlayıcılık katsayısı (R <sup>2</sup> ) | 0.9998                       | 1                             |
| Doğrusallık aralığı                        | 0.02-1.2 µg mL <sup>-1</sup> | 0.02-80.0 µg mL <sup>-1</sup> |
| LOD                                        | 0.01 µg mL <sup>-1</sup>     | 0.005 µg mL <sup>-1</sup>     |
| LOQ                                        | 0.02 µg mL <sup>-1</sup>     | 0.02 µg mL <sup>-1</sup>      |

\* $y = bx + a$ ;  $x$  : µg mL<sup>-1</sup> biriminde derişim,  $y$  : Pik alan oranları,  $a$  : Kesişim,  $b$  : Eğim.

Tablo 4.20. Farmasötik preparat analizi için geliştirilen HPLC yöntemine ait kalibrasyon eğrilerinin doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü\*.

|                      | <b>ROS</b>                           | <b>MET</b>                           |
|----------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| <b>RKT</b>           | 1.106                                | 8182.85                              |
| <b>YOAKT</b>         | 1.113                                | 8183.15                              |
| <b>RAKT</b>          | 0.007                                | 0.3                                  |
| <b>RKO</b>           | 1.106                                | 8182.85                              |
| <b>RAKO</b>          | 0.0012                               | 0.05                                 |
| <b>F<sub>H</sub></b> | 921.67                               | 163657                               |
| <b>F<sub>T</sub></b> | 5.99                                 | 5.99                                 |
| <b>Karar</b>         | İlişki doğrusaldır<br>( $p < 0.05$ ) | İlişki doğrusaldır<br>( $p < 0.05$ ) |

(\*İstatistiksel terimler ve hesaplamalar için Bkz. Ek 3).

Tablo 4.21. Farmasötik preparat analizi için geliştirilen HPLC yöntemine ait kalibrasyon eğrilerinin korrelasyon katsayılarının önem kontrolü\*.

|                      | <b>ROS</b>                                           | <b>MET</b>                                           |
|----------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| <b>n</b>             | 8                                                    | 8                                                    |
| <b>r</b>             | 0.9999                                               | 1                                                    |
| <b>S<sub>r</sub></b> | 0.006                                                | 0.003                                                |
| <b>t<sub>H</sub></b> | 166.65                                               | 333.33                                               |
| <b>t<sub>T</sub></b> | 2.45                                                 | 2.45                                                 |
| <b>Karar</b>         | “r” tesadüfen bulunmuş bir değer değildir (p < 0.05) | “r” tesadüfen bulunmuş bir değer değildir (p < 0.05) |

(\*İstatistiksel terimler ve hesaplamalar için Bkz. Ek 3).

### C. Duyarlılık

ROS ve MET’in HPLC yöntemi ile analizinde LOD ve alt tayin sınırı LOQ değerleri Tablo 4.19’da verilmiştir.

### D. Doğruluk ve Kesinlik

Kullanılan HPLC sisteminin tekrarlanabilirliğinin test edilmesi için doğrusal aralık içerisinde bir derişim değerinde hazırlanan ( $2.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  ROS ve MET) aynı standart çözeltiden 10 enjeksiyon yapılmış ve cihaz parametreleri değerlendirilmiştir (Bkz. Tablo 4.17).

ROS ve MET’in HPLC ile tayini için yapılan doğruluk ve kesinlik çalışmalarına ait gün içi ve günler arası değerlendirme sonuçları Tablo 4.22 ve 4.23’de verilmiştir.

ROS ve MET’in HPLC ile tayininde yöntem tekrarlanabilirliğine ait sonuçlar Tablo 4.24’de verilmiştir.

Tablo 4.22. Farmasötik preparat analizi için geliştirilen HPLC yöntemiyle ROS için elde edilen gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk bulguları.

| ROS miktarı<br>( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | Gün İçi<br>Bulunan Miktar<br>( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )                                                                                               | Günler Arası<br>Bulunan Miktar<br>( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )                                                                                           |
|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0.1                                      | 0.11<br>0.11<br>0.11<br>0.11<br>0.10<br>0.10<br><br>$\bar{x} = 0.11 \pm 0.004$<br>SS = 0.01<br>BSS = % 4.84<br>% Bağıl Hata = 10.0<br>GA = 0.10-0.12 | 0.09<br>0.10<br>0.11<br>0.09<br>0.11<br>0.10<br><br>$\bar{x} = 0.10 \pm 0.004$<br>SS = 0.01<br>BSS = % 8.94<br>% Bağıl Hata = 0<br>GA = 0.09-0.11     |
| 0.4                                      | 0.40<br>0.41<br>0.40<br>0.40<br>0.41<br>0.40<br><br>$\bar{x} = 0.40 \pm 0.004$<br>SS = 0.01<br>BSS = % 1.28<br>% Bağıl Hata = 0<br>GA = 0.39-0.41    | 0.39<br>0.39<br>0.40<br>0.39<br>0.40<br>0.39<br><br>$\bar{x} = 0.39 \pm 0.004$<br>SS = 0.01<br>BSS = % 1.31<br>% Bağıl Hata = -2.50<br>GA = 0.38-0.40 |
| 1.0                                      | 1.00<br>1.01<br>1.00<br>1.00<br>0.99<br>0.99<br><br>$\bar{x} = 1.00 \pm 0.004$<br>SS = 0.01<br>BSS = % 0.75<br>% Bağıl Hata = 0<br>GA = 0.99-1.01    | 1.10<br>1.06<br>1.06<br>1.02<br>1.04<br>1.02<br><br>$\bar{x} = 1.05 \pm 0.01$<br>SS = 0.03<br>BSS = % 2.89<br>% Bağıl Hata = 5.0<br>GA = 1.02-1.08    |

$\bar{x} \pm SH$ =Ortalama  $\pm$  standart hata, SS=Standart sapma, BSS=Bağıl standart sapma, GA=Güven aralığı (Hesaplamalar için Bkz. Ek 2)

Tablo 4.23. Farmasötik preparat analizi için geliştirilen HPLC yöntemiyle MET için elde edilen gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk bulguları.

| <b>MET miktarı<br/>(<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b> | <b>Gün İçi<br/>Bulunan Miktar<br/>(<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>                                                                                      | <b>Günler Arası<br/>Bulunan Miktar<br/>(<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>                                                                                |
|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 10.0                                                      | 9.98<br>9.85<br>9.83<br>9.85<br>9.81<br>9.92<br><br>$\bar{x} = 9.87 \pm 0.02$<br>SS = 0.06<br>BSS = % 0.65<br>% Bağıl Hata = -1.30<br>GA = 9.82-9.92          | 9.85<br>9.83<br>9.80<br>10.13<br>10.06<br>10.09<br><br>$\bar{x} = 9.96 \pm 0.06$<br>SS = 0.15<br>BSS = % 1.49<br>% Bağıl Hata = -0.40<br>GA = 9.81-10.11     |
| 30.0                                                      | 29.91<br>29.84<br>29.87<br>29.84<br>29.97<br>29.75<br><br>$\bar{x} = 29.86 \pm 0.03$<br>SS = 0.07<br>BSS = % 0.25<br>% Bağıl Hata = -0.47<br>GA = 29.78-29.94 | 30.05<br>30.22<br>30.31<br>30.03<br>30.12<br>30.12<br><br>$\bar{x} = 30.14 \pm 0.04$<br>SS = 0.11<br>BSS = % 0.35<br>% Bağıl Hata = 0.47<br>GA = 30.04-30.24 |
| 60.0                                                      | 60.09<br>59.85<br>60.15<br>60.25<br>60.11<br>60.02<br><br>$\bar{x} = 60.08 \pm 0.06$<br>SS = 0.14<br>BSS = % 0.22<br>% Bağıl Hata = 0.13<br>GA = 59.93-60.23  | 60.21<br>60.53<br>60.16<br>59.86<br>59.74<br>60.18<br><br>$\bar{x} = 60.11 \pm 0.11$<br>SS = 0.28<br>BSS = % 0.47<br>% Bağıl Hata = 0.18<br>GA = 59.83-60.39 |

$\bar{x} \pm SH$ =Ortalama  $\pm$  standart hata, SS=Standart sapma, BSS=Bağıl standart sapma, GA=Güven aralığı (Hesaplamalar için Bkz. Ek 2)

Tablo 4.24. Farmasötik preparat analizi için geliştirilen HPLC yönteminin tekrarlanabilirliğine ait analiz bulguları (Eklenen ROS ve MET derişimi:2.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

| ROS                                                                                              | MET                                                                                              |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Bulunan ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )                                                                | Bulunan ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )                                                                |
| 2.02                                                                                             | 2.08                                                                                             |
| 2.05                                                                                             | 2.01                                                                                             |
| 2.06                                                                                             | 2.06                                                                                             |
| 2.06                                                                                             | 2.07                                                                                             |
| 2.07                                                                                             | 2.03                                                                                             |
| 2.04                                                                                             | 2.01                                                                                             |
| 2.02                                                                                             | 2.04                                                                                             |
| 2.04                                                                                             | 2.02                                                                                             |
| 2.01                                                                                             | 2.02                                                                                             |
| 2.04                                                                                             | 2.03                                                                                             |
| $\bar{x} = 2.04 \pm 0.006$<br>SS = 0.02<br>BSS = % 0.96<br>% Bağıl Hata = 2.00<br>GA = 2.03-2.05 | $\bar{x} = 2.04 \pm 0.008$<br>SS = 0.02<br>BSS = % 0.98<br>% Bağıl Hata = 2.00<br>GA = 2.02-2.06 |

$\bar{x}$ =Ortalama  $\pm$  standart hata, SS=Standart sapma, BSS=Bağıl standart sapma, GA=Güven aralığı (Hesaplamalar için Bkz. Ek 2).

### E. Geri Kazanım

Geri kazanım deneyleri Bölüm 3.8’de anlatıldığı gibi hazırlanan sentetik preparat çözeltisine farmasötik preparatlarda belirtilen miktarlara uygun olarak 3 farklı derişim oranında olmak üzere (1 mg ROS / 500 mg MET, 2 mg ROS / 500 mg MET, 4 mg ROS / 500 mg MET) ROS, MET ve aynı derişimde VER’in eklenmesi ile yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.25’de gösterilmiştir.

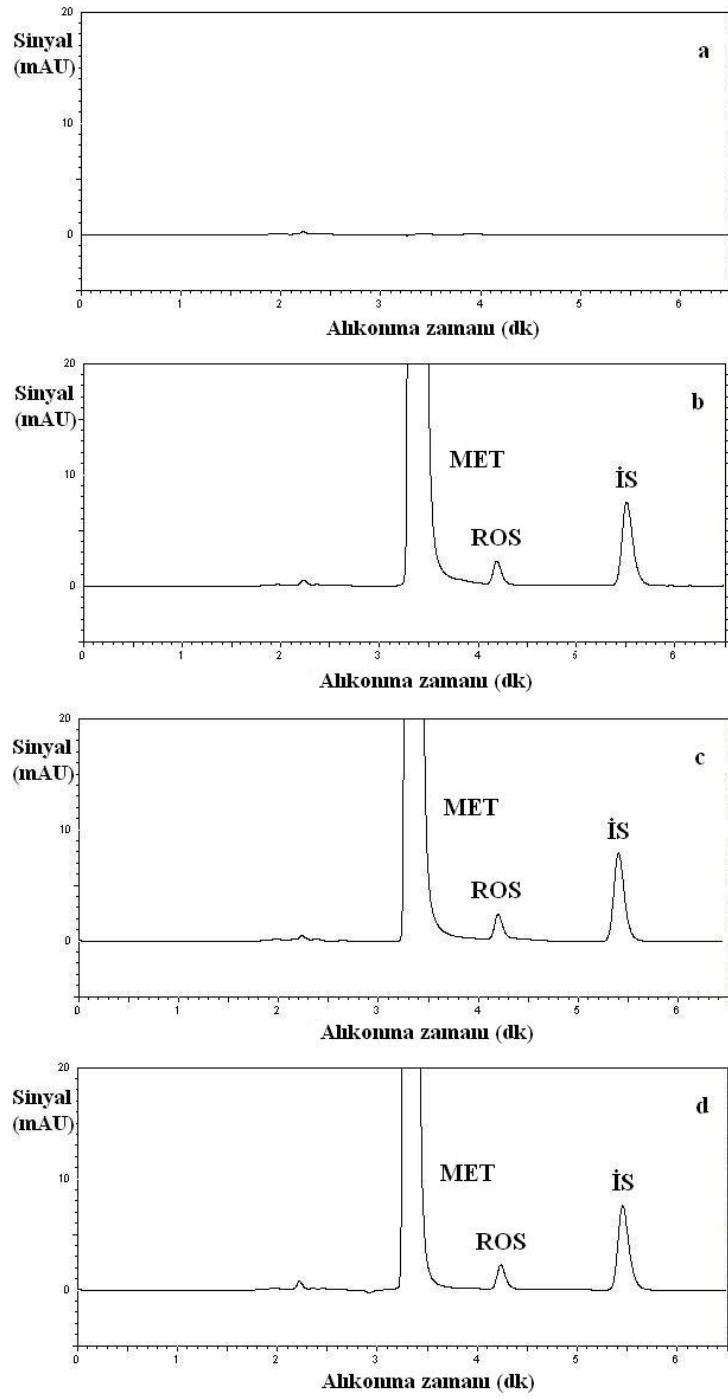
Tablo 4.25. Farmasötik preparat analizi için geliştirilen HPLC yönteminde ROS ve MET için geri kazanım verileri (n=6).

|     | <b>Eklenen<br/>(mg)</b> | <b>Geri Kazanım*</b><br>(%) | <b>BSS</b><br>(%) |
|-----|-------------------------|-----------------------------|-------------------|
| ROS | 1.0                     | 101.67 ± 1.05               | 2.54              |
| MET | 500.0                   | 98.60 ± 0.22                | 0.55              |
| ROS | 2.0                     | 101.33 ± 1.11               | 2.68              |
| MET | 500.0                   | 99.57 ± 0.56                | 1.38              |
| ROS | 4.0                     | 99.54 ± 0.51                | 1.26              |
| MET | 500.0                   | 98.14 ± 0.38                | 0.95              |

\*Geri kazanım sonuçları ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. BSS=Bağıl standart sapma (Hesaplamalar için Bkz. Ek 2).

#### **F. Özgünlük (Seçicilik)**

Geliştirilen HPLC yönteminin seçiciliğinin kanıtlanması için standart çözeltilerle plasebo, sentetik preparat ve tablet çözeltilerinin kromatogramları karşılaştırılmıştır. Şekil 4.13’de görüldüğü gibi ROS, MET ve VER pikleri zeminden ve birbirlerinden tam olarak ayrılabilmişlerdir ve farmasötik preparatlarda bulunan yardımcı maddelerle herhangi bir etkileşim olmamıştır.



Şekil 4.13. Geliştirilen HPLC yöntemiyle elde edilen kromatogramlar.

a) Plasebo, b) Sentetik preparat ve İS, c) Farmasötik preparat (Avandamet<sup>®</sup> tablet) ve İS, d) Standart ROS, MET ve İS (VER), Hareketli faz: Asetonitril:10 mM pH 5.5 fosfat tamponu (70:30 h/h), 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı (ROS: 0.2 µg mL<sup>-1</sup>, MET:50.0 µg mL<sup>-1</sup> ve İS: 5 µg mL<sup>-1</sup>).

### **G. Sağlamlık ve Tutarlılık**

Geliştirilen HPLC yönteminin sağlamlık çalışmaları için hareketli faz bileşimi, tampon derişimi, tampon pH'ı, ve akış hızı gibi deneysel parametrelerde küçük değışiklikler yapılarak analiz sonuçlarına etkisi incelenmiştir. Her bir değışiklikle yapılan analiz sonuçları optimum koşullarda bulunan analiz sonuçları ile karşılaştırılmıştır (Tablo 4.26).

Tutarlılık çalışmalarında ise, doğrusallık aralığına giren bir derişim seviyesinde farklı iki analizci tarafından yapılan analiz sonuçları karşılaştırılmıştır (Tablo 4.27).

Tablo 4.26. Farmasötik preparat analizi için geliştirilen HPLC yöntemine ait sağlamlık bulguları (Eklenen ROS derişimi: 0.4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , MET derişimi: 30.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , n=3).

|                                                                                                                                                                                                                                | ROS                                   |            |                         | MET                                   |            |                         |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|------------|-------------------------|---------------------------------------|------------|-------------------------|
|                                                                                                                                                                                                                                | Bulunan<br>( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )* | BSS<br>(%) | $t_{\text{hesap}}^{**}$ | Bulunan<br>( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )* | BSS<br>(%) | $t_{\text{hesap}}^{**}$ |
| Normal şartlar                                                                                                                                                                                                                 | 0.41 $\pm$ 0.002                      | 1.78       | -                       | 29.84 $\pm$ 0.03                      | 0.94       | -                       |
| ACN Oranı % 68                                                                                                                                                                                                                 | 0.41 $\pm$ 0.003                      | 1.40       | 0                       | 29.19 $\pm$ 0.102                     | 0.61       | 0.65                    |
| ACN Oranı % 72                                                                                                                                                                                                                 | 0.41 $\pm$ 0.004                      | 1.42       | 0                       | 29.38 $\pm$ 0.384                     | 2.27       | 1.18                    |
| Tampon pH 5.3                                                                                                                                                                                                                  | 0.41 $\pm$ 0.001                      | 0.02       | 0                       | 29.02 $\pm$ 0.12                      | 0.70       | 2.75                    |
| Tampon pH 5.7                                                                                                                                                                                                                  | 0.41 $\pm$ 0.01                       | 2.44       | 0                       | 29.49 $\pm$ 0.29                      | 1.72       | 1.16                    |
| T. Derişimi 9 mM                                                                                                                                                                                                               | 0.43 $\pm$ 0.003                      | 1.27       | 2.72                    | 29.46 $\pm$ 0.058                     | 0.34       | 2.04                    |
| T. Derişimi 11 mM                                                                                                                                                                                                              | 0.44 $\pm$ 0.007                      | 2.39       | 2.63                    | 29.54 $\pm$ 0.091                     | 0.53       | 2.70                    |
| A. Hızı 0.9 mL dk <sup>-1</sup>                                                                                                                                                                                                | 0.41 $\pm$ 0.01                       | 1.75       | 0                       | 29.12 $\pm$ 0.27                      | 1.29       | 2.58                    |
| A. Hızı 1.0 mL dk <sup>-1</sup>                                                                                                                                                                                                | 0.41 $\pm$ 0.001                      | 0.04       | 0                       | 30.47 $\pm$ 0.04                      | 0.16       | 2.35                    |
| <b>Karşılaştırma Sonucu:</b> Her bir sonuç, normal şartlarla bulunan sonuçla karşılaştırılmıştır.<br>$t_{\text{tablo}} = 2.78$ ( $p > 0.05$ ) Sonuçlar arasında fark yoktur (** $t_{\text{hesap}}$ = Hesapla bulunan t değeri) |                                       |            |                         |                                       |            |                         |

\*Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir. ACN=Asetonitril, T. Derişimi=Tampon derişimi, A. Hızı=Akış hızı, BSS=Bağıl standart sapma, istatistiksel karşılaştırma t testi ile yapılmıştır (Hesaplamalar için Bkz. Ek 2 ve Ek 4).

