

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ETODOLAK VE TİYOKOLŞİKOSİD
KOMBİNASYONUNUN TERS FAZ SIVI
KROMATOĞRAFİ YÖNTEMİ İLE MİKTAR ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Neşe ŞİRİN

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Enstitü Bilim Dalı : ANALİTİK KİMYA

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Aysel KÜÇÜK TUNCA

Mayıs 2016

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ETODOLAK VE TİYOKOLŞİKOSİD
KOMBİNASYONUNUN TERS FAZ SIVI
KROMATOĞRAFİ YÖNTEMİ İLE MİKTAR ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Neşe ŞİRİN

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA
Enstitü Bilim Dalı : ANALİTİK KİMYA

Bu tez 16. /05/ 2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği / oyçokluğu ile kabul edilmiştir.


Yrd. Doç. Dr.
Aysel K. TUNCA
Jüri Başkanı


Doç. Dr.
İlkay ŞİŞMAN
Üye


Yrd. Doç. Dr.
Sezen SİVRİKAYA
Üye

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Neşe ŞİRİN

26.04.2016

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her konuda bilgi ve desteğini almaktan çekinmediğim, araştırmanın planlanmasından yazılmasına kadar tüm aşamalarında yardımlarını esirgemeyen, teşvik eden, aynı titizlikte beni yönlendiren değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Aysel KÜÇÜK TUNCA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında, gösterdikleri destek ve anlayıştan dolayı Mustafa Nevzat İlaç Sanayi A.Ş. Araştırma ve Geliştirme Bölümü Analitik Geliştirme Birimi Müdürü Sayın Dr. Ayşegül ALEV TUNCA'ya ve Takım Liderim Sayın Gülnur KÖSE'ye,

Bütün yaşantım sırasında bana her türlü konuda destek olan sevgili aileme teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
TABLolar LİSTESİ	xi
ÖZET	xiii
SUMMARY	xiv

BÖLÜM 1.

GİRİŞ	1
1.1. İlaç.....	1
1.1.1. İlaçların sınıflandırılması.....	2
1.1.1.1. Farmasötik şekillerine göre ilaçların sınıflandırılması	2
1.1.1.2. Tedavi edici gruplarına göre ilaçların sınıflandırılması	4
1.2. Santral etkili kas gevşeticiler	7
1.2.1. Tiyokolşikosid.....	8
1.3. Narkotik olmayan analjezikler	11
1.3.1. Etodolak	12
1.4. Etotio tablet.....	14

BÖLÜM 2.

GENEL BİLGİLER.....	18
2.1. Biyoeşdeğerlik	18
2.2. Biyoyararlanım	18
2.3. Kromatografi.....	19
2.3.1. Kromatografi'nin temel prensibi ve tanımları	20

2.3.2. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması	22
2.3.2.1. Ayrılma mekanizmalarına göre sınıflandırma.....	23
2.3.2.2. Uygulama tekniğine göre sınıflandırma	28
2.3.2.3. Faz tiplerine göre sınıflandırma	28
2.3.3. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi.....	30
2.3.3.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazı	30
2.3.3.2. YPSK sistem türleri	38
2.3.3.3. YPSK’de ayırma teknikleri.....	39
2.3.3.4. YPSK yönteminin avantajları	39
2.3.3.5. YPSK yönteminin dezavantajları.....	40
2.3.3.6. YPSK’nin uygulama alanları	40
2.3.3.7. Saflaştırma	40
2.3.3.8. Kalitatif analiz.....	40
2.3.3.9. Kantitatif analiz.....	41
2.3.3.10. YPSK metodunun geliştirilmesi.....	41
2.4. Validasyon.....	42