Tablo 4.27. Farmasötik preparat analizi için geliştirilen HPLC yöntemine ait tutarlılık bulguları (Eklenen ROS derişimi: 0.4 µg mL<sup>-1</sup>, MET derişimi: 30.0 µg mL<sup>-1</sup>, n=6).

| ROS                                                                                                                                |                                                                                                   | MET                                                                                                                                   |                                                                                                      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Analizci                                                                                                                        | 2. Analizci                                                                                       | 1. Analizci                                                                                                                           | 2. Analizci                                                                                          |
| Bulunan (µg mL <sup>-1</sup> )                                                                                                     | Bulunan (µg mL <sup>-1</sup> )                                                                    | Bulunan (µg mL <sup>-1</sup> )                                                                                                        | Bulunan (µg mL <sup>-1</sup> )                                                                       |
| 0.41                                                                                                                               | 0.40                                                                                              | 29.89                                                                                                                                 | 29.80                                                                                                |
| 0.40                                                                                                                               | 0.41                                                                                              | 29.78                                                                                                                                 | 29.83                                                                                                |
| 0.40                                                                                                                               | 0.41                                                                                              | 29.96                                                                                                                                 | 29.74                                                                                                |
| 0.42                                                                                                                               | 0.41                                                                                              | 29.84                                                                                                                                 | 29.95                                                                                                |
| 0.41                                                                                                                               | 0.42                                                                                              | 29.67                                                                                                                                 | 29.79                                                                                                |
| 0.41                                                                                                                               | 0.41                                                                                              | 29.92                                                                                                                                 | 29.88                                                                                                |
| $\bar{x} = 0.41 \pm 0.003$<br>SS = 0.008<br>BSS = % 1.84<br>% Bağıl Hata = 2.50<br>GA = 0.40-0.42                                  | $\bar{x} = 0.41 \pm 0.003$<br>SS = 0.006<br>BSS = % 1.54<br>% Bağıl Hata = 2.50<br>GA = 0.40-0.42 | $\bar{x} = 29.84 \pm 0.04$<br>SS = 0.106<br>BSS = % 0.35<br>% Bağıl Hata = -0.53<br>GA = 29.74-29.94                                  | $\bar{x} = 29.83 \pm 0.03$<br>SS = 0.074<br>BSS = % 0.25<br>% Bağıl Hata = -0.57<br>GA = 29.75-29.91 |
| <b>Karşılaştırma sonucu:</b> $t_{\text{hesap}} = 0$ , $t_{\text{tablo}} = 2.23$<br>Ortalamalar arasında fark yoktur ( $p > 0.05$ ) |                                                                                                   | <b>Karşılaştırma sonucu:</b> $t_{\text{hesap}} = 0.19$ , $t_{\text{tablo}} = 2.23$<br>Ortalamalar arasında fark yoktur ( $p > 0.05$ ) |                                                                                                      |

$\bar{x}$ =Ortalama ± standart hata, SS=Standart sapma, BSS=Bağıl standart sapma, GA=Güven aralığı, istatistiksel karşılaştırma t testi ile yapılmıştır (Hesaplamalar için Bkz. Ek 2 ve Ek 4).

#### 4.4.3. HPLC Yöntemi ile Farmasötik Preparatların Analiz Bulguları

2 mg ROS / 500 mg MET içeren Avandamet<sup>®</sup> tabletlerin analizleri geliştirilen HPLC yöntemi ile yapılarak sonuçlar geliştirilen CZE ve kaynaklarda bulunan karşılaştırma yöntemi ile karşılaştırılmıştır (Tablo 4.28).

Tablo 4.28. Geliştirilen HPLC yöntemi ile yapılan farmasötik preparat analiz sonuçları ve diğer yöntemlerle karşılaştırılması (n=6).

| Etiket Miktarı                 | Bulunan (mg)                                                                                     |                                                                                                  |                                                                                                 | İstatistiksel Karşılaştırma                                  |
|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
|                                | Geliştirilen HPLC Yöntemi                                                                        | Geliştirilen CZE Yöntemi                                                                         | Karşılaştırma Yöntemi (S3)                                                                      |                                                              |
| <b>ROS<br/>(2 mg/tablet)</b>   | $\bar{X}$ = 2.01 ± 0.01<br>SS= 0.03<br>BSS= % 1.39<br>% Bağıl Hata= 0.50<br>GA= 1.98-2.04        | $\bar{X}$ = 1.98 ± 0.02<br>SS= 0.04<br>BSS= % 2.02<br>% Bağıl Hata= -1.00<br>GA= 1.93-2.03       | $\bar{X}$ = 1.96 ± 0.02<br>SS= 0.05<br>BSS= % 2.55<br>% Bağıl Hata= -2.00<br>GA= 1.91-2.01      | Tek yönlü varyans analizi (ANOVA)<br>Fark yoktur (p > 0.05). |
| <b>MET<br/>(500 mg/tablet)</b> | $\bar{X}$ = 497.74 ± 3.75<br>SS= 9.19<br>BSS= % 1.85<br>% Bağıl Hata= -0.45<br>GA= 488.10-507.38 | $\bar{X}$ = 495.36 ± 2.24<br>SS= 5.50<br>BSS= % 1.11<br>% Bağıl Hata= -0.93<br>GA= 489.60-501.12 | $\bar{X}$ = 500.28 ± 3.42<br>SS= 8.40<br>BSS= % 1.68<br>% Bağıl Hata= 0.06<br>GA= 491.49-509.07 | Tek yönlü varyans analizi (ANOVA)<br>Fark yoktur (p > 0.05). |

$\bar{x}$ =Ortalama ± standart hata, SS=Standart sapma, BSS=Bağıl standart sapma, GA=Güven aralığı, (Hesaplamalar için Bkz. Ek 2 ve Ek 5).

### Standart Ekleme Yöntemi

Geliştirilen HPLC yöntemi ile farmasötik preparat analizi, standart ekleme yöntemi uygulanarak da yapılmıştır. Pik alan oranları eklenen standart ROS ve MET derişimine karşı grafiğe geçirildiğinde elde edilen doğruların regresyon denklemleri şu şekildedir: ROS için  $y = (0.9344 \pm 0.002)x + (0.2234 \pm 0.001)$ ,  $r=0.9957$  ve MET için  $y = (1.2794 \pm 0.106)x + (57.416 \pm 0.577)$ ,  $r=0.9993$  ( $n=3$ ).

Standart ekleme doğrularının eğimleri kalibrasyon doğrularının eğimlerine çok yakın bulunduğundan farmasötik preparat analizleri doğrudan kalibrasyon yöntemiyle yapılmıştır.

### 4.5. Biyolojik Materyalden HPLC Yöntemi ile Analiz Bulguları

ROS ve MET'in HPLC yöntemi ile biyolojik materyalden aynı anda analizi, Ace 5 fenil kolonda (5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4.6 mm i.ç.) hareketli faz olarak asetronitril ve 5 mM sodyum asetat (pH 5.5) kullanılarak Tablo 3.1'de verilen basamaklı gradient elüsyon sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz akış hızı 1 mL dk<sup>-1</sup>'dir. Bu koşullarda UV dedektörle 245 nm'de yapılan analizlerde ROS, MET ve VER'in alıkonma zamanları sırasıyla 3.46, 5.26 ve 8.86 dk'dır.

Belirlenen koşullarda 250 ng mL<sup>-1</sup> ROS, 1000 ng mL<sup>-1</sup> MET ve 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$  VER içeren plazma çözeltisi sisteme 10 kez enjekte edilmiş ve kromatografik parametreler değerlendirilmiştir (Tablo 4.29).

Tablo 4.29. Biyolojik materyal analizi için geliştirilen HPLC yönteminde ROS ve MET için elde edilen kromatografik parametreler (n=10).

|                      | ROS                                                                 | MET                                                                 |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| <b>t (dk)</b>        | $\bar{x} = 3.46 \pm 0.003$<br>SS = 0.009<br>BSS = % 0.27            | $\bar{x} = 5.26 \pm 0.004$<br>SS = 0.014<br>BSS = % 0.26            |
| <b>Pik Alanı</b>     | $\bar{x} = 7358.6 \pm 16.47$<br>SS = 52.08<br>BSS = % 0.72          | $\bar{x} = 24723.0 \pm 74.00$<br>SS = 234.02<br>BSS = % 0.95        |
| <b>k'</b>            | $\bar{x} = 0.65 \pm 0.002$<br>SS = 0.005<br>BSS = % 0.75            | $\bar{x} = 1.50 \pm 0.002$<br>SS = 0.005<br>BSS = % 0.34            |
| <b>PSO</b>           | $\bar{x} = 1.20 \pm 0.002$<br>SS = 0.007<br>BSS = % 0.59            | $\bar{x} = 1.30 \pm 0.003$<br>SS = 0.011<br>BSS = % 0.83            |
| <b>R<sub>s</sub></b> | $\bar{x} = 4.34 \pm 0.06$ (ROS ve MET)<br>SS = 0.02<br>BSS = % 0.52 | $\bar{x} = 7.27 \pm 0.02$ (MET ve VER)<br>SS = 0.07<br>BSS = % 0.96 |
| <b>N</b>             | $\bar{x} = 12632.71 \pm 36.93$<br>SS = 116.77<br>BSS = % 0.92       | $\bar{x} = 2287.08 \pm 4.28$<br>SS = 15.53<br>BSS = % 0.68          |

t: Alikonma zamanı, k': Kapasite faktörü (metanol enjeksiyonu ile bulunan ölü hacim (t<sub>0</sub>): 2.1 dk), PSO: Pik simetri oranı (h yüksekliğinin % 10 değerinde hesaplanmıştır), R<sub>s</sub>: Ayırıcılık, N:Teorik tabaka sayısı.

#### 4.5.1. Ekstraksiyon Yönteminin Optimizasyonu

ROS ve MET'in plazmadan aynı anda analizinde, suya ve plazmaya eklenmiş ROS ve MET çözeltileri ile boş plazmaya değişik ekstraksiyon yöntemleri uygulanarak en uygun yöntem seçilmiştir. Tablo 4.30'da denenen ekstraksiyon işlemleri, çözücüler, boş plazmadan gelen örtücü pik oluşumu ve elde edilen % geri kazanım sonuçları verilmiştir.

Tablo 4.30. ROS ve MET'in plazmadan analizi için denenen ekstraksiyon yöntemleri.

| Ekstraksiyon yöntemi                                                                                            | ROS piki | MET piki | % Geri Kazanım                 | Örtücü Pik Oluşumu |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|----------|--------------------------------|--------------------|
| <b><i>Protein Çöktürme</i></b>                                                                                  |          |          |                                |                    |
| Asetonitril                                                                                                     | +        | +        | ROS: % 105.13<br>MET: % 104.20 | -                  |
| Metanol                                                                                                         | Bozuk    | Bozuk    | -                              | -                  |
| Etanol                                                                                                          | Bozuk    | Bozuk    | -                              | -                  |
| Aseton                                                                                                          | -        | -        | -                              | ROS ve MET için    |
| Perklorik asit                                                                                                  | Bozuk    | Bozuk    | -                              | -                  |
| <b><i>Sıvı-sıvı Ekstraksiyon</i></b>                                                                            |          |          |                                |                    |
| Etil asetat                                                                                                     | +        | -        | ROS: % 128.19                  | ROS için           |
| Diklorometan                                                                                                    | +        | -        | ROS: % 59.15                   | -                  |
| N-hekzan                                                                                                        | -        | -        | -                              | -                  |
| <b><i>Katı-Sıvı Ekstraksiyon*</i></b>                                                                           |          |          |                                |                    |
| C <sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kartuşu                                                                   | -        | -        | -                              | -                  |
| C <sub>18</sub> katı faz ekstraksiyon kartuşu (Oasis HLB)                                                       | +        | +        | Hesaplanamadı                  | ROS ve MET için    |
| C <sub>8</sub> katı faz ekstraksiyon kartuşu                                                                    | +        | +        | Hesaplanamadı                  | ROS ve MET için    |
| *Katı-sıvı ekstraksiyon denemelerinde, şartlandırma metanol + su veya SDS ile, elüsyon metanol ile yapılmıştır. |          |          |                                |                    |

+ : Pik var, -: Pik yok.

#### 4.5.2. Biyolojik Materyalden HPLC ile Analiz Yönteminin Validasyonu

##### A. Kararlılık

Plazma örneklerinin kararlılığı, Bölüm 3.14.3’de anlatıldığı gibi, iki derişim seviyesinde, kısa dönem, uzun dönem ve donma-erime döngüsü olmak üzere 3 şekilde incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 4.31’de verilmiştir.

Tablo 4.31. Biyolojik materyal analizi için geliştirilen HPLC yönteminde plazmaya eklenmiş ROS ve MET’in kararlılık bulguları (n=3).

|                                       | Kısa dönem kararlılık<br>(24 saat, oda sıcaklığı) |            | Uzun dönem kararlılık<br>(20 gün, -20 °C) |            | Donma-Erime<br>Döngüsü (n=3) |            |
|---------------------------------------|---------------------------------------------------|------------|-------------------------------------------|------------|------------------------------|------------|
| Eklenen ROS<br>(ng mL <sup>-1</sup> ) | % Kalan *                                         | BSS<br>(%) | % Kalan                                   | BSS<br>(%) | % Kalan                      | BSS<br>(%) |
| 250.0                                 | 96.34 ± 1.43                                      | 2.57       | 109.68 ± 1.15                             | 1.76       | 107.35 ± 1.12                | 1.81       |
| 500.0                                 | 99.56 ± 1.67                                      | 2.91       | 108.55 ± 1.02                             | 1.56       | 99.20 ± 0.98                 | 1.71       |
| Eklenen MET<br>(ng mL <sup>-1</sup> ) | % Kalan                                           | BSS<br>(%) | % Kalan                                   | BSS<br>(%) | % Kalan                      | BSS<br>(%) |
| 1000.0                                | 100.02 ± 1.60                                     | 2.77       | 104.91 ± 1.37                             | 2.26       | 96.10 ± 1.28                 | 2.31       |
| 2000.0                                | 103.43 ± 0.85                                     | 1.42       | 108.52 ± 0.65                             | 1.04       | 100.86 ± 0.88                | 1.51       |

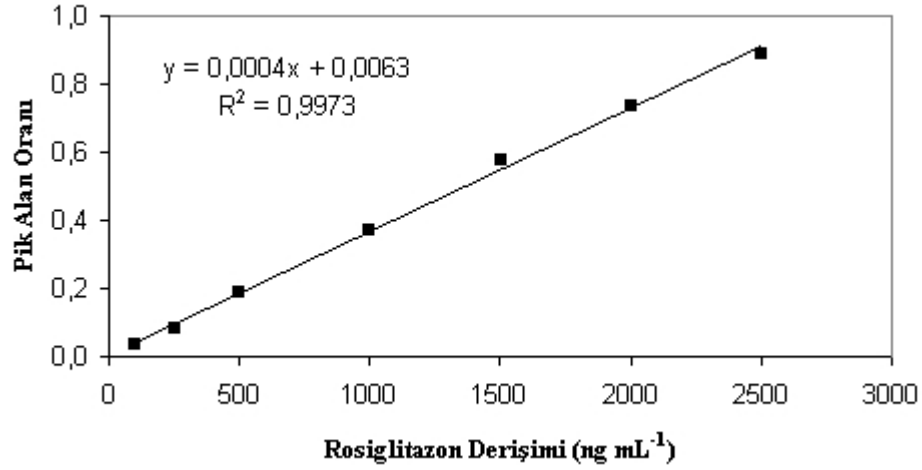
\*% Kalan=(Belirtilen süre sonunda çözeltinin dedektör cevabı / Taze çözeltinin dedektör cevabı)x100

##### B. Doğrusallık

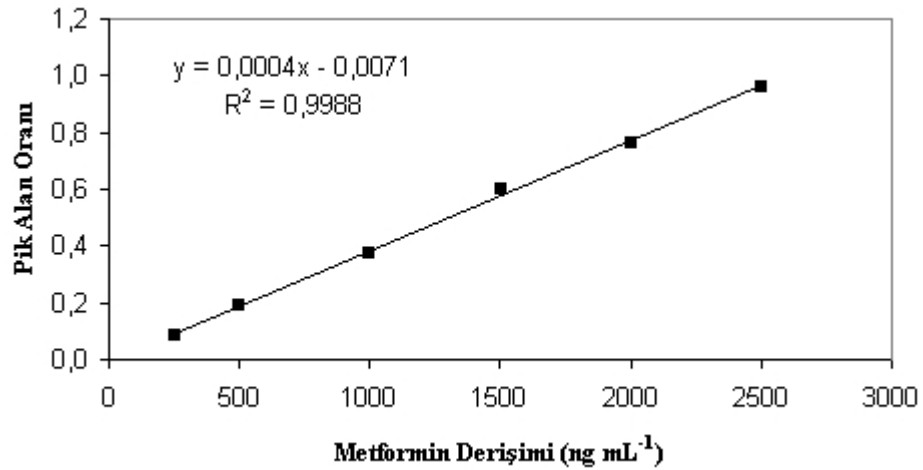
Optimize edilen analiz koşullarında, ROS için 100.0-2500.0 ng mL<sup>-1</sup> ve MET için 250.0-2500.0 ng mL<sup>-1</sup> derişim aralıklarında ROS ve MET’in iç standarda göre pik alan oranları grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğruları oluşturulmuş ve her durumda 7.7 µg mL<sup>-1</sup> VER iç standart olarak eklenmiştir (Şekil 4.14 ve 4.15).

Farklı çözeltiler hazırlanarak elde edilen 10 kalibrasyon eğrisinin ortalama denklemleri ve istatistiksel değerleri Tablo 4.32’de verilmiştir.

Kalibrasyon eğrilerinin doğrusallıktan ayrılış ve korrelasyon katsayılarının önem kontrolüne ait istatistiksel değerlendirme sonuçları Tablo 4.33 ve Tablo 4.34’de gösterilmiştir.



Şekil 4.14. Biyolojik materyal analizi için geliştirilen HPLC yönteminde ROS için elde edilen kalibrasyon eğrisi.



Şekil 4.15. Biyolojik materyal analizi için geliştirilen HPLC yönteminde MET için elde edilen kalibrasyon eğrisi.

Tablo 4.32. Biyolojik materyal analizi için geliştirilen HPLC yöntemine ait kalibrasyon eğrilerinin özellikleri (n=10).

|                                            | <b>ROS</b>                   | <b>MET</b>                   |
|--------------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Regresyon denklemi*                        | $y = 0.0004x + 0.0063$       | $y = 0.0004x - 0.0071$       |
| Eğimin standart hatası                     | 0.00003                      | 0.00001                      |
| Kesişimin standart hatası                  | 0.0004                       | 0.0002                       |
| Korrelasyon katsayısı (r)                  | 0.9986                       | 0.9994                       |
| Tanımlayıcılık katsayısı (R <sup>2</sup> ) | 0.9973                       | 0.9988                       |
| Doğrusallık aralığı                        | 100-2500 ng mL <sup>-1</sup> | 250-2500 ng mL <sup>-1</sup> |
| LOD                                        | 50 ng mL <sup>-1</sup>       | 100 ng mL <sup>-1</sup>      |
| LOQ                                        | 100 ng mL <sup>-1</sup>      | 250 ng mL <sup>-1</sup>      |

\* $y = bx + a$ ;  $x$  : ng mL<sup>-1</sup> biriminde derişim,  $y$  : Pik alan oranları,  $a$  : Kesişim,  $b$  : Eğim.

Tablo 4.33. Biyolojik materyal analizi için geliştirilen HPLC yöntemine ait kalibrasyon eğrilerinin doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü\*.

|                      | <b>ROS</b>                           | <b>MET</b>                           |
|----------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| <b>RKT</b>           | 0.656                                | 0.574                                |
| <b>YOAKT</b>         | 0.653                                | 0.572                                |
| <b>RAKT</b>          | 0.003                                | 0.002                                |
| <b>RKO</b>           | 0.656                                | 0.574                                |
| <b>RAKO</b>          | 0.0006                               | 0.0005                               |
| <b>F<sub>H</sub></b> | 1093.3                               | 1148                                 |
| <b>F<sub>T</sub></b> | 6.61                                 | 7.71                                 |
| <b>Karar</b>         | İlişki doğrusaldır<br>( $p < 0.05$ ) | İlişki doğrusaldır<br>( $p < 0.05$ ) |

(\*İstatistiksel terimler ve hesaplamalar için Bkz. Ek 3).

Tablo 4.34. Biyolojik materyal analizi için geliştirilen HPLC yöntemine ait kalibrasyon eğrilerinin korrelasyon katsayılarının önem kontrolü\*.

|                      | <b>ROS</b>                                           | <b>MET</b>                                           |
|----------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| <b>n</b>             | 7                                                    | 6                                                    |
| <b>r</b>             | 0.9986                                               | 0.9994                                               |
| <b>S<sub>r</sub></b> | 0.023                                                | 0.017                                                |
| <b>t<sub>H</sub></b> | 43.42                                                | 58.79                                                |
| <b>t<sub>T</sub></b> | 2.57                                                 | 2.78                                                 |
| <b>Karar</b>         | “r” tesadüfen bulunmuş bir değer değildir (p < 0.05) | “r” tesadüfen bulunmuş bir değer değildir (p < 0.05) |

(\*İstatistiksel terimler ve hesaplamalar için Bkz. Ek 3).

### C. Duyarlılık

ROS ve MET’in HPLC yöntemi ile biyolojik materyalden analizinde LOD ve LOQ değerleri Tablo 4.32’de verilmiştir.

### D. Doğruluk ve Kesinlik

Biyolojik materyal analizinde kullanılan HPLC sisteminin tekrarlanabilirliğinin test edilmesi için doğrusal aralık içerisinde bir derişim değerinde hazırlanan (250.0 ng mL<sup>-1</sup> ROS ve 1000.0 ng mL<sup>-1</sup> MET) aynı plazma çözeltilisinden 10 enjeksiyon yapılmış ve cihaz parametreleri değerlendirilmiştir (Bkz. Tablo 4.29).

ROS ve MET’in biyolojik materyalden HPLC ile tayini için yapılan doğruluk ve kesinlik çalışmalarına ait gün içi ve günler arası değerlendirme sonuçları Tablo 4.35 ve 4.36’da verilmiştir.

ROS ve MET’in biyolojik materyalden HPLC ile tayininde yöntem tekrarlanabilirliğine ait sonuçlar Tablo 4.37’de verilmiştir.

Tablo 4.35. Biyolojik materyal analizi için geliştirilen HPLC yöntemiyle ROS için elde edilen gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk bulguları.

| ROS miktarı<br>(ng mL <sup>-1</sup> ) | Gün İçi<br>Bulunan Miktar<br>(ng mL <sup>-1</sup> )                                                                                                                   | Günler Arası<br>Bulunan Miktar<br>(ng mL <sup>-1</sup> )                                                                                                               |
|---------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 100.0                                 | 98.77<br>95.40<br>91.64<br>97.29<br>96.76<br>89.62<br><br>$\bar{x} = 94.91 \pm 1.45$<br>SS = 3.55<br>BSS = % 3.74<br>% Bağıl Hata = -5.09<br>GA = 91.18-98.64         | 93.47<br>107.39<br>98.77<br>95.60<br>106.48<br>101.95<br><br>$\bar{x} = 100.61 \pm 2.32$<br>SS = 5.69<br>BSS = % 5.65<br>% Bağıl Hata = 0.61<br>GA = 94.65-106.57      |
| 250.0                                 | 258.92<br>259.55<br>256.18<br>244.68<br>264.89<br>263.24<br><br>$\bar{x} = 257.91 \pm 2.94$<br>SS = 7.19<br>BSS = % 2.79<br>% Bağıl Hata = 3.16<br>GA = 250.35-265.47 | 240.84<br>259.16<br>256.18<br>252.78<br>243.36<br>242.20<br><br>$\bar{x} = 249.09 \pm 3.23$<br>SS = 7.92<br>BSS = % 3.18<br>% Bağıl Hata = -0.36<br>GA = 240.79-257.39 |
| 500.0                                 | 535.12<br>522.73<br>529.25<br>515.72<br>533.20<br>530.36<br><br>$\bar{x} = 527.73 \pm 2.96$<br>SS = 7.25<br>BSS = % 1.37<br>% Bağıl Hata = 5.55<br>GA = 520.12-535.34 | 496.64<br>517.03<br>515.72<br>509.61<br>495.44<br>482.92<br><br>$\bar{x} = 502.90 \pm 5.49$<br>SS = 13.44<br>BSS = % 2.67<br>% Bağıl Hata = 0.58<br>GA = 488.79-517.01 |

$\bar{x} \pm SH$ =Ortalama  $\pm$  standart hata, SS=Standart sapma, BSS=Bağıl standart sapma, GA=Güven aralığı (Hesaplamalar için Bkz. Ek 2)

Tablo 4.36. Biyolojik materyal analizi için geliştirilen HPLC yöntemiyle MET için elde edilen gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk bulguları.

| <b>MET miktarı<br/>(ng mL<sup>-1</sup>)</b> | <b>Gün İçi<br/>Bulunan Miktar<br/>(ng mL<sup>-1</sup>)</b>                                                                                                                       | <b>Günler Arası<br/>Bulunan Miktar<br/>(ng mL<sup>-1</sup>)</b>                                                                                                                   |
|---------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 500.0                                       | 504.20<br>495.80<br>491.21<br>505.23<br>503.08<br>490.27<br><br>$\bar{x} = 498.30 \pm 2.75$<br>SS = 6.73<br>BSS = % 1.35<br>% Bağıl Hata = -0.34<br>GA = 491.23-505.37           | 504.82<br>496.22<br>503.08<br>514.58<br>490.80<br>487.65<br><br>$\bar{x} = 499.52 \pm 4.06$<br>SS = 9.95<br>BSS = % 1.99<br>% Bağıl Hata = -0.09<br>GA = 489.09-509.95            |
| 1000.0                                      | 992.55<br>980.84<br>1001.67<br>971.00<br>995.10<br>994.30<br><br>$\bar{x} = 989.24 \pm 4.58$<br>SS = 11.21<br>BSS = % 1.13<br>% Bağıl Hata = -1.08<br>GA = 977.47-1001.01        | 994.10<br>987.34<br>1001.67<br>999.12<br>990.36<br>994.00<br><br>$\bar{x} = 994.43 \pm 2.17$<br>SS = 5.32<br>BSS = % 0.54<br>% Bağıl Hata = -0.56<br>GA = 988.85-1000.01          |
| 2000.0                                      | 1975.45<br>1971.83<br>1923.01<br>1970.52<br>1961.26<br>1957.08<br><br>$\bar{x} = 1959.86 \pm 7.89$<br>SS = 19.33<br>BSS = % 0.99<br>% Bağıl Hata = -2.01<br>GA = 1939.58-1980.14 | 1938.85<br>1993.79<br>1975.45<br>2049.14<br>1902.03<br>1997.25<br><br>$\bar{x} = 1976.09 \pm 20.79$<br>SS = 50.93<br>BSS = % 2.58<br>% Bağıl Hata = -1.20<br>GA = 1922.66-2029.52 |

$\bar{x} \pm SH$ =Ortalama  $\pm$  standart hata, SS=Standart sapma, BSS=Bağıl standart sapma, GA=Güven aralığı (Hesaplamalar için Bkz. Ek 2)

Tablo 4.37. Biyolojik materyal analizi için geliştirilen HPLC yönteminin tekrarlanabilirliğine ait analiz bulguları (Eklenen ROS derişimi: 250.0 ng mL<sup>-1</sup>, MET derişimi: 1000.0 ng mL<sup>-1</sup>).

| ROS                                                                                                   | MET                                                                                                    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Bulunan (ng mL <sup>-1</sup> )                                                                        | Bulunan (ng mL <sup>-1</sup> )                                                                         |
| 250.33                                                                                                | 970.92                                                                                                 |
| 248.73                                                                                                | 975.01                                                                                                 |
| 255.04                                                                                                | 982.43                                                                                                 |
| 254.99                                                                                                | 978.65                                                                                                 |
| 252.46                                                                                                | 985.73                                                                                                 |
| 253.17                                                                                                | 989.07                                                                                                 |
| 253.52                                                                                                | 984.75                                                                                                 |
| 255.86                                                                                                | 979.54                                                                                                 |
| 254.97                                                                                                | 980.96                                                                                                 |
| 251.05                                                                                                | 991.24                                                                                                 |
| $\bar{x} = 253.01 \pm 0.74$<br>SS = 2.36<br>BSS = % 0.93<br>% Bağıl Hata = 1.20<br>GA = 251.34-254.68 | $\bar{x} = 981.83 \pm 1.96$<br>SS = 6.21<br>BSS = % 0.63<br>% Bağıl Hata = -1.82<br>GA = 977.40-986.26 |

$\bar{x}$ =Ortalama  $\pm$  standart hata, SS=Standart sapma, BSS=Bağıl standart sapma, GA=Güven aralığı (Hesaplamalar için Bkz. Ek 3).

#### D. Geri Kazanım

ROS ve MET'in plazmadan analizinde geri kazanım çalışmaları, Bölüm 3.14.3'de anlatıldığı şekilde, üç farklı derişimde iki şekilde yapılmıştır. Analiz sonuçları Tablo 4.38'de verilmiştir.

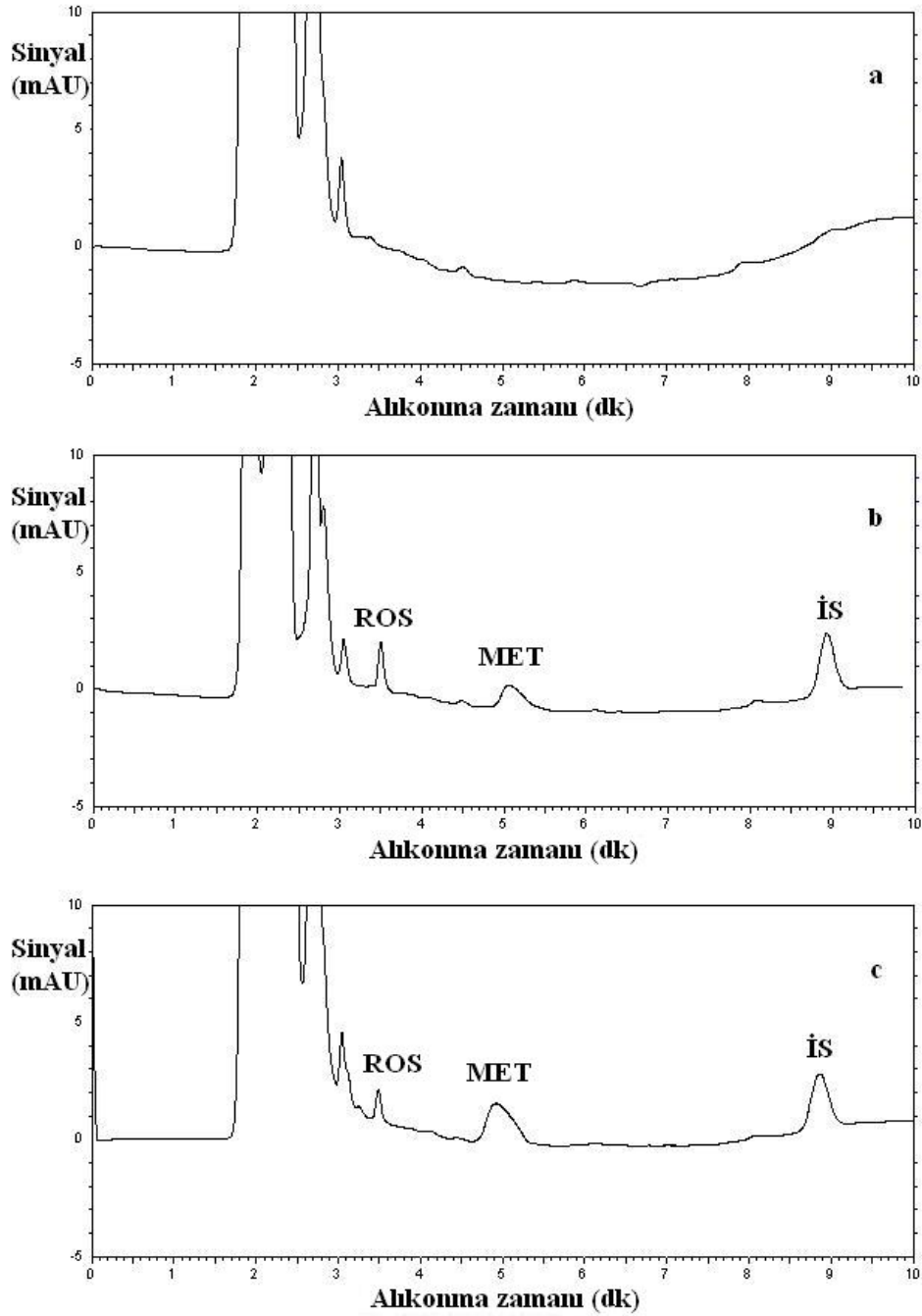
Tablo 4.38. Biyolojik materyal analizi için geliştirilen HPLC yönteminde ROS ve MET için geri kazanım bulguları (n=3)

|            | <b>Eklenen<br/>(ng mL<sup>-1</sup>)</b> | <b>Bağıl<br/>Geri Kazanım (%)</b> | <b>BSS<br/>(%)</b> | <b>Mutlak<br/>Geri Kazanım (%)</b> | <b>BSS<br/>(%)</b> |
|------------|-----------------------------------------|-----------------------------------|--------------------|------------------------------------|--------------------|
| <b>ROS</b> | 100.0                                   | 100.95 ± 0.95                     | 1.64               | 98.25 ± 1.75                       | 3.09               |
|            | 250.0                                   | 100.02 ± 1.07                     | 1.86               | 98.64 ± 1.26                       | 2.21               |
|            | 500.0                                   | 105.00 ± 0.34                     | 0.56               | 101.33 ± 1.98                      | 3.39               |
| <b>MET</b> | 500.0                                   | 103.88 ± 1.32                     | 2.20               | 94.19 ± 0.41                       | 0.76               |
|            | 1000.0                                  | 104.13 ± 2.24                     | 3.73               | 91.48 ± 0.66                       | 1.26               |
|            | 2000.0                                  | 105.64 ± 2.28                     | 3.74               | 97.62 ± 0.61                       | 1.08               |

\*Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. BSS=Bağıl standart sapma, (Hesaplamalar için Bkz. Ek 2)

### E. Özgünlük (Seçicilik)

Biyolojik materyal analizi için geliştirilen HPLC yönteminin seçiciliğinin kanıtlanması amacıyla boş plazma, plazmaya eklenmiş standartlar ve hastalardan alınan plazma örnekleri çözeltilerinin kromatogramları karşılaştırılmıştır. Şekil 4.16'da görüldüğü gibi ROS, MET ve VER pikleri zeminden ve birbirlerinden tam olarak ayrılabilmişlerdir, biyolojik matriksten gelen piklerle herhangi bir etkileşim olmamıştır.



Şekil 4.16. Biyolojik materyal analizi için geliştirilen HPLC yöntemiyle elde edilen kromatogramlar a) Boş plazma, b) Plazma üzerine eklenmiş ROS (500.0 ng mL<sup>-1</sup>), MET (500.0 ng mL<sup>-1</sup>) ve İS (VER) (7.7 µg mL<sup>-1</sup>), c) Hasta plazması (Bulunan ROS derişimi: 300.0 ng mL<sup>-1</sup>, Bulunan MET derişimi: 1400.0 ng mL<sup>-1</sup>), Hareketli faz: Asetonitril:5 mM pH 5.5 asetat tamponu [gradient elüsyon (Tablo 3.1)], 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı.

### F. Sağlamlık ve Tutarlılık

Biyolojik materyal analizi için geliştirilen HPLC yönteminin sağlamlık çalışmaları için başlangıç hareketli faz bileşimi, tampon derişimi, tampon pH'ı, ve akış hızı gibi deneysel parametrelerde küçük değışiklikler yapılarak analiz sonuçlarına etkisi incelenmiştir. Her bir değışikle yapılan analiz sonuçları optimum koşullarda bulunan analiz sonuçları ile karşılaştırılmıştır (Tablo 4.39). Tutarlılık çalışmaları ise, doğrusallık aralığına giren bir derişim seviyesinde farklı iki analizci tarafından yapılan analiz sonuçları karşılaştırılmıştır (Tablo 4.40).

Tablo 4.39. Biyolojik materyal analizi için geliştirilen HPLC yönteminin sağlamlık bulguları (Eklenen ROS derişimi:250.0 ng mL<sup>-1</sup>, MET derişimi:1000.0 ng mL<sup>-1</sup>, n=3).

|                                                                                                                                                                                                                           | ROS                                |            |                       | MET                                 |            |                       |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|------------|-----------------------|-------------------------------------|------------|-----------------------|
|                                                                                                                                                                                                                           | Bulunan<br>(ng mL <sup>-1</sup> )* | BSS<br>(%) | t <sub>hesap</sub> ** | Bulunan<br>(ng mL <sup>-1</sup> ) * | BSS<br>(%) | t <sub>hesap</sub> ** |
| <b>Normal Şartlar</b>                                                                                                                                                                                                     | 248.84 ± 3.53                      | 2.46       | -                     | 1007.92 ± 6.64                      | 1.14       | -                     |
| <b>B. ACN Oranı % 77</b>                                                                                                                                                                                                  | 251.60 ± 5.50                      | 3.79       | 0.42                  | 991.09 ± 5.30                       | 0.93       | 1.98                  |
| <b>B. ACN Oranı % 73</b>                                                                                                                                                                                                  | 253.40 ± 0.85                      | 0.58       | 1.26                  | 985.99 ± 4.26                       | 1.72       | 2.51                  |
| <b>Tampon pH 5.3</b>                                                                                                                                                                                                      | 246.81 ± 2.79                      | 1.96       | 0.45                  | 987.69 ± 4.63                       | 0.81       | 2.50                  |
| <b>Tampon pH 5.7</b>                                                                                                                                                                                                      | 254.46 ± 5.49                      | 3.73       | 0.86                  | 993.86 ± 8.02                       | 1.40       | 1.35                  |
| <b>T. Derişimi 4 mM</b>                                                                                                                                                                                                   | 246.54 ± 4.11                      | 2.89       | 0.42                  | 1008.30 ± 3.57                      | 0.61       | 0.05                  |
| <b>T. Derişimi 6 mM</b>                                                                                                                                                                                                   | 252.12 ± 2.91                      | 2.00       | 0.72                  | 987.04 ± 6.71                       | 1.78       | 2.21                  |
| <b>A. Hızı 0.9 mL dk<sup>-1</sup></b>                                                                                                                                                                                     | 242.13 ± 1.80                      | 1.29       | 1.70                  | 1014.30 ± 7.38                      | 1.26       | 0.64                  |
| <b>A. Hızı 1.1 mL dk<sup>-1</sup></b>                                                                                                                                                                                     | 248.66 ± 4.89                      | 3.41       | 0.03                  | 992.11 ± 6.47                       | 0.92       | 1.86                  |
| <b>Karşılaştırma Sonucu:</b> Her bir sonuç, normal şartlarla bulunan sonuçla karşılaştırılmıştır.<br>t <sub>tablo</sub> = 2.78 (p > 0.05) Sonuçlar arasında fark yoktur (**t <sub>hesap</sub> = Hesapla bulunan t değeri) |                                    |            |                       |                                     |            |                       |

\*Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. B. ACN Oranı=Başlangıç asetonitril oranı, T. Derişimi=Tampon derişimi, BSS=Bağıl standart sapma, istatistiksel karşılaştırma t testi ile yapılmıştır (Hesaplamalar için Bkz. Ek 1 ve Ek 3).

Tablo 4.40. Biyolojik materyal analizi için geliştirilen HPLC yöntemine ait tutarlılık bulguları (Eklenen ROS derişimi: 250.0 ng mL<sup>-1</sup>, MET derişimi: 1000.0 ng mL<sup>-1</sup>, n=6).

| ROS                                                                                                              |                                                                                                        | MET                                                                                                              |                                                                                                        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Analizci                                                                                                      | 2. Analizci                                                                                            | 1. Analizci                                                                                                      | 2. Analizci                                                                                            |
| Bulunan (ng mL <sup>-1</sup> )                                                                                   | Bulunan (ng mL <sup>-1</sup> )                                                                         | Bulunan (ng mL <sup>-1</sup> )                                                                                   | Bulunan (ng mL <sup>-1</sup> )                                                                         |
| 246.98                                                                                                           | 248.97                                                                                                 | 986.08                                                                                                           | 980.97                                                                                                 |
| 247.76                                                                                                           | 246.95                                                                                                 | 990.74                                                                                                           | 993.57                                                                                                 |
| 248.13                                                                                                           | 247.74                                                                                                 | 996.21                                                                                                           | 994.24                                                                                                 |
| 250.62                                                                                                           | 251.81                                                                                                 | 984.38                                                                                                           | 995.68                                                                                                 |
| 252.89                                                                                                           | 253.40                                                                                                 | 992.07                                                                                                           | 979.96                                                                                                 |
| 247.09                                                                                                           | 249.02                                                                                                 | 992.86                                                                                                           | 988.50                                                                                                 |
| $\bar{x} = 248.91 \pm 0.96$<br>SS = 2.36<br>% BSS = 0.95<br>% Bağıl Hata = -0.44<br>GA = 246.44-251.38           | $\bar{x} = 249.65 \pm 1.01$<br>SS = 2.47<br>% BSS = 0.99<br>% Bağıl Hata = -0.14<br>GA = 247.05-252.25 | $\bar{x} = 990.39 \pm 1.80$<br>SS = 4.42<br>% BSS = 0.45<br>% Bağıl Hata = -0.96<br>GA = 985.76-995.02           | $\bar{x} = 988.82 \pm 2.82$<br>SS = 6.92<br>% BSS = 0.70<br>% Bağıl Hata = -1.12<br>GA = 981.57-996.07 |
| <b>Karşılaştırma sonucu:</b> $t_{hesap}=0.90$ , $t_{tablo}= 2.23$<br>Ortalamalar arasında fark yoktur (p > 0.05) |                                                                                                        | <b>Karşılaştırma sonucu:</b> $t_{hesap}=0.46$ , $t_{tablo}= 2.23$<br>Ortalamalar arasında fark yoktur (p > 0.05) |                                                                                                        |

#### 4.5.3. Biyolojik Materyalden HPLC ile Analiz Yönteminin Gerçek Örneklerle Uygulanması

Biyolojik materyalden analiz için geliştirilen HPLC yönteminin hastalardan alınan kanlara uygulanabilmesi için, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi, Cerrahi ve İlaç Araştırmaları Etik Kurulundan LUT 05/73-10 sayılı kararla etik kurulu onayı alınmıştır (Bkz. Ek 1). Kan örnekleri, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Endokrinoloji Ünitesinde tedavi görmekte olan, 4 mg ROS etken maddesi içeren Avandia® ve 850 mg MET etken maddesi içeren Glucophage® ilaçlarını en az iki aydır kullanan, 37-63 yaşları arasında 11'i kadın 14 adet diyabet hastasından, ilaçları almalarından 1 saat sonra alınmıştır.

Hastalarda gözlenen ROS ve MET düzeyleri geliştirilen HPLC yöntemi için oluşturulan doğrusal aralık ve duyarlılık sınırları içerisinde. Saptanan ROS derişimleri 121.99 - 302.34 ng mL<sup>-1</sup>, MET derişimleri 1048.27 - 2367.55 ng mL<sup>-1</sup> aralığında değişmektedir (Tablo 4.41).

Tablo 4.41. ROS ve MET etken maddeli ilaçları kullanan diyabet hastalarından alınan kan örneklerinin geliştirilen HPLC yöntemiyle analizinde bulunan sonuçlar\* (n=3).

| Hasta No | ROS Derişimi**<br>(ng mL <sup>-1</sup> ) | MET Derişimi**<br>(ng mL <sup>-1</sup> ) |
|----------|------------------------------------------|------------------------------------------|
| 1        | 293.53 ± 2.58                            | 1410.95 ± 14.83                          |
| 2        | 121.99 ± 2.14                            | 2000.91 ± 22.98                          |
| 3        | 281.24 ± 0.54                            | 2082.46 ± 36.73                          |
| 4        | 137.68 ± 6.87                            | 1446.60 ± 48.79                          |
| 5        | 251.84 ± 3.63                            | 1407.49 ± 0.31                           |
| 6        | 228.30 ± 5.74                            | 1195.75 ± 22.71                          |
| 7        | 144.09 ± 11.36                           | 1878.37 ± 92.69                          |
| 8        | 302.34 ± 9.70                            | 2367.55 ± 79.90                          |
| 9        | 214.88 ± 3.48                            | 1048.27 ± 17.03                          |
| 10       | 227.22 ± 2.85                            | 2296.78 ± 29.38                          |
| 11       | 295.78 ± 11.10                           | 1605.38 ± 106.67                         |
| 12       | 253.84 ± 11.37                           | 1719.59 ± 50.36                          |
| 13       | 191.10 ± 7.34                            | 1886.13 ± 83.75                          |
| 14       | 227.15 ± 2.79                            | 2078.00 ± 77.28                          |

\*Kan örnekleri ilaçların alınmasından 1 saat sonra alınmıştır. \*\*Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

## 5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, son dönemde diyabet tedavisinde kombine olarak kullanılan ROS ve MET'in aynı anda analizi için CE ve HPLC yöntemleri geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemlerin validasyon parametreleri değerlendirildikten sonra farmasötik preparatlara ve biyolojik materyale uygulanmıştır.

Çalışmalara başlanmadan önce, ROS ve MET etken maddelerinin saflık kontrolü erime noktalarının tayini ile yapılmıştır. ROS ve MET'in erime noktaları sırasıyla 123 °C ve 225 °C olarak bulunmuştur. Bu değerler kaynakta (55) bulunan değerlerle uyumlu olduğundan maddelerin saf olduğuna karar verilmiştir.

### 5.1. CE Yöntemi

#### 5.1.1. CE Yönteminin Optimizasyon Çalışmaları

CE ile yöntem geliştirme, kapiler elektroforezin türü, kapilerin cinsi, çalışma tamponunun bileşimi, derişimi ve pH'ı, uygulanan voltaj, enjeksiyon türü ve süresi, kapiler sıcaklığı gibi parametrelerin seçimini ve optimize edilmesini içerir.

ROS ve MET'in farmasötik preparatlardan aynı anda analizi için CE yöntemi geliştirme çalışmalarında, öncelikle CZE yöntemi denenmiştir. CZE yöntemi, bir tampon içinde çözünebilen iyonize bileşiklerin ayırımında kullanılan bir CE çeşididir. Ayırım maddelerin yük/büyükölük oranlarındaki farklılık temeline dayanır. Bu yöntemle ayırımlar genellikle eritilmiş silika kapiler kullanılarak yapılır. ROS ve MET'in analiz çalışmalarında da eritilmiş silika kapiler kullanılmıştır (80.5 x 75 µm iç çap, 72 cm etkin uzunluk).

CZE yönteminde çalışma tamponunun seçimi iyi bir ayırımın sağlanması açısından çok önemlidir. Analiz boyunca pH'ın sabit tutulması, EOF'nin ve analitlerin iyonlaşma derecelerinin değişmesine engel olur. Seçilen tamponun kapasitesinin ( $pK_a \pm 1$ ) pH'ı sabit tutabilecek aralıkta olmasına dikkat edilmelidir. Ayrıca seçilen tamponla analitlerin hareketliliğinin birbirine yakın olması piklerin simetrik olmasını sağlar (67).

Çalışma tamponunun pH'ı, EOF üzerinde etkilidir, çünkü zeta potansiyelini değiştirir. Yüksek pH'larda kapiler duvarında SiOH'ın SiO<sup>-</sup>'ya ayrışma yüzdesi arttıkça yüzey yükü ile doğru orantılı olan zeta potansiyeli artar (Formül 2.2) ve buna

bağlı olarak EOF artar (Formül 2.3). Ayrıca, çalışma tamponunun pH'ı maddelerin iyonlaşma derecelerini, dolayısıyla elektroforetik hareketliliklerini etkiler.

ROS'un çözünürlüğü pH 2.5'tan itibaren azalmaktadır (55). Bu nedenle çalışma tamponu denemeleri asidik pH'larda yapılmıştır. ROS'un 6.1 ve 6.8 olmak üzere iki pKa değeri bulunmaktadır, MET'in pKa değeri ise 12.4'tür (55). Dolayısıyla her iki madde de asidik ortamda katyon formundadır ve CZE yöntemiyle analizleri gerçekleştirilebilir.

Denenen çalışma tamponları fosfat (pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0), asetat (pH 3.0, 4.0, 5.0), sitrat (pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0) ve format (pH 3.0, 4.0, 5.0)'tır. Analiz süresi, pik şekilleri ve ayırıcılık parametreleri değerlendirilerek en iyi sonuçların asetat tamponu ile elde edildiği görülmüştür.

Çalışma tamponu olarak seçilen asetat tamponunda pH'ın etkisi 3.0-5.0 arasında araştırılmıştır (Bkz. Şekil 4.2). Çalışma tamponu pH'ı arttıkça EOF arttığından göç zamanları azalmaktadır. Ancak aynı zamanda ayırıcılık da azalmaktadır. Bu nedenle pH 4.0 hem analiz süresinin kısa olması, hem de ayırıcılığın iyi olması nedeniyle seçilmiştir.

Çalışma tamponunun derişimi, tamponun iyonik gücü ile doğrudan ilişkili olup analiz süresi ve pik simetrisinde etkilidir. Tamponun iyonik gücü veya derişimi artırılınca zeta potansiyeli düşeceğinden EOF azalır. Asetat tamponu derişiminin etkisi 10-100 mM arasında incelenmiş (Bkz. Şekil 4.3), beklenildiği gibi düşük tampon derişimlerinde kısa analiz süresi elde edilmiştir. Ancak derişim çok küçük olursa asimetric ve geniş pikler elde edilir. Bunun nedeni, tampon derişimi örnek derişimine göre en az 100 kat fazla olmadığında, iletkenlik farkı nedeniyle elektriksel alanda bozukluk meydana gelmesidir. Analiz süresi, ayırıcılık ve pik simetri değerleri dikkate alınarak en uygun derişim 25 mM olarak belirlenmiştir.

Çalışma tamponuna organik çözücü eklenmesi çözelti viskozitesi, zeta potansiyeli ve dielektrik sabitini değiştireceğinden EOF'yi etkiler. Bu değişiklik pik simetrisi ve ayırıcılık üzerinde de etkili olabilir (90). Organik çözücü olarak metanol ve asetonitril çalışma tamponuna % 5, 10 ve 15 oranlarında eklenerek denenmiş, fakat her ikisi de analiz sürelerini uzatmıştır. Ayırıcılık ve pik simetrilerine de belirgin bir etkileri olmamıştır. Bu nedenle çalışma tamponuna organik çözücü eklenmesine gerek görülmemiştir.

Gerek kromatografik gerekse kapiler elektroforetik çalışmalarda doğruluk ve kesinliğin sağlanabilmesi için iç standart kullanımı gerekmektedir (91,92). Voltaj, enjeksiyon hacmi ve EOF'de meydana gelebilecek değişikliklerden ve çözücü buharlaşmasından kaynaklanan hatalar bu şekilde azaltılabilir. Bu nedenle ROS ve MET'in farmasötik preparatlardan aynı anda analizi için CZE yöntemi geliştirme çalışmalarında iç standart seçimi için denemeler yapılmıştır. Meloksikam, diflunisal, alendronat ve verapamil denenmiş, sadece verapamil piki ROS ve MET ile birlikte elde edilebilmiştir. Verapamil, kalsiyum kanal blokörü sınıfı antihipertansif bir ilaçtır. pKa'sı 8.6 olup (93) optimize edilen çalışma tamponu koşullarında ROS ve MET gibi katyon formunda bulunmaktadır.

CE yönteminde, uygulanan voltajın artışı EOF'yi arttırarak analiz süresini kısaltır. Ayrıca voltajın artması ile yüksek etkinlik sağlanır. Ancak yüksek voltaj ve bunun sonucu olan yüksek akım kapilerin ısınmasına neden olur. Kapilerdeki ısınma da pik genişlemesine, tekrarlanamayan göç zamanlarına ve örnek bozunmasına yol açabilir (64). Çalışmalarda uygulanabilecek maksimum voltaj, voltaja karşı akım grafiğinden belirlenebilir. Bu amaçla, 5-30 kV arasında değişen voltaja karşı akım grafiği çizilmiş (Bkz. Şekil 4.4) ve ani bir artış, doğrusallıktan sapma gözlenmemiştir. Bu da geniş bir potansiyel aralığında çalışılabileceğini göstermektedir. Analiz süresi 30 ile 25 kV'da kısa, 20 kV'da ise uzundur. Kısa analiz süresi elde etmek amacıyla 25 kV seçilmiştir. Çalışmalar süresince uygulanan bu voltajla gözlenen akım yaklaşık 32  $\mu A$ 'dır.

CE yönteminde, hidrodinamik enjeksiyon daha kesin ve tutarlı olması nedeniyle elektrokinetik enjeksiyona tercih edilir. Elektrokinetik enjeksiyonda kapilere verilen örnek miktarı EOF'ye ve analitin elektroforetik hareketliliğine göre değişir. Dolayısıyla, kesinlik birçok parametreden etkilenmektedir (91). Bu nedenle seçilen hidrodinamik örnek enjeksiyonunda, 50 mbar basınç uygulanarak enjeksiyon süresinin analiz üzerine etkisi incelenmiştir. Enjeksiyon süresi arttıkça kapiler içine verilen madde miktarı da artmakta ve aynı derişimdeki numuneler için pik alanı ve pik yüksekliğinde artış gözlenmektedir. Bu, daha düşük derişimlerde çalışabilmek, yani gözlenebilme ve alt tayin sınırlarının düşmesi anlamına gelmektedir. Ancak enjeksiyon süresi arttıkça pik genişlikleri de artmakta, bu da ayırıcılık ve etkinliği azaltmaktadır. Optimizasyon çalışmalarında 50 mbar sabit basıncın uygulama süresi

1-8 sn arasında değiştirilerek elde edilen elektroferogramlar incelenmiştir. Pik yüksekliklerinde 3 sn'ye kadar artma gözlenmiş, daha sonra belirgin bir artış olmamıştır. Ancak 6 sn'den itibaren pikler yayvanlaşmaya ve pik şekilleri bozulmaya başlamıştır. Bu nedenle enjeksiyon süresi olarak 3 sn seçilmiştir.

Kapiler sıcaklığının kontrolü, tekrarlanabilir sonuçlar alınması açısından önemlidir. Analiz süresince ya da analizler arasında kapiler sıcaklığında meydana gelebilecek değişimler etkinlik, göç zamanları, enjeksiyon hacimleri ve dedektör cevabını etkiler. EOF ve elektroforetik hareketlilik tampon viskozitesine bağlıdır (Formül 2.3 ve 2.6). Tampon viskozitesi de sıcaklıkla değişir. Dolayısıyla, kapiler sıcaklığında değişiklik EOF ve elektroforetik hareketliliklerde meydana gelen değişiklikler nedeniyle, göç zamanlarını ve pik alanlarını etkiler (64,91). Çalışma sıcaklığının belirlenebilmesi için 20, 25 ve 30 °C'de yapılan deneyler sonucunda elde edilen elektroferogramlar incelenmiştir. Sıcaklık arttıkça beklendiği gibi göç zamanı azalmaktadır, ancak cihazın analize başlaması için, kapiler sıcaklığının sabitlenmesi amacıyla ayarlanan sıcaklığa göre 2 – 10 dk beklemek gerekmektedir. Kapiler sıcaklığı için oda sıcaklığı olan 25 °C'nin seçilmesi ile bu bekleme süresi en aza inmektedir. Bu nedenle optimum sıcaklığın 25°C olduğuna karar verilmiştir.

ROS, MET ve VER (İS)'nin CZE'de dizi diyot dedektörle analizi için üçünün de yüksek absorbands gösterdiği bir dalga boyu belirlenmelidir. Maddelerin UV spektrumları incelenerek belirlenen 203, 220 ve 240 nm'de çalışmalar yapılmıştır. Farmasötik preparatlarda ROS'un MET'e göre çok az miktarda bulunması nedeniyle alt tayin sınırının mümkün olduğunca düşük olması aynı anda analiz için gerekli olduğundan, çalışma dalga boyu olarak ROS'un maksimum absorbands gösterdiği 203 nm (bant genişliği  $\pm 10$  nm) seçilmiştir.

Sonuç olarak çalışma tamponu ve cihaz parametrelerinin en uygun koşulları; 25 mM pH 4.0 asetat tamponu, 50 mbar basınçla 3 sn enjeksiyon süresi, 25 kV voltaj uygulaması, 25 °C çalışma sıcaklığı ve 203 nm dalga boyu olarak belirlenmiştir. Bu koşullar altında MET'in  $6.20 \pm 0.01$  dk, ROS'un  $7.79 \pm 0.01$  dk ve VER'in  $8.49 \pm 0.01$  dk göç zamanına sahip olduğu görülmüştür (Bkz. Şekil 4.7 c).

Optimize edilen parametreler uygulanarak yapılan deneyler sonucunda elde edilen elektroferogramlardan, ROS, MET ve VER'in pik simetrilerinin 1'e yakın olması ve teorik tabaka sayısının yüksek olması geliştirilen yöntemin yüksek

etkinlikte olduğunu; ayırıcılığın 1.5’den büyük olması ise iyi bir ayırımın gerçekleştiğini göstermiştir (Bkz. Tablo 4.1).

CE yönteminde madde miktarının hesaplanabilmesi için pik yüksekliği, pik alanı, pik normalizasyonu (PN, pik alanının göç zamanına oranı), pik alan oranı (maddenin pik alanının iç standardın pik alanına oranı) ve pik normalizasyon oranları (maddenin PN’sinin iç standardın PN’sine oranı) kullanılabilir. Yüksek derişimlerde piklerin genişlemesi veya bozulması pik yüksekliklerinde değışikliklere neden olur (64), bu nedenle CE’de miktar tayinlerinde daha geniş bir doğrusal aralık sağladıklarından genellikle pik alanları kullanılır. Buna ek olarak, göç zamanlarındaki olası sapmalar hesaba katılarak kesinliğin arttırılması için PN tercih edilir (79,91).

Belirlenen optimum koşullarda, 20.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ROS, MET ve VER içeren çözelti 10 kez enjekte edilmiş, pik alanları, pik alan oranları, PN’leri ve PN oranları değerlendirilmiştir. Tablo 4.2’de verilen BSS değeri incelenğinde, en iyi tekrarlanabilirliğin PN oranları ile elde edildiği görülmüştür. Sonuçlarda daha yüksek kesinlik elde etmek için hesaplamalarda PN oranları kullanılmıştır.

### 5.1.2. CZE Yönteminin Validasyon Çalışmaları

Geliştirilen CZE yönteminin geçerliliğinin kanıtlanması için validasyon parametrelerine göre test edilmesinde kaynaklarda bildirilen parametreler ve geçerlilik kriterleri (77-81) kullanılmıştır. Bu amaçla, validasyon çalışmalarında; kararlılık, doğrusallık, duyarlılık, kesinlik, doğruluk, geri kazanım, özgünlük (seçicilik), sağlamlık ve tutarlılık parametreleri incelenmiş ve istatistiksel değerlendirilmeleri yapılmıştır (82,83).

### Kararlılık

Tekrarlanabilir ve güvenilir sonuçlar elde etmek için, validasyon çalışmalarının başlangıcında çalışılan maddelerin kararlılığı belirlenmelidir. Özellikle otomatik örnekleyiciler kullanılarak yapılan gecelik analizlerde çözeltilerin yeterince kararlı olup olmadığı araştırılmalıdır (78-81). Bu amaçla, ROS ve MET’in kararlılık çalışmaları kısa dönem ve uzun dönem olmak üzere iki şekilde araştırılmıştır. Kısa dönem kararlılığını test etmek için, stok çözeltilerden hazırlanan çözeltiler 24 saat boyunca oda sıcaklığında saklanmıştır. Bu süre sonunda geliştirilen

CZE yöntemi ile ROS ve MET'in dedektör cevaplarındaki değişiklikler taze çözeltilerinkilerle karşılaştırılmıştır. Kabul edilebilir kısa dönem kararlılık kriteri % 2'lik değişimdir (78,80). Tablo 4.3'de verilen sonuçlara dayanarak, ROS ve MET'in 24 saat süresince kararlı olduğu söylenebilir.

ROS ve MET'in uzun dönem kararlılığını test etmek için, 4 °C'de saklanan 1000 µg mL<sup>-1</sup>'lik stok çözeltilerinin kararlılığı 4 ay boyunca çeşitli zaman aralıklarında değerlendirilmiştir. Bu çözeltilerden 20.0 µg mL<sup>-1</sup>'lik çözeltiler hazırlanarak UV spektrumları alınmış ve taze hazırlanmış çözeltilerin spektrumları ile karşılaştırılmıştır. Spektrumların herhangi bir kısmında absorbansta azalma veya dalga boyu kayması gözlenmemiştir. Ayrıca geliştirilen CZE yöntemi ile ROS ve MET'in dedektör cevaplarındaki değişiklikler izlenmiştir. Elektroferogramlarda herhangi bir bozunma ürününe rastlanmamıştır ve pik alanlarında meydana gelen değişiklikler ROS için % 102.00, MET için % 98.46 olarak bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.3). Bu sonuçlara göre, ROS ve MET stok çözeltilerinin 4 °C'de saklandıklarında en az 4 ay kararlı oldukları söylenebilir.

### **Doğrusallık**

ROS ve MET'i bir arada içeren tabletler (Avandamet®), 1 mg ROS / 500 mg MET, 2 mg ROS / 500 mg MET, 4 mg ROS / 500 mg MET olmak üzere 3 farklı dozaj formunda yurtdışı piyasalarında bulunmaktadır. Farmasötik preparatlardaki bu miktarlar göz önünde bulundurularak, optimize edilen analiz koşullarında, ROS için 1.0-12.0 µg mL<sup>-1</sup> ve MET için 100.0-1200.0 µg mL<sup>-1</sup> derişim aralıklarında kalibrasyon doğruları oluşturulmuş ve her durumda 20 µg mL<sup>-1</sup> VER iç standart olarak eklenmiştir. ROS ve MET'in iç standarda göre PN oranları grafiğe geçirilmiştir (Bkz. Şekil 4.5 ve 4.6). Regresyon analizi sonucunda kalibrasyon denklemi, korrelasyon analizi sonucunda r ve R<sup>2</sup> katsayıları elde edilmiştir (Bkz. Tablo 4.4). ROS ve MET için elde edilen korrelasyon katsayılarının sırasıyla 0.9998 ve 1 olması doğrusallığın göstergesidir. Ayrıca doğrusallıktan ayrılışın ve korrelasyon katsayılarının önem kontrolü yapılarak, doğrusallıktan ayrılışın önemsiz olduğu ve korrelasyon katsayılarının tesadüfen bulunmuş değerler olmadığı istatistiksel olarak saptanmıştır (Bkz. Tablo 4.5 ve 4.6) (82).

### **Duyarlılık**

LOD, sinyal/gürültü oranının 3 olduğu değerdir (77-80). Bu tanıma göre ROS ve MET'in LOD'leri  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  olarak saptanmıştır.

LOQ, kabul edilebilir doğruluk ( $\leq \%20$ ) ve kesinlik ( $\leq \%20$ ) değerlerinde tayin edilebilen en düşük derişim değeridir (77-80). Bu tanıma göre ROS ve MET'in LOQ'ları  $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  olarak saptanmıştır (ROS için: BSS = % 7.41, bağıl hata = % 3.58, MET için: BSS = 5.17, bağıl hata = % 12.78). Bu sonuçlara göre, farmasötik preparatlardan analiz için geliştirilen CZE yönteminin yeteri kadar duyarlı olduğu söylenebilir.

### **Doğruluk ve Kesinlik**

Bir yöntemin kesinliği, sonuçların tekrarlanabilirliğinin göstergesidir. Hazırlanan standart numunelerin yapılan tekrarlı analizleri sonucunda saptanan BSS terimi ile tanımlanır. BSS, standart sapmanın ortalamaya göre yüzde kaçlık bir derişim gösterdiğini belirtir (82). Kesinlik; tekrarlanabilirlik, ara kesinlik ve yeniden üretilebilirlik olmak üzere 3 farklı şekilde gösterilmelidir (77,79-81). Yeniden üretilebilirlik testi, laboratuvarlar arası kesinliği gösterdiği için, her zaman uygulama olanağı bulunamaz ve ara kesinlik testlerinin yapıldığı durumlarda gerekli değildir (80,81).

Tekrarlanabilirlik, sistem tekrarlanabilirliği (veya enjeksiyon tekrarlanabilirliği) ve yöntem tekrarlanabilirliği olmak üzere iki şekilde incelenir. Geliştirilen CZE yönteminde, CE sisteminin tekrarlanabilirliğini göstermek amacıyla, doğrusal aralık içerisinde bir derişim değerinde hazırlanan ( $20.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  ROS, MET ve VER) aynı standart çözeltiden 10 enjeksiyon yapılmış ve göç zamanları, pik alanları, PN'leri, PN oranları değerlendirilmiştir. Tablo 4.2'de görüldüğü gibi, göç zamanı ve PN oranlarının BSS'sinin kaynaklarda verilen (78-80) kriterlere uygun olarak % 1'in altında bulunması sistemin kesinliğinin göstergesidir.

Geliştirilen CZE yönteminin tekrarlanabilirliğinin testi için,  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  ROS ve MET içeren 10 ayrı çözelti hazırlanarak miktar tayinleri yapılmıştır. BSS değerlerinin her iki madde için de % 1'in altında bulunması yöntemin tekrarlanabilir olduğunun göstergesidir (Bkz. Tablo 4.9).

Ara kesinlik testleri için, doğrusal aralık içerisine giren 3 farklı derişim seviyesinde (ROS için 2.0, 6.0 ve 10.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , MET için 200.0, 600.0 ve 1000.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) 6'şar çözelti hazırlanarak gün içi ve günler arası analizler 3'lü tekrar ile yapılmıştır. ROS için 0.66-2.5, MET için 0.42-1.78 aralığında BSS değerleri bulunması kesinliğin yüksek olduğunun göstergesidir (Bkz. Tablo 4.7 ve 4.8).

Doğruluk, deneysel değerin gerçek değere yakınlığının ölçütüdür ve 3 şekilde belirlenebilir. Birincisi, bilinen derişimlerdeki standartların analizleri yapılarak, ölçülen değerlerle gerçek değerlerin karşılaştırılmasıdır. Analizler, 3 derişim seviyesinde en az 3 tekrar ile yapılır. İkinci yaklaşım, geliştirilen yöntemle bulunan sonuçların, kaynaklarda bulunan valide edilmiş bir yöntemle karşılaştırılmasıdır. Üçüncüsü ise, örnek matriksine bilinen miktarlarda eklenen standartlarla yapılan geri kazanım çalışmalarıdır (77-80).

Geliştirilen CZE yönteminin gün içi ve günler arası doğruluk çalışması üç farklı derişimde, 6 ayrı çözeltiyle 3 tekrarlı yapılmış olup sonuçlarda yüksek doğruluk elde edilmiştir (% Bağıl hata ROS için 0 - 2.60, MET için 0.01 - 0.63) (Bkz. Tablo 4.7 ve 4.8).

### **Geri Kazanım**

Geliştirilen CZE yönteminin doğruluğunun kanıtlanması amacıyla yapılan geri kazanım çalışmaları, farmasötik preparatlarda belirtilen miktarlara uygun olarak 3 farklı derişim oranında (1 mg ROS / 500 mg MET, 2 mg ROS / 500 mg MET, 4 mg ROS / 500 mg MET) ROS ve MET içeren sentetik preparatlar hazırlanarak yapılmıştır. Kaynaklarda geri kazanımın bu tip çalışmalarda %  $100 \pm 2$  olması gerektiği belirtilmiştir (78,80). Tablo 4.10'da görüldüğü gibi, geliştirilen CZE yönteminin geri kazanım sonuçları bu aralığa girmektedir, ayrıca tekrarlar arasındaki BSS'ler düşüktür. Bu sonuçlar, geliştirilen yöntemin doğruluğunun bir diğer kanıtıdır.

### **Özgünlük (Seçicilik)**

Özgünlük (seçicilik), analit cevabının tüm olası örnek bileşenlerinin varlığında doğru olarak ölçülebilmesidir (78-80). Ölçülen cevabın sadece analite ait olduğunun göstergesidir (79). Geliştirilen CZE yönteminin özgünlüğü, plasebo, sentetik preparat ve tablet çözeltileri ile standart çözeltilerin elektroferogramlarının

karşılaştırılması ile gösterilmiştir. Şekil 4.7’de görüldüğü gibi ROS, MET ve iç standart VER pikleri zeminden ve birbirlerinden tam olarak ayrılabilmişlerdir ve farmasötik preparatlarda bulunan yardımcı maddelerle herhangi bir etkileşim olmamıştır. Dizi diyot dedektörle elde edilen pik saflık değerlerinin 1’e yakın olması da yöntemin özgünlüğünün bir göstergesidir (Bkz. Tablo 4.1)

Ayrıca yöntemin özgünlüğü, farmasötik preparatlardan miktar tayini için uygulanan kalibrasyon eğrisi yöntemi ve standart ekleme yöntemi ile elde edilen eğrilerin eğimlerinin karşılaştırılması ile de gösterilmiştir (Kalibrasyon eğrisi eğimi ROS için 0.0279, MET için 0.0268, standart ekleme eğrisi eğimi ROS için 0.0257, MET için 0.0256). Eğimlerin çok yakın olması farmasötik preparatlarda bulunan yardımcı maddelerin analizi etkilemediğini göstermektedir.

### **Sağlamlık ve Tutarlılık**

Bir yöntemin sağlamlığı (*robustness*), yöntem parametrelerinde yapılan küçük ama kasıtlı değişikliklerden etkilenmeden kalabilme kapasitesidir (77-81). Sağlamlık ölçümlerinde, yapılan değişikliklere karşı analizin güvenilirliği gösterilmelidir (77). Geliştirilen CZE yönteminin sağlamlık çalışmalarında, yöntem parametrelerinde yapılan küçük değişiklikler (çalışma tamponu pH’ı 4.0 yerine 3.9 ve 4.1, çalışma tamponu derişimi 25 mM yerine 22.5 ve 27.5 mM, uygulanan voltaj 25 kV yerine 24 ve 26 kV, dedektör dalga boyu 203 nm yerine 201 ve 205 nm) sonucunda ROS ve MET’in miktar tayinlerinin etkilenip etkilenmediği araştırılmıştır. Her bir değişiklikte yapılan analiz sonuçları optimum koşullarda bulunan analiz sonuçları ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (Bkz. Tablo 4.11). Yapılan t testi sonucunda, analiz sonuçları arasında anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır ( $p>0.05$ ) (83).

Tutarlılık (*ruggedness*), analiz koşullarında yapılan farklı analizci, farklı cihaz gibi değişikliklerde analiz sonuçlarının yeniden üretilebilirliğinin göstergesidir (94). Geliştirilen yöntemin tutarlılık çalışmalarında, ROS ve MET için doğrusallık aralığına giren birer derişim seviyesinde farklı iki analizci tarafından yapılan analiz sonuçları karşılaştırılmıştır (Bkz. Tablo 4.12). Yapılan t testi sonucunda, her iki analizci bulgularında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır ( $p>0.05$ ) (83). Bu sonuçlar, geliştirilen CZE yönteminin sağlam ve tutarlı olduğunu göstermektedir.

### 5.1.3. CZE Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Geliştirilen ve validasyon parametreleri değerlendirilen (valide edilen) CZE yöntemi; ROS ve MET'i bir arada içeren, üç ayrı dozaj miktarı bulunan Avandamet® farmasötik preparatlarının analizine uygulanmıştır (Bkz. Tablo 4.13). Bu preparatlar henüz Türkiye piyasalarında bulunmamaktadır. Yurtdışından firma aracılığıyla elde edilmiştir. Farmasötik preparatların analizi hem kalibrasyon eğrisi, hem de standart ekleme yöntemi ile yapılmıştır. Kalibrasyon eğrilerinin eğimleri ile standart ekleme eğrilerinin eğimlerinin birbirine yakın olması nedeniyle analizler kalibrasyon eğrisi yöntemi ile yapılmıştır.

Bölüm 5.1.2'de bahsedildiği gibi, geliştirilen yöntemin geçerli olabilmesi için diğer bir yol da, yöntemin preparatlara uygulanması ile elde edilen sonuçların kaynaklarda geçerli olan başka bir yöntem ile karşılaştırılarak aralarında istatistiksel olarak fark bulunmadığının gösterilmesidir. Bu nedenle ROS ve MET'in aynı anda analizi için kaynaklarda bulunan tek yöntem olan HPLC yöntemi (53), Avandamet® farmasötik preparatlarının üç ayrı dozaj miktarının analizine uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar, geliştirilen CZE yöntemi ile elde edilen sonuçlarla, t testi uygulanarak (83) karşılaştırılmıştır (Ek 4). Sonuç olarak, geliştirilen yöntem ile karşılaştırma yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır ( $p > 0.05$ ) (Bkz. Tablo 4.13). Böylece geliştirilen CZE yönteminin doğruluğu ve farmasötik preparatların analizine uygulanabilirliği gösterilmiştir.

## 5.2. HPLC Yöntemi

### 5.2.1. HPLC Yönteminin Optimizasyon Çalışmaları

ROS ve MET'in HPLC ile aynı anda analizi için en uygun kromatografik koşulların belirlenmesinde, dikkate alınan kromatografik parametreler alıkonma zamanı, kapasite faktörü, ayırıcılık, teorik tabaka sayısı ve pik simetri oranıdır. Bir kromatografik sistemde piklerin birbirinden tam olarak ayrılabilmesi, kesin ve tutarlı nicel analiz yapılabilmesi için ayırıcılığın 1.5'dan ( $R_s \geq 1.5$ ) büyük olması gerekmektedir. Yüksek kapasite faktörü değerleri ayırıcılığı artırır, ancak kapasite faktöründeki fazla artış analiz süresinin uzamasına ve geniş piklere neden olur (73). En uygun performans için kapasite faktörü 1-10 arasında olmalıdır, ancak bazı durumlarda bu aralık 0.5-20 aralığına kadar genişleyebilir (63). Girişim yapan pikler

genellikle 0-1 aralığındadır ve kromatogramın bu kısımlarındaki zemin bozukluğu nicel analizi zorlaştırır. Yöntem geliştirilmesinde pik şekilleri de önemli bir ölçüdür. Deneysel koşulların simetrik pikler sağlaması her zaman tercih edilir. Pik simetri oranı 1.6'yı geçmemelidir (75). Teorik tabaka sayısı da bir kolon için tek ve en önemli özelliktir. Kolonun keskin ve dar pikler oluşturma gücünü tanımlar, 2000'in üzerinde olmalıdır. Hesaplamalarda kullanılan önemli bir parametre de ölü hacimdir. Ölü hacim, kolondaki toplam hareketli faz hacmidir ve belirlenmesi için kolona tutunmayan bir madde enjekte edilir. Bu çalışmada ölü hacim zamanının belirlenmesi için metanol kullanılmıştır.

Yöntem geliştirme çalışmalarında, geniş bir uygulama alanına sahip olması nedeniyle, ilk seçenek olarak ters faz sıvı kromatografisi denenmektedir. Bu teknikte sabit faz hareketli faza göre daha az polardır. Ters faz uygulamalarında en çok C<sub>18</sub> bağlanmış silika kolonlar kullanıldığından denemelere bu tip bir kolonla başlanmıştır. MET'in yüksek polariteye sahip olması, ters faz kromatografisi ile ayrıldığında çok kısa alıkonma zamanı elde edilmesine yol açmaktadır. Ayrıca kuvvetli baz özelliği göstermesi nedeniyle silika yapısındaki asidik özellikteki artık silanol gruplarıyla etkileşmekte ve pik şeklinde kuyruklanma gözlenmektedir. Farklı oranlarda asetonitril veya metanol ve farklı pH'larda çeşitli tamponlardan oluşan hareketli fazlarla yapılan ilk denemelerde, MET için uygun bir alıkonma zamanı ve düzgün bir pik şekli elde edilememiştir.

Alkil-bağlı ters faz kolonlarında (C<sub>18</sub> ve C<sub>8</sub>), polar moleküller apolar sabit fazla hidrofobik etkileşimlere giremediklerinden erken elüe olmaktadır. Fenil kolonlar, alkil-bağlı ters faz kolonlarına göre daha polar olduklarından bu tip kolonlarda ayrılamayan maddeler için hidrofobik etkileşime ek olarak alternatif alıkonma mekanizmaları sağlamaktadırlar. Bunun nedeni, silika yüzeyine bağlanmış fenil halkasındaki  $\pi$  elektronları ile analitin  $\pi$  elektronları arasındaki etkileşimdir (95-97).  $\pi$ - $\pi$  etkileşimleri aromatik halka veya doymamış bağ içeren organik bileşikler arasındaki kovalent olmayan bağlardır. Fenil kolonlarda hidrofobik etkileşimlere ek olarak gerçekleşen bu etkileşimlerle, doymamış bağ içeren polar moleküller sabit fazla daha güçlü bağlar oluşturmakta, bunun sonucunda da daha geç elüe olmaktadır. Optimizasyon çalışmalarında sabit faz olarak fenil kolon kullanılması, beklenildiği gibi, MET'in alıkonma zamanını arttırmış ve pik şeklini

düzeltilmiştir. Çalışmalara Ace 5 fenil kolon (250 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m) ile devam edilmiştir.

Ters faz sıvı kromatografisinde hareketli faz polaritesi, diğer bir deyişle organik çözücü içeriği kromatografik ayırımı önemli ölçüde etkiler (75). Hareketli faz bileşimindeki organik çözücü tipi ve oranının, ROS ve MET'in ayırımına etkisi pH'sı 5.5 olan 10 mM fosfat tamponu ve değişik oranlarda asetonitril veya metanol eklenmesi ile incelenmiştir. Hareketli faza asetonitril yerine metanol eklendiğinde maddelerin alıkonma zamanları artmıştır. Bunun nedeni asetonitrilin fenil kolonla örnek molekülleri arasında gerçekleşen  $\pi$ - $\pi$  etkileşimlerini zayıflatmasıdır (95). MET'in alıkonma zamanının artması istenen bir durumdur, ancak metanol kullanımında pik simetri oranları azalmıştır. Ayrıca metanolün asetonitrile göre viskozitesi yüksek olduğundan yüksek basınca yol açmaktadır. Bu nedenle asetonitril organik çözücü olarak seçilmiştir. Asetonitrille % 65, 70 ve 75 oranlarında yapılan denemelerde, artan asetonitril miktarıyla MET'in kapasite faktörünün arttığı, ROS'inkininde ise azaldığı görülmüştür (Bkz. Tablo 4.14). Polaritesi yüksek olan MET'in artan asetonitril miktarı ile hareketli faz polaritesinin azalması sonucu alıkonması artarken, apolar özellik taşıyan ROS'un alıkonmasının azalması beklenen bir durumdur. En iyi ayırım, % 70 asetonitril oranı ile elde edilmiştir (Bkz. Şekil 4.8).

Hareketli fazın pH değeri ayırımı yapılacak maddelerin asidik ya da bazik karakterine bağlı olarak kromatografik davranışlarını etkiler. Ters faz sıvı kromatografisinde asidik bileşenler için pH'nın artırılması ile alıkonma zamanı azalırken, bazik bileşenlerde ise tam tersidir (75). Hareketli fazın pH'nın belirlenmesi için fosfat tamponunun pH'sı 5.0, 5.5 ve 6.0'ya ayarlanarak yapılan analizlerde ROS'un asidik, MET'in bazik karakterde olması nedeniyle pH arttıkça ayırıcılık azalmıştır (Bkz. Tablo 4.15). pH 6.0'da ayırıcılık 1'in altına düştüğünden fosfat tamponu pH'ı olarak 5.5 seçilmiştir (Bkz. Şekil 4.9).

Hareketli fazın tampon derişiminin etkisinin incelenmesi için pH'sı 5.5 olan 5 mM, 10 mM ve 15 mM fosfat tamponu:asetonitril (30:70, h/h) çözeltileri hareketli faz olarak denemiştir. Derişimin artması ROS'un kapasite faktörünü etkilemezken MET'inkini belirgin bir şekilde azaltmıştır (Bkz. Tablo 4.16). 10 mM fosfat tamponu yüksek ayırıcılığa sahip olması nedeniyle uygun bulunmuştur (Bkz. Şekil 4.10).

Hareketli faz akış hızı 0.8, 1.0 ve 1.2 mL dk<sup>-1</sup> olarak değiştirilerek kromatografik parametreler değerlendirildiğinde, ayırıcılık ve pik simetri oranları dikkate alınarak 1.0 mL dk<sup>-1</sup> seçilmiştir.

ROS ve MET'in HPLC ile analizinde kullanılacak iç standardın seçimi için sefepim, sülfizaksazol, diflunisal, mikonazol, metronidazol, diklofenak ve verapamil'in belirlenen kromatografik koşullardaki davranışları ve alıkonma zamanları incelenmiştir. Verapamil, ROS ve MET pikleri ile girişim yapmayacak uygun alıkonma zamanına ve düzgün pik şekline sahip olması nedeniyle iç standart olarak seçilmiştir.

Dedektör dalga boyunun belirlenmesi için optimizasyon çalışmaları sırasında ROS, MET ve VER'in UV spektrumlarından belirlenen 225, 235 ve 245 nm'de denemeler yapılmıştır. Her üç maddenin de en yüksek cevabı verdiği 225 nm'de 2.1 dk'da hareketli fazdan kaynaklanan bir pik gözlenmiş, girişimleri önlemek için bu pikin gözlenmediği 245 nm dedektör dalga boyu olarak seçilmiştir.

Sonuç olarak, ROS ve MET'in aynı anda analizi, Ace 5 fenil kolonda (250 x 4.6 mm, 5 µm), asetonitril ve 10 mM pH 5.5 fosfat tamponundan (70:30, h/h) oluşan hareketli faz sistemi ile 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızında, 245 nm'de UV dedektörle gerçekleştirilmiştir. Bu şartlarda elde edilen alıkonma zamanları MET için 3.33 dk, ROS için 4.26 dk, VER için ise 5.54 dk'dır. Elde edilen diğer kromatografik parametreler Tablo 4.17'de verilmiştir. Ayırıcılığın 1.5'dan büyük olması, teorik tabaka sayısının 2000'den büyük olması ve pik simetrilerinin 1.4'den küçük olması kullanılan HPLC sisteminin uygunluğunun göstergesidir (80,81).

### 5.2.2. HPLC Yönteminin Validasyon Çalışmaları

#### Kararlılık

Geliştirilen HPLC yönteminde ROS ve MET'in kararlılık çalışmaları kısa dönem ve uzun dönem olmak üzere iki şekilde araştırılmıştır. Kısa dönem kararlılığını test etmek için, stok çözeltilerden hazırlanan çözeltiler 24 saat boyunca oda sıcaklığında saklanmıştır. Bu süre sonunda geliştirilen HPLC yöntemi ile ROS ve MET'in dedektör cevaplarındaki değişiklikler taze çözeltilerinkilerle karşılaştırıldığında değişimin % 2'den az olduğu görülmektedir (Bkz. Tablo 4.18).

Bu sonuçlara dayanarak, ROS ve MET'in 24 saat süresince kararlı olduğu söylenebilir.

ROS ve MET'in uzun dönem kararlılığını test etmek için, 4 °C'de saklanan 1000 µg mL<sup>-1</sup>'lik stok çözeltilerinin kararlılığı 4 ay boyunca çeşitli zaman aralıklarında incelenmiştir. Geliştirilen HPLC yöntemi ile ROS ve MET'in dedektör cevaplarındaki değişiklikler izlendiğinde kromatogramlarda herhangi bir bozunma ürününe rastlanmamıştır ve pik alanlarında meydana gelen değişiklikler ROS için % 99.09, MET için % 101.91 olarak bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.18). Bu sonuçlara göre, ROS ve MET stok çözeltilerinin 4 °C'de saklandıklarında en az 4 ay kararlı oldukları söylenebilir.

### **Doğrusallık**

ROS ve MET'in farmasötik preparatlardaki miktarları dikkate alınarak, optimize edilen analiz koşullarında, ROS için 0.05-1.2 µg mL<sup>-1</sup> ve MET için 5.0-80.0 µg mL<sup>-1</sup> derişim aralıklarında kalibrasyon doğruları oluşturulmuştur. Yapılan çalışmalarla doğrusallığın ROS ve MET için 0.02 µg mL<sup>-1</sup>'den başladığı gözlenmiştir. Her durumda 5.0 µg mL<sup>-1</sup> VER iç standart olarak eklenerek ROS ve MET'in iç standarda göre pik alan oranları grafiğe geçirilmiştir (Bkz. Şekil 4.11 ve 4.12). Regresyon analizi sonucunda kalibrasyon denklemi, korrelasyon analizi sonucunda r ve R<sup>2</sup> katsayıları elde edilmiştir (Bkz. Tablo 4.19). ROS ve MET için elde edilen korrelasyon katsayılarının sırasıyla 0.9999 ve 1 olması doğrusallığın göstergesidir. Ayrıca doğrusallıktan ayrılışın ve korrelasyon katsayılarının önem kontrolü yapılarak, doğrusallıktan ayrılışın önemsiz olduğu ve korrelasyon katsayılarının tesadüfen bulunmuş değerler olmadığı istatistiksel olarak saptanmıştır (Bkz. Tablo 4.20 ve 4.21) (82).

### **Duyarlılık**

Geliştirilen HPLC yönteminde, ROS ve MET'in LOD değerleri S/G oranının 3 olduğu değere göre, sırasıyla 10 ng mL<sup>-1</sup> ve 5 ng mL<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur.

Kabul edilebilir doğruluk ve kesinlik değerlerinde olmak üzere, ROS ve MET için LOQ 0.02 µg mL<sup>-1</sup> olarak saptanmıştır (ROS için: BSS = % 15.33, bağıl hata = % 7.37, MET için: BSS = % 11.31, bağıl hata = % 10.0). Bu sonuçlara göre,

farmasötik preparatlardan analiz için geliştirilen HPLC yöntemi duyarlı bir yöntem olduğu söylenebilir.

### **Doğruluk ve Kesinlik**

Geliştirilen HPLC yönteminde, sistemin tekrarlanabilirliğini göstermek amacıyla, doğrusal aralık içerisinde bir derişim değerinde hazırlanan ( $2.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  ROS ve MET,  $10.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  VER) aynı standart çözeltiden 10 enjeksiyon yapılmış ve alıkonma zamanları, pik alanları, kapasite faktörleri, pik simetri oranları değerlendirilmiştir. Tablo 4.17’de görüldüğü gibi, değerlendirilen kromatografik parametrelerin BSS’sinin kaynaklarda verilen (78,80) kriterlere uygun olarak % 1’in altında bulunması sistemin tekrarlanabilirliğinin göstergesidir.

Yöntemin tekrarlanabilirliğinin testi için,  $2.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  ROS ve MET içeren 10 ayrı çözelti hazırlanarak miktar tayinleri yapılmıştır. Yöntemin tekrarlanabilir olduğu BSS değerlerinin her iki madde için de % 1’in altında bulunması ile kanıtlanmıştır (Bkz. Tablo 4.24).

Ara kesinlik testleri için, doğrusal aralık içerisine giren 3 farklı derişim seviyesinde (ROS için 0.1, 0.4 ve  $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , MET için 10.0, 30.0 ve  $60.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) 6’şar çözelti hazırlanarak gün içi ve günler arası analizler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Tablo 4.22 ve 4.23’de görüldüğü gibi, ROS için 0.75-8.94, MET için 0.22-1.49 aralığında BSS değerleri bulunması, kesinliğin yüksek olduğunun göstergesidir.

Gün içi ve günler arası doğruluk çalışmalarında, ROS için % 0-10.0, MET için % 0.13-1.30 aralığında elde edilen bağıl hata değerleri yöntemin doğruluğunu göstermektedir (Bkz. Tablo 4.22 ve 4.23).

### **Geri Kazanım**

Geliştirilen HPLC yönteminin doğruluğunun kanıtlanması amacıyla yapılan geri kazanım çalışmaları, CE yönteminde olduğu gibi, farmasötik preparatlarda belirtilen miktarlara uygun olarak 3 farklı derişim oranında (1 mg ROS / 500 mg MET, 2 mg ROS / 500 mg MET, 4 mg ROS / 500 mg MET) ROS ve MET içeren sentetik preparatlar hazırlanarak yapılmıştır. Tablo 4.25’de verilen sonuçlarda görüldüğü gibi, geri kazanım  $\% 100 \pm 2$  aralığındadır ve tekrarlanabilirlik yüksektir.

### **Özgünlük (Seçicilik)**

ROS ve MET'in farmasötik preparatlardan aynı anda analizi için geliştirilen HPLC yöntemi ile ROS, MET ve VER'nin pikleri zeminden ve birbirlerinden tam olarak ayrılmıştır. Şekil 4.13'de verilen plasebo, sentetik preparat, farmasötik preparat ve standart çözeltilerin kromatogramları, farmasötik preparatlardaki yardımcı maddelerin analizi etkilemediğini ve yöntemin seçiciliğini göstermektedir.

Ayrıca yöntemin özgünlüğü, farmasötik preparatlardan miktar tayini için standart ekleme yönteminin uygulanması ile gösterilmiştir. Standart ekleme yöntemi ile elde edilen doğruların eğimlerinin (ROS için 0.9344, MET için 1.2794), kalibrasyon doğrularının eğimlerine (ROS için 0.9294, MET için 1.327) çok yakın bulunması, farmasötik preparatlarda bulunan yardımcı maddelerin analizi etkilemediğini göstermiştir.

### **Sağlamlık ve Tutarlılık**

Yöntemin sağlamlık çalışmalarında, hareketli faz asetonitril oranı, tampon pH'ı, tampon derişimi ve akış hızı gibi yöntem parametrelerinde yapılan küçük değişiklikler sonucunda ROS ve MET'in miktar tayinlerinin etkilenip etkilenmediği araştırılmıştır. Her bir değişiklikte yapılan analiz sonuçları optimum koşullarda bulunan analiz sonuçları ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (Bkz. Tablo 4.26). Yapılan t testi sonuçları, geliştirilen yöntemin optimum koşullarındaki küçük değişikliklerin ROS ve MET'in analiz sonuçlarını etkilemediğini göstermektedir ( $p > 0.05$ ) (83).

Farklı iki analizci tarafından ROS ve MET için doğrusallık aralığına giren bir derişim seviyesinde yapılan tutarlılık çalışmalarından elde edilen veriler Tablo 4.27'de gösterilmiştir. Yapılan t testi sonucunda, ortalamalar arasında anlamlı bir fark bulunmaması HPLC yönteminin tutarlılığını kanıtlamaktadır ( $p > 0.05$ ) (83).

### **5.2.3. HPLC Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulanması**

Bu çalışmalar tamamlandığında, geliştirilen CZE yönteminde kullanılan, Türkiye piyasalarında bulunmadığından yurtdışından firma aracılığıyla temin edilen Avandamet® farmasötik preparatlarının son kullanma süreleri dolmuştur. Firma ile tekrar irtibata geçildiğinde, Avandamet® tabletlerin sadece 2 mg ROS / 500 mg MET içeren dozaj formu elde edilebilmiştir. Bu nedenle, geliştirilen HPLC yöntemi sadece

bu dozaj miktarını içeren tabletlere uygulanabilmektedir. Kalibrasyon eğrilerinin eğimleri ile standart ekleme eğrilerinin birbirine yakın olması nedeniyle analizler kalibrasyon eğrisi yöntemi ile yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, geliştirilen CZE yöntemi ve kaynaklarda bulunan HPLC yöntemi (53) ile yapılan analiz sonuçları ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (Bkz. Tablo 4.28). Tek yönlü varyans analizi (83) uygulanarak yapılan istatistiksel değerlendirmede üç yöntemin bulguları arasında anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır ( $p > 0.05$ ) (Ek 5).

### 5.3. HPLC Yöntemi ile Biyolojik Materyal Analizi

#### 5.3.1. Ekstraksiyon Yönteminin Seçimi

ROS ve MET'in plazmadan aynı anda analizi için HPLC yöntemi geliştirilmesi çalışmalarının başlangıcında, bu iki maddenin plazmadan aynı anda elde edilebilmesi için çeşitli ekstraksiyon yöntemleri denenmiştir. En uygun yöntemi belirlemek için, boş plazma, ROS ve MET eklenmiş su ve ROS ve MET eklenmiş plazma çözeltilerine farklı ekstraksiyon yöntemleri uygulanmıştır. Denenen yöntemler Bölüm 3.14'de verilmiştir. Denemeler, farmasötik preparat analizi için geliştirilen HPLC yönteminin koşullarında gerçekleştirilmiştir. Değerlendirme, su ve plazmadan ROS ve MET'in ekstraksiyonu sonucunda gözlenen dedektör cevapları karşılaştırılarak % geri kazanım değerlerinin hesaplanması ve plazmadan gelen örtücü pik oluşumuna göre yapılmıştır (Bkz. Tablo 4.30).

MET'in yüksek polariteye sahip olması, biyolojik materyalden organik çözücülerle ve katı faz kartuşları ile ekstraksiyonunu güçleştirmektedir. Protein çöktürme, sıvı-sıvı ekstraksiyon ve katı faz ekstraksiyon yöntemlerinden sadece asetonitrille proteinlerin çöktürülmesi her iki maddenin plazmadan yüksek verimle elde edilmesini sağlamıştır. Fakat bu durumda da, ROS pikinin alıkonma zamanı ile aynı yerde plazmadan küçük bir pik gelmektedir. Bu durumdan kurtulmak için, asetonitrille protein çöktürme işleminde çeşitli yöntemler denenmiştir (84). Ortama asit (asetik asit ve hidroklorik asit), baz (sodyum hidroksit) ve koruyucu (sodyum metabisülfite) ayrı ayrı eklenerek yapılan asetonitrille protein çöktürme denemeleri ile problem çözülememiştir. Bu durumda ayırımın iyileştirilmesi için kromatografik koşulların optimizasyonuna gerek duyulmuştur.

### 5.3.2. Biyolojik Materyalden HPLC ile Analiz Yönteminin Optimizasyon Çalışmaları

ROS ve MET'in plazmadan HPLC yöntemi ile aynı anda analizinde, Ace 5 fenil kolonda (250 x 4.6 mm, 5 µm) ROS'un plazmadan gelen pikten kurtarılması için hareketli faz koşulları optimize edilmiştir. Hareketli faz organik çözücü oranı, tampon pH'ı ve derişimi değıştirildikçe ROS piki örtücü pikten uzaklaştırılsa bile, bu defa MET piki erken geldiğı için ön plazma piklerine karışmaktadır. ROS ve MET'in plazma piklerinden ve birbirlerinden ayırımının en iyi olduğı hareketli faz bileşimi asetonitril:5 mM pH 5.5 sodyum asetat (75:25 h/h) olarak belirlenmiştir. Ancak bu durumda da MET piki, plazmadan gelen küçük bir pikle karışmaktadır. İzokratik denemelerle başarıya ulaşılamayınca gradient elüsyon denenmesine karar verilmiştir. Yapılan denemeler sonucunda, Tablo 3.1'de verilen basamaklı gradient elüsyon ile ROS, MET, VER (İS) hem birbirlerinden, hem de plazma piklerinden tam olarak ayrılmışlardır. Analizler, 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızında, 245 nm'de UV dedektörle gerçekleştirilmiştir. Bu şartlarda elde edilen alıkonma zamanları ROS için 3.46, MET için 5.26 ve VER için 8.86 dk'dır. Elde edilen diğerkromatografik parametreler Tablo 4.29'da verilmiştir.

Hareketli faz içeriğinde asetat tamponu bulunduğunda, MET'in kolonda alıkonması belirgin bir şekilde değışmekte, ROS'dan daha sonra elüe olmaktadır. Bu durum, asetatın iyon çifti reaktifi özelliğı göstermesi ile açıklanabilir. Kaynaklarda, hareketli fazda bulunan hidrofilik anyonik türlerin bazik ilaçların alıkonma mekanizmalarına bu şekilde etki edebilecekleri açıklanmıştır (98-100). Bazik ve pozitif yüklü olan MET'in, negatif yüklü asetat iyonu ile birleşerek kompleks oluşturması, hidrofobik özelliğini arttırmakta ve kolonda daha uzun süre kalmasına neden olmaktadır. Hareketli faz içeriğinde denenen diğertamponlarda böyle bir etki görünmemesinin nedeni ise, anyonların solvasyonları arasındaki farklılıkla açıklanabilir (100).

### 5.3.3. Biyolojik Materyalden HPLC ile Analiz Yönteminin Validasyon Çalışmaları

ROS ve MET'in plazmadan aynı anda analizi için geliştirilen HPLC yönteminin geçerliliğinin kanıtlanması için validasyon parametrelerine göre test

edilmesinde kaynaklarda bildirilen parametreler ve geçerlilik kriterleri (85-89) kullanılmıştır.

### **Kararlılık**

Biyolojik materyal analizlerinde kararlılık çalışmaları, numunedeki analit derişiminin örnek alma sırasındaki analit derişimine karşılık geldiğinin gösterilmesi açısından gereklidir (86). Kararlılık, kısa dönem, uzun dönem ve donma-erime döngüsü olmak üzere üç şekilde incelenir. ROS ve MET'in plazmadaki kararlılık çalışmaları, ROS için 250.0 ve 500.0 ng mL<sup>-1</sup>, MET için 1000.0 ve 2000.0 ng mL<sup>-1</sup> olmak üzere iki derişim seviyesinde, Bölüm 3.14.3'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Kararlılıkta % 10'a kadar meydana gelebilecek değışimler kabul edilebilir (86). Tablo 4.31'de görüldüğü gibi, ROS ve MET'in plazmadaki kısa dönem, uzun dönem ve donma-erime kararlılıkları kabul edilebilir kriter içerisindedir.

### **Doğrusallık**

ROS ve MET'in HPLC yöntemi ile plazmadan analizi için kalibrasyon eğrisinin aralığı belirlenirken bu iki maddenin maksimum plazma derişimleri (C<sub>maks</sub>) göz önünde bulundurulmuştur. Kaynaklara göre, 4 mg ve 8 mg ROS içeren tablet kullanımında C<sub>maks</sub> değerleri sırasıyla 242 ng mL<sup>-1</sup> ve 603 ng mL<sup>-1</sup>'dir. 500 mg ve 850 mg MET içeren tablet kullanımında ise C<sub>maks</sub> değerleri 1000-2000 ng mL<sup>-1</sup> aralığındadır (2). Bu veriler göz önünde bulundurularak, optimize edilen analiz koşullarında, ROS için 100.0, 250.0, 500.0, 1000.0, 1500.0, 2000.0 ve 2500.0 ng mL<sup>-1</sup>, MET için 250.0, 500.0, 1000.0, 1500.0, 2000.0 ve 2500.0 ng mL<sup>-1</sup> derişim seviyelerinde kalibrasyon doğruları oluşturulmuştur. Her durumda 20 µL 200 µg mL<sup>-1</sup> VER (7.7 µg mL<sup>-1</sup>) İS olarak eklenerek ROS ve MET'in İS'ye göre pik alan oranları grafiğe geçirilmiştir (Bkz. Şekil 4.14 ve 4.15). Korrelasyon katsayılarının ROS için 0.9986, MET için 0.9994 olarak bulunması kalibrasyon eğrilerinin doğrusallığının göstergesidir. Ayrıca doğrusallıktan ayrılışın ve korrelasyon katsayılarının önem kontrolü yapılarak, doğrusallıktan ayrılışın önemsiz olduğu ve korrelasyon katsayılarının tesadüfen bulunmuş değerler olmadığı istatistiksel olarak saptanmıştır (Bkz. Tablo 4.33 ve 4.34) (82).

### Duyarlılık

ROS ve MET'in plazmadan analizi için geliştirilen HPLC yönteminde LOD değerleri, S/G oranının 3 olduğu derişim değerine göre ROS için  $50.0 \text{ ng mL}^{-1}$ , MET için  $100.0 \text{ ng mL}^{-1}$  olarak bulunmuştur. LOQ değerleri ise, kabul edilebilir doğruluk ( $\leq \%20$ ) ve kesinlik ( $\leq \%20$ ) değerlerinde ROS için  $100.0 \text{ ng mL}^{-1}$ , MET için  $250.0 \text{ ng mL}^{-1}$  olarak saptanmıştır (ROS için: BSS = % 9.08, bağıl hata = % 18.39, MET için: BSS = % 2.69, bağıl hata = % 8.65) (Bkz. Tablo 4.32). Bu sonuçlara göre, geliştirilen yöntemin ROS ve MET'in plazma derişimleri dikkate alındığında, bu iki maddenin plazmadan tayin edilebilmesi için yeterli duyarlılıkta olduğu söylenebilir.

### Doğruluk ve Kesinlik

Biyolojik materyal analizinde kullanılan HPLC sisteminin tekrarlanabilirliğinin test edilmesi için, ROS ve MET eklenerek hazırlanmış aynı plazma çözeltisinden 10 enjeksiyon yapılmış ve cihaz parametreleri değerlendirilmiştir (Bkz. Tablo 4.29). Değerlendirilen kromatografik parametrelerin BSS'sinin % 1'in altında bulunması sistem tekrarlanabilirliğinin göstergesidir.

Yöntemin tekrarlanabilirliğinin testi için,  $250.0 \text{ ng mL}^{-1}$  ROS ve  $1000.0 \text{ ng mL}^{-1}$  MET içeren 10 ayrı plazma çözeltisi hazırlanarak miktar tayinleri yapılmıştır. BSS değerlerinin her iki madde için de % 1'in altında bulunması yöntemin tekrarlanabilir olduğunu göstermiştir (Bkz. Tablo 4.37).

Doğrusal aralık içerisine giren 3 farklı derişim seviyesinde (ROS için  $100.0$ ,  $250.0$  ve  $500.0 \text{ ng mL}^{-1}$ , MET için  $500.0$ ,  $1000.0$  ve  $2000.0 \text{ ng mL}^{-1}$ ) 6'şar çözelti hazırlanarak gün içi ve günler arası analizler yapılmıştır. Kaynaklara göre, biyolojik materyal analizlerinde doğruluk ve kesinlik için kabul edilebilirlik kriteri % 15'dir (85-88). Tablo 4.35 ve 4.36'da görüldüğü gibi, ROS ve MET için BSS ve bağıl hata değerlerinin % 15'in çok daha altında olması geliştirilen yöntemin doğruluğunun ve kesinliğinin yüksek olduğunu göstermiştir.

### Geri Kazanım

ROS ve MET'in plazmadan geri kazanım çalışmaları, Bölüm 3.14.3'de anlatıldığı gibi, üç farklı derişim seviyesinde, bağıl ve mutlak geri kazanım olmak üzere iki şekilde hesaplanmıştır (86). ROS için bağıl geri kazanım % 100.02-105.00, MET için % 103.88-105.64 aralığında bulunmuştur. Mutlak geri kazanım değerleri

ise ROS için % 98.25-101.33, MET için % 91.48-97.62 aralığındadır (Bkz. Tablo 4.38). Geri kazanım değerlerinin % 100'e yakın ve BSS'lerinin düşük olması geliştirilen yöntemin doğruluğunu, kesinliğini ve ekstraksiyon veriminin yüksek olduğunu göstermektedir.

### **Özgünlük (Seçicilik)**

ROS ve MET'in plazmadan analizi için geliştirilen HPLC yönteminde, yöntemin seçiciliğinin kanıtlanması amacıyla boş plazma, standartlar eklenmiş plazma ve hastadan alınan plazma örneğinin kromatogramları karşılaştırılmıştır. Şekil 4.16'da görüldüğü gibi, boş plazmada ROS, MET ve VER'in alıkonma zamanlarında herhangi bir pik yoktur. Maddeler biyolojik matriksle herhangi bir etkileşim olmadan zeminden ve birbirlerinden tam olarak ayrılmıştır. Bu durum yöntemin özgün olduğunu göstermektedir.

### **Sağlamlık ve Tutarlılık**

Yöntemin sağlamlık çalışmalarında, yöntem parametrelerinde yapılan küçük değişiklikler sonucunda ROS ve MET'in miktar tayinlerinin etkilenip etkilenmediği araştırılmıştır. Gradient elüsyonda başlangıç asetonitril oranı, tampon pH'ı, tampon derişimi ve akış hızı değiştirilmiş, her bir değişiklikte elde edilen analiz sonuçları optimum koşullarda bulunan analiz sonuçları ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (Bkz. Tablo 4.39). Geliştirilen yöntemin optimum koşullarındaki küçük değişikliklerin ROS ve MET'in analiz sonuçlarını etkilemediği yapılan t testi sonucunda ortaya çıkmıştır ( $p>0.05$ ) (83).

Tutarlılık çalışmaları için ise, farklı iki analizci tarafından hazırlanan çözeltilerin analizleri yapılmıştır. Her iki analizci bulgularının istatistiksel olarak farklı olmadığı yapılan t testi sonucunda saptanmıştır ( $p>0.05$ ) (Bkz. Tablo 4.40) (83). Bu sonuçlara göre biyolojik materyal analizi için geliştirilen HPLC yönteminin sağlam ve tutarlı olduğuna karar verilmiştir.

### **5.3.4. Yöntemin Gerçek Örneklerle Uygulanması**

Geliştirilen bir yöntem gerçek örneklerle uygulanmadan tam olarak valide edilmiş sayılamaz. Yöntemin pratikte kullanılabilirliğinin, özgün ve yeterince duyarlı olduğunun kanıtlanabilmesi açısından gerçek örneklerle çalışmalar yapmak tek yoldur (86).

Bu amaçla, ROS ve MET'in plazmadan aynı anda analizi için geliştirilen HPLC yöntemi, bu maddeleri içeren ilaçları kullanan hastaların kanlarının (plazma) analizine uygulanmıştır. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Endokrinoloji Ünitesi'nde tedavi görmekte olan 14 diyabet hastasından alınan kanlar bekletilmeden Bölüm 3.14.2'de anlatıldığı gibi işlemlerden geçirildikten sonra geliştirilen HPLC yöntemi ile analiz edilmiştir. En az iki aydır günde 3 defa 4 mg ROS içeren Avandia® ve 850 mg MET içeren Glucophage® ilaçlarını kullanmakta olan hastalarda bu ilaçların düzeyleri “*steady state*” durumundadır. Tablo 4.41'de verilen sonuçlardan görüldüğü gibi, ROS ve MET'in plazma derişimleri sırasıyla 121.99 - 302.34 ng mL<sup>-1</sup> ve 1048.27 - 2367.55 ng mL<sup>-1</sup> aralığında bulunmuştur. Bu sonuçlar geliştirilen yöntemin tayin sınırları içerisinde. Ayrıca bulunan plazma derişimi ortalamaları (ROS için 226.50 ± 15.97 ng mL<sup>-1</sup>, MET için 1744.59 ± 108.48 ng mL<sup>-1</sup>) kaynaklardaki aynı dozda ROS ve MET alımında bulunan C<sub>maks</sub> değerleri ile uyushmaktadır (ROS için 242 ng mL<sup>-1</sup>, MET için 1500-2000 ng mL<sup>-1</sup>) (2). Sonuç olarak, geliştirilen HPLC yönteminin ROS ve MET ilaçlarını kullanan hastaların kanlarında (plazma) bu maddelerin analizine uygulanabilirliği kanıtlanmıştır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, diyabet tedavisinde kombine şekilde yaygın olarak kullanılan ROS ve MET'in farmasötik preparatlardan ve biyolojik materyalden aynı anda analizi için CZE ve HPLC yöntemleri geliştirilmiştir.

Geliştirilen CZE yönteminde, en uygun koşullar 25 mM pH 4.0 asetat tamponu, 50 mbar basınçla 3 sn hidrodinamik enjeksiyon, 25 kV voltaj uygulaması, 25 °C kapiler sıcaklığı ve 203 nm dedektör dalga boyu olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda ROS, MET ve VER (İS) için göç zamanları sırasıyla 6.20 dk, 7.79 dk ve 8.49 dk olarak bulunmuştur.

Farmasötik preparat analizi için geliştirilen HPLC yönteminde ise, fenil kolon (250 x 4.6 mm i.ç., 5 µm) ile asetonitril:10 mM pH 5.5 fosfat tamponu (70:30 h/h) karışımından oluşan hareketli faz, 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ve UV dedektör (245 nm) kullanılmıştır. ROS, MET ve İS olarak kullanılan VER'in alıkonma zamanları sırasıyla 4.26, 3.33 ve 5.54 dk'dır.

Geliştirilen CZE ve HPLC yöntemlerinin validasyon parametreleri değerlendirilmiş ve geçerlilikleri kanıtlanmıştır. Valide edilen yöntemler, yurtdışı piyasalarında bulunan ROS ve MET'i bir arada içeren farmasötik preparatların analizine başarıyla uygulanmıştır.

ROS ve MET'in aynı anda analizi için kaynaklarda bulunan tek yöntem olan HPLC yönteminde (53), ROS ve MET için iyi bir ayırım sağlanamamaktadır. Ayrıca, bu yöntemde örnek ve hareketli faz hazırlama aşamaları oldukça karmaşık ve zaman alıcıdır. Üstelik, validasyon parametrelerinin bir kısmı değerlendirilmemiştir. Tez kapsamında geliştirilen yöntemler kararlılık, doğrusalılık, duyarlılık, doğruluk, kesinlik, özgünlük, sağlamlık ve tutarlılık gibi validasyon parametreleri açısından iyi performans göstermelerinin yanısıra, basit ve hızlı birer yöntem olmaları nedeniyle kaynaktaki yönteme alternatif olarak sunulmaktadır. Geliştirilen CZE yöntemi makale haline getirilerek *Analytica Chimica Acta* dergisinde yayınlanmıştır (62).

ROS ve MET'in biyolojik materyalden analizi için geliştirilen HPLC yönteminde, aynı fenil kolonda, asetonitril ve 5 mM sodyum asetat (pH 5.5) içeren hareketli faz kullanılarak Tablo 3.1'de verilen basamaklı gradient elüsyon ile ayırım sağlanmıştır. ROS ve MET'in plazmadan aynı anda analizinde asetonitrille çöktürme

işlemi uygulanmıştır. Bu koşullarda, çok farklı özelliklere sahip bu iki maddenin aynı anda analizi başarıyla gerçekleştirilebilmiştir. Analiz süresi 10 dk'nın altındadır.

Geliştirilen yöntemin validasyon çalışmalarının sonuçları, kaynaklarda biyolojik materyal analizleri için belirtilen geçerlilik kriterlerine uygundur. Valide edilen yöntemle, tedavilerinde ROS ve MET'i bir arada kullanan 14 diyabet hastasından sağlanan kanlar analiz edilebilmiştir. Yöntemin doğrusallık aralığının ROS ve MET'in plazmadaki seviyelerinin tayini için yeterli olduğu görülmüştür. Analiz sonuçları, kaynaklarda verilen sonuçlarla da uyumludur. Böylelikle, geliştirilen yöntemin gerçek numunelere uygulanabilirliği kanıtlanmıştır.

Bu çalışma, ROS ve MET'in biyolojik materyalden aynı anda analizi için geliştirilen ilk ve tek yöntemdir. Yöntemin doğruluğu, kesinliği, seçiciliği ve sağlamlılığının yanı sıra kısa analiz süresi, kolay ve hızlı örnek hazırlama işlemi nedeniyle kaynaklardaki önemli bir boşluğu dolduracağı düşünülmektedir. Geliştirilen HPLC yöntemi ile ROS ve MET'i bir arada kullanan hastaların kanlarının analizinde, ikinci bir sisteme ihtiyaç duyulmadan güvenilir sonuçlar elde edilebilecek, bu sayede ROS ve MET için yapılacak terapötik çalışmalara da katkıda bulunulabilecektir.

**KAYNAKLAR**

1. Bell, D.S., Type 2 diabetes mellitus: What is the optimal treatment regimen?, *Am. J. Med.*, 116, 23-29, 2004.
2. Wellington, K., Rosiglitazon/Metformin, *Drugs*, 65(11), 1581-1592, 2005.
3. Rosak, C., Petzoldt, R., Wolf, R., Reblin, T., Dehmel, B., Seidel, D., Rosiglitazone plus metformin is effective and well tolerated in clinical practice: Results from large observational studies in people with type 2 diabetes, *Int. J. Clin. Pract.*, 59(10), 1131-1136, 2005.
4. Bailey, C.J., Bagdonas, A., Rubes, J., McMorn, S.O., Donaldson, J., Biswas, N., Steward, M.W., Rosiglitazon/Metformin fixed-dose combination compared with uptitrated metformin alone in type 2 diabetes mellitus: A 24-week, multicenter, randomized, double blind, parallel-group study, *Clin. Ther.*, 27 (10), 1548-1561, 2005.
5. Del Prato, S., Volpe, L., Rosiglitazone plus metformin: Combination therapy for type 2 diabetes, *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 5 (6), 1411-1422, 2004.
6. Muxlow, A., Fowles, S., Russell, P., Automated high performance liquid chromatography method for the determination of rosiglitazone in human plasma, *J. Chromatogr. B:Biomed. Sci. Appl.*, 752 (1), 77-84, 2001.
7. Mamidi R.N.V.S., Chaluvadi, M.R., Benjamin, B., Ramesh, M., Katneni, K., Babu, A.P., Bhanduri, J., Rao, N.M.U., Rajagopalan, R., HPLC method for the determination of rosiglitazone in human plasma and its application in a clinical pharmacokinetic study, *Arzneimittel-Forsch.*, 52 (7), 560-564, 2002.
8. Radhakrishna, T., Satyanarayana, J., Satyanarayana, A., LC determination of rosiglitazone in bulk and pharmaceutical formulation, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 29 (5), 873-880, 2002.
9. Mamidi R.N.V.S., Benjamin, B., Ramesh, M., Srinivas, N.R., Simple method for the determination of rosiglitazone in human plasma using a commercially available internal standard, *Biomed. Chromatogr.*, 17 (6), 417-420, 2003.

10. Kolte, B.L., Raut, B.B., Deo, A.A., Bagool, M.A., Shinde, D.B., Liquid chromatographic method for the determination of rosiglitazone in human plasma, *J. Chromatogr. B*, 788 (1), 37-44, 2003.
11. Hruska, M.W., Frye, R.F., Simplified method for determination of rosiglitazone in human plasma, *J. Chromatogr. B*, 803 (2), 317-320, 2004.
12. Gomes, P., Sippel, J., Jablonski, A., Stepe, M., Determination of rosiglitazone in coated tablets by MEKC and HPLC methods, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 36 (4), 909-913, 2004.
13. Pedersen, R.S., Broesen, K., Nielsen, F., HPLC method for determination of rosiglitazone in plasma, *Chromatographia*, 62 (3/4), 197-201, 2005.
14. Lin, Z. J., Desai-Krieger, D., Shum, L., Simultaneous determination of glipizide and rosiglitazone unbound drug concentrations in plasma by equilibrium dialysis and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, 801 (2), 265-272, 2004.
15. Ho, E.N.M., Yiu, K.C.H., Wan, T.S.M., Steward, B.D., Watkins, K.L., Detection of antidiabetics in equine plasma and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, 811 (1), 65-73, 2004.
16. Chou, C.C., Lee, M.R., Cheng, F.C., Yang, D.Y, Solid-phase extraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determination of trace rosiglitazone in urine, *J. Chromatogr. A*, 1097 (1-2), 74-83, 2005.
17. Sane, R.T., Francis, M, Moghe, A., Khedkar, S., Anerao, A., High performance thin layer chromatographic determination of rosiglitazone in its dosage form, *J. Planar Chromatogr.-Modern TLC*, 15 (3), 192-195, 2002.
18. Gumieniczek, A., Berecka, A., Hopkala, H., Mroczek, T., Rapid HPTLC determination of rosiglitazone in pharmaceutical formulations, *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.*, 26 (19), 3307-3314, 2003.
19. Gayatri, S., Shantha, A., Vaidyalingam, V., Simultaneous HPTLC determination of gliclazide and rosiglitazone in tablets, *Indian J. Pharm. Sci.*, 65 (6), 663-665, 2003.

20. Jamali, B., Theill, G.C., Sørensen, L.L., Generic, highly selective and robust capillary electrophoresis method for separation of a racemic mixture of glitazone compounds, *J. Chromatogr. A*, 1049 (1-2), 74-83, 2005.
21. Sankar, D.G., Kumar, J.M.R., Reddy, M.V.V.N., UV spectrophotometric methods for the determination of antidiabetic drugs., *Asian J. Chem.*, 16 (1), 537-539, 2004.
22. Lennard, M.S., Casey, C., Tucker, G.T., Woods, H.F., Determination of metformin in biological samples, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 6 (2), 183-185, 1978.
23. Sane, R.T., Banavalikar, V.J., Bhate, V.R., Nayak, V.G., Gas chromatographic determination of metformin hydrochloride from pharmaceutical preparations, *Indian Drugs*, 26 (11), 647-648, 1989.
24. Charles, B.G., Jacobsen, N.W., Ravenscroft, P.T., Rapid liquid chromatographic determination of metformin in plasma and urine, *Clin. Chem. (Washington DC, US)*, 27 (3), 434-436, 1981.
25. Huupponen, R., Ojala-Karlsson, P., Rouru, J., Koulu, M., Determination of metformin in plasma by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.: Biomed. Appl.*, 583 (2), 270-273, 1992.
26. Yuen, K.H., Peh, K.K., Simple high performance liquid chromatographic method for the determination of metformin in human plasma, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, 710 (1-2), 243-246, 1998.
27. Vesterqvist, O., Nabbie, F., Swanson, B., Determination of metformin in plasma by high performance liquid chromatography after ultrafiltration, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, 716 (1-2), 299-304, 1998.
28. Tache, F., David, V., Farca, A., Medvedovici, A., HPLC-DAD determination of metformin in human plasma using derivatization with p-nitrobenzoyl chloride in a biphasic system, *Microchem. J.*, 68 (1), 13-19, 2001.
29. Vasudevan, M., Ravi, J., Ravisankar, S., Suresh, B., Ion-pair liquid chromatography technique for the estimation of metformin in its multicomponent dosage forms, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 25 (1), 77-84, 2001.

30. Cheng, C.L., Chou, C.H., Determination of metformin in human plasma by high performance liquid chromatography with spectrophotometric detection, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, 762 (1), 51-58, 2001.
31. Zhang, M., Moore, G.A., Lever, M., Gardiner, S.J., Kirkpatrick, C.M.J., Begg, E.J., Rapid and simple high performance liquid chromatographic assay for the determination of metformin in human plasma and breast milk, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 766 (1), 175-179, 2002.
32. Kolte, B.L., Raut, B.B., Deo, A.A., Bagool, M.A., Shinde, D.B., Simultaneous determination of metformin in its multicomponent dosage forms with glipizide and gliclazide using micellar liquid chromatography, *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.*, 26 (7), 1117-1133, 2003.
33. Zarghi, A., Foroutan, S.M., Shafaati A., Khoddam, A., Rapid determination of metformin in human plasma using ion-pair HPLC, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 31 (1), 197-200, 2003.
34. AbuRuz, S., Millership, J., McElnay, J., Determination of metformin in plasma using a new ion pair solid phase extraction technique and ion pair liquid chromatography, *J. Chromatogr. B*, 798 (2), 203-209, 2003.
35. Kolte, B.L., Raut, B.B., Deo, A.A., Bagool, M.A., Shinde, D.B., Simultaneous high performance liquid chromatographic determination of pioglitazone and metformin in pharmaceutical dosage form, *J. Chromatogr. Sci.*, 42, 27-31, 2004.
36. Feng, S.Y., Lai, E.P.C., Dabek-Zlotorzynska, E., Sadeghi, S., Molecularly imprinted solid phase extraction for the screening of antihyperglycemic biguanides, *J. Chromatogr. A*, 1027 (1-2), 155-160, 2004.
37. AbuRuz, S., Millership, J., McElnay, J., The development and validation of liquid chromatography method for the simultaneous determination of metformin and glipizide, gliclazide, glibenclamide or glimiperide in plasma, *J. Chromatogr. B*, 817 (2), 277-286, 2005.
38. Amini, H., Ahmadiani, A., Gazerani, P., Determination of metformin in human plasma by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 824 (1-2), 319-322, 2005.

39. AbuRuz, S., Millership, J., McElnay, J., Dried blood spot liquid chromatography assay for therapeutic drug monitoring of metformin, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 832 (2), 202-207, 2006.
40. Juan, J.J., Feng, F., Ma, M., Zhang, X.Z., Study on a new precolumn derivatization method in the determination of metformin hydrochloride, *J. Chromatogr. Sci.*, 44 (4), 193-199, 2006.
41. Heinig, K., Bucheli, F., Fast liquid chromatographic-tandem mass spectrometric (LC-MS-MS) determination of metformin in plasma samples, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 34 (5), 1005-1011, 2004.
42. Chen, X., Gu, Q., Qui, F., Zhong, D., Rapid determination of metformin in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry method, *J. Chromatogr. B*, 802 (2), 377-381, 2004.
43. Wang, Y., Tang, Y., Gu, J., Fawcett, J.P., Bai, X., Rapid and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the quantitation of metformin in human plasma, *J. Chromatogr. B*, 808 (2), 215-219, 2004.
44. Koseki, N., Kawashita, H., Niina, M., Nagae, Y., Masuda, N., Development and validation for high selective quantitative determination of metformin in human plasma by cation exchanging with normal phase LC/MS/MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 36 (5), 1063-1072, 2005.
45. Zhong, G., Bi, H., Zhou, S., Chen, X., Huang, M., Simultaneous determination of metformin and gliclazide in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Application to a bioequivalence study of two formulations in healthy volunteers, *J. Mass Spectr.*, 40 (11), 1462-1471, 2005.
46. Song, J.Z., Chen, H.F., Tian, S.J., Sun, Z.P., Determination of metformin in plasma by capillary electrophoresis using field-amplified sample stacking technique, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, 708 (1-2), 277-283, 1998.
47. El-Khateeb, S.Z., Assaad, H.N., El-Bardicy, M.G., Ahmad, A.S., Determination of metformin hydrochloride in tablets by nuclear magnetic resonance spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, 208, 321-324, 1988.

48. El-Bardicy, M.G., El-Khateeb, S.Z., Ahmad, A.K.S., Assaad, H.N., Spectrophotometric determination of metformin via charge-transfer complex with iodine, *Spect. Letters*, 22 (9), 1173-1181, 1989.
49. Hassan, S.S.M., Mahmoud, W.H., Elmosallamy, M.A.F., Othman, A.H.M., Determination of metformin in pharmaceutical preparations using potentiometry, spectrofluorimetry and UV-visible spectrophotometry, *Anal. Chim. Acta*, 378 (1-3), 299-311, 1999.
50. Ashour, S., Kabbani, R., Direct spectrophotometric determination of metformin hydrochloride in pure form and in drug formulations, *Anal. Letters*, 36 (2), 361-370, 2003.
51. Wang, Z., Zhang, Z., Fu, Z., Luo, W., Zhang, X., Sensitive flow injection chemiluminescence determination of metformin based on N-bromosuccinimide-fluorescein system, *Anal. Letters*, 36 (12), 2683-2697, 2003.
52. He, C., Zhang, Z., He, D., Xiong, Y., Chemiluminescence determination of metformin based on hydroxyl radical reaction and molecularly imprinted polymer on-line enrichment, *Anal. Bioanal. Chem.*, 385 (1), 128-133, 2006.
53. Kolte, B.L., Raut, B.B., Deo, A.A., Bagool, M.A., Shinde, D.B., Simultaneous determination of metformin in combination with rosiglitazone by reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. Sci.*, 42, 70-73, 2004.
54. Kayaalp, S.O., Oral Antidiyabetik İlaçlar, "Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji" Cilt 3, 10. Baskı, Hacettepe Taş Kitapçılık Ltd. Şti., Ankara, s. 1198-1206, 2002.
55. Physicians' Desk Reference (PDR), 57<sup>th</sup> Edition, Thomson PDR, 2003.
56. Malinowski, J.M., Bolesta, S., Rosiglitazone in the treatment of type 2 diabetes mellitus: A critical review, *Clin. Ther.*, 22 (10), 1151-1168, 2000.
57. Wagstaff, A.J., Goa, K.L., Rosiglitazone: A review of its use in the management of type 2 diabetes mellitus, *Drugs*, 62 (12), 1805-1837, 2002.
58. Freed, M.I., Allen, A., Jorkasky, D.K., DiCicco, R.A., Systematic exposure to rosiglitazone is unaltered by food, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 55, 53-56, 1999.

59. Davidson, M.B., Peters, A.L., An overview of metformin in the treatment of type 2 diabetes mellitus, *Am. J. Med.*, 102, 99-110, 1997.
60. Tucker, G.T., Casey, C., Philips, P.J., Connor, H., Ward, J.D., Woods, H.F., Metformin kinetics in healthy subjects and in patients with diabetes mellitus, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 12, 235-246, 1981.
61. Setter, S.M., Iltz, J.L., Thams, J., Campbell, R.K., Metformin hydrochloride in the treatment of type 2 diabetes mellitus: A clinical review with a focus on dual therapy, *Clin. Ther.*, 25 (12), 2991-3026, 2003.
62. Yardımcı, C., Özaltın, N., Method development and validation for the simultaneous determination of rosiglitazone and metformin in pharmaceutical preparations by capillary zone electrophoresis, *Anal. Chim. Acta*, 549 (1-2) 88-95, 2005.
63. Skoog, D., Holler, F.J., Nieman, T.A., *Enstrümental Analiz İlkeleri*, Çeviri Editörleri: Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H., Bilim Yayıncılık, Ankara, 1998.
64. Baker, D.R., *Capillary Electrophoresis*, Wiley and Sons, 1995.
65. Holland, L.A., Chetwyn, N.P., Perkins, M.D., Lunte, S.M., Capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis, *Pharm. Research*, 14 (4), 372-387, 1997.
66. Smith, N.W., Evans, M.B., Capillary zone electrophoresis in pharmaceutical and biomedical analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 12 (5), 579-611, 1994.
67. Rabanal, B., De Paz, E., Walser, N., Negro, A., Operating parameter effects in capillary zone electrophoresis (CZE): Analysis of pentamidine, hydroxystilbamidine, propamidine, dapi, and stilbamidine in body fluids, *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.*, 24 (1), 29-45, 2001.
68. Li, S.F.Y., *Capillary Electrophoresis: Principles, Practice and Applications*, Journal of Chromatography Library Volume 52, Elsevier Science Publishers, Netherlands, 1992.
69. Sewell, P.A., Clarke, B., Kealey, D., *Chromatographic Separations*, John Wiley & Sons, Great Britain, 1987.

70. Hamilton, R.J., Sewell, P.A., Introduction to high performance liquid chromatography, Second Edition, Chapman and Hall, USA, 1982.
71. Bidlingmeyer, B.A., Practical HPLC Methodology and Applications, John Wiley & Sons, USA, 1992.
72. Meyer, V.R., Practical high performance liquid chromatography, John Wiley & Sons, USA, 1988.
73. Snyder, L.R., Glajch, J.L., Kirkland J.J., Practical HPLC Method Development, John Wiley & Sons, USA, 1988.
74. Horvath, C., Melander, W., Molnar, I., Molnar, P., Enhancement of retention by ion-pair formation in liquid chromatography with nonpolar stationary phases, *Anal. Chem.*, 49 (14), 2295-2305, 1977.
75. Krstulovic, A.M., Brown, P.R., Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography: Theory, Practice and Biomedical Applications, John Wiley & Sons, USA, 1982.
76. Yıldız, A., Genç, Ö., Bektaş, S., Enstrümental Analiz Yöntemleri, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 1997.
77. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of Analytical Procedures: Methodology, ICH Harmonised Tripartite Guideline, 1996.
78. Green, J.M., A practical guide to analytical method validation, *Anal. Chem.*, 68, 305A-309A, 1996.
79. Fabre, H., Altria, K., Validating CE methods for pharmaceutical analysis, *LC-GC*, 302-310, 2001.
80. Shabir, G.A., Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization, *J. Chromatogr. A*, 987, 57-66, 2003.

81. Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods, Center of Drug Evaluation and Research (CDER), US Food and Drug Administration, 1994.
82. Sümbüloğlu, K., Sümbüloğlu, V., Biyoistatistik, 7. Baskı, Hatipoğlu Yayınevi, Ankara, s. 191-197, 1997.
83. Miller, J.C., Miller, J.N., Statistics for Analytical Chemistry, Third Edition, Ellis Horwood Limited, 1993.
84. Chamberlain, J., The analysis of drugs in biological fluids, Second Edition, CRC Press, 1995.
85. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration Center, Center of Drug Evaluation and Research (CDER), Center of Veterinary Medicine (CVM), May 2001.
86. Causon, R., Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: Viewpoint and discussion, J. Chromatogr. B, 689, 175-180, 1997.
87. Braggio, S., Barnaby, R.J., Grossi, P., Cugola, M., A strategy for validation of bioanalytical methods, J. Pharm. Biomed. Anal., 14, 375-388, 1996.
88. Bressolle, F., Bromet-Petit, M., Audran M., Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods: Applications to pharmacokinetics, J. Chromatogr. B, 686, 3-10, 1996.
89. Hartmann, C., Smeyers-Verbeke, J., Massart, D.L., McDowall, R.D., Validation of bioanalytical chromatographic methods, J. Pharm. Biomed. Anal., 17, 193-218, 1998.
90. Harrold, M.P., Wajtusik, M.J., Riviello, J., Henson, P., Parameters influencing separation and detection of anions by capillary electrophoresis, J. Chromatogr. 640, 463-471, 1993.
91. Mayer, B.X., How to increase precision in capillary electrophoresis, J. Chromatogr. A, 907 (1-2), 21-37, 2001.
92. Altria, K.D., Fabre, H., Approaches to optimisation of precision in capillary electrophoresis, Chromatographia, 40, 313-320, 1995.

93. The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, 20<sup>th</sup> Edition, Merck & Co. Inc., Rahway, N.J., USA, 1989.
94. Vander Heyden, Y., Nijhuis, A., Smeyers-Verbeke, J., Vandeginste, B.G.M., Massart, D.L., Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 24, 723-753, 2001.
95. Yang, M., Fazio, S., Munch, D., Drumm, P., Impact of methanol and acetonitrile on separations based on  $\pi$ - $\pi$  interactions with a reversed-phase phenyl column, *J. Chromatogr. A*, 1097, 124-129, 2005.
96. Marchand, D.H., Croes, K., Dolan, J.W., Synder, L.R., Henry, R.A., Kallury, K.M.R., Waite, S., Carr, P.W., Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography VIII. Phenylalkyl and fluoro-substituted columns, *J. Chromatogr. A*, 1062, 65-78, 2005.
97. Croes, K., Steffens, A., Marchand, D.H., Synder, L.R., Relevance of  $\pi$ - $\pi$  and dipole-dipole interactions for retention on cyano and phenyl columns in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1098 (1-2), 123-130, 2005.
98. Dai, J., Carr, P.W., Role of ion pairing in anionic additive effects on the separation of cationic drugs in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1072, 169-184, 2005.
99. Lim, C.K., Peters, T.J., Ammonium acetate: A general purpose buffer for clinical applications of high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 316, 397-406, 1984.
100. Roberts, J.M., Diaz, A.R., Fortin, D.T., Friedle, J.M., Piper, S.D., Influence of the Hofmeister series on the retention of amines in reversed-phase liquid chromatography, *Anal. Chem.*, 74, 4927-4932, 2002.

## EKLER

## EK 1. Etik Kurul İzni



T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
Tıp Fakültesi  
Tıbbi, Cerrahi ve İlaç Araştırmaları Etik Kurulu

Sayı : B.30.2.HAC.0.01.00.05/1006  
Konu :

17.10.2005

## ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Görüşme Tarihi : 14.10.2005 Cuma  
Toplantı No : 2005/8  
Proje No : LUT 05/73  
Karar No : LUT 05/73 – 10

Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr. Nuran Özaltın'ın sorumlu araştırmacısı olduğu, Arş.Gör.Ecz. Ceren Yardımcı'nın yüksek lisans uzmanlık tezi olan LUT 05/73 kayıt numaralı ve "*Rosiglitazon ve Metformin'in Kapiler Elektroforez ve Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Yöntemleri ile Farmasötik Preparatlardan ve Biyolojik Materyalden Aynı Anda Analizi*" konulu proje önerisi kurulumuzda değerlendirilmiş, tıbbi etik açıdan uygun bulunmuştur.

1. Prof.Dr. E. Rüştü Onur (Başkan)
2. Prof.Dr. Sema Özer (Üye)
3. Prof.Dr. M. Emin Şenocak (Üye)
4. Prof.Dr. Meral Kanbak (Üye)
5. Prof.Dr. Türkan Eldem (Üye)
6. Prof.Dr. Gökhan Gedikoğlu (Üye)
7. Prof.Dr. Erdem Aydın (Üye)
8. Prof.Dr. Ediz Demirpençe (Üye)
9. Doç.Dr. Alev Türker (Üye)
10. Doç.Dr. Ümit Yaşar (Üye)
11. Avukat Serpil Besni (Üye)

## **EK 2. 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**

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

### **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

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

$\mu$  : Evren ortalaması

$\bar{X}$  : Örneklem ortalaması

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

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

### EK 3. Tez İçinde Kullanılan İstatistiksel Testler

#### Korrelasyon Katsayısı Önem Kontrolü

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

1.  $H_0$ : Korrelasyon 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: Korrelasyon katsayısı,

$S_r$ : Korrelasyon 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 ) Korrelasyon katsayısı önemli bir değerdir, tesadüfen bulunmuş bir değer değildir (t=hesaplanan değer,  $p<0.05$ ).

b) Korrelasyon 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 - RSD

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

( $F=\text{Hesaplanan değer}$ ,  $p<0.05$ ).

b) Derişim ile dedektör cevabı arasındaki ilişki doğrusal değildir

( $F=\text{Hesaplanan değer}$ ,  $p>0.05$ ).

### t Testi

İki ortalama arasında fark olup olmadığını test eder.

$$s^2 = [(n_1-1) s_1^2 + (n_2-1) s_2^2] / (n_1 + n_2 - 2)$$

$$t = ( \bar{x}_1 - \bar{x}_2 ) / s \sqrt{(1/n_1 + 1/n_2)}$$

$n_1$ : 1.yöntemin ölçüm sayısı       $n_2$ : 2.yöntemin ölçüm sayısı

$s_1$ : 1. yöntemin standart sapması       $s_2$ : 2.yöntemin standart sapması

$\bar{x}_1$ : 1. yöntemin ortalaması       $\bar{x}_2$ : 2.yöntemin ortalaması

Serbestlik derecesi=  $n_1 + n_2 - 2$

1.  $H_0$  = İki ortalama arasında fark yoktur.

2.  $\alpha=0.05$  yanılma düzeyinde ve  $n_1 + n_2 - 2$  serbestlik derecesindeki tablo t değerine bakılır.

3. Karşılaştırma: Hesapla bulunan t değeri tablo t değerinden büyükse  $H_0$  hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.

4. Karar: a) Ortalamalar arasında fark yoktur ( $t = \text{Hesaplanan değer}, p > 0.05$ ).

b) Ortalamalar arasında fark vardır ( $t = \text{Hesaplanan değer}, p < 0.05$ ).

## 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)

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

d) Etkileşim (hata) kareler toplamı  $\Rightarrow HKT = GnKT - GAKT - DAKT$

2. Serbestlik derecelerinin bulunması

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

b) Gruplar arası serbestlik derecesi  $\Rightarrow GASD = k - 1$

c) Denekler arası serbestlik derecesi  $\Rightarrow DASD = n_j - 1$

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

3. Kareler ortalamasının bulunması

a) Gruplar arası kareler ortalaması  $\Rightarrow GAKO = GAKT / GASD$

b) Denekler arası serbestlik derecesi  $\Rightarrow DAKO = DAKT / DASD$

c) Hata kareler ortalaması  $\Rightarrow HKO = HKT / HSD$

4.  $H_0$  = Yöntemler arasında fark yoktur.

$H_1$  = En az bir ölçüm diğerlerinden farklıdır.

5. Yanılma olasılığı  $p = 0.05$  seçilmiştir.

6.  $F = GAKO / HKO$

7.  $\alpha = 0.05$  düzeyinde GASD 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 ( $F = \text{Hesaplanan değer}$ ,  $p > 0.05$ ) veya yöntemlerden en az biri farklıdır ( $F = \text{Hesaplanan değer}$ ,  $p < 0.05$ ).

## ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında Ankara’da doğdum. Ankara Anadolu Lisesi Fransızca Bölümü’nü bitirdikten sonra girdiğim Orta Doğu Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü’nden 1997 yılında mezun oldum. Aynı yıl Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisans programına başladım. 2000 yılında “Lansoprazol’ün Elektrokimyasal Davranışları ve İlaçlardan Polarografik Yöntemle Analizi” adlı tez çalışmamla yüksek lisans eğitimimi tamamladım. Halen aynı bölümde araştırma görevlisi olarak görev yapmaktayım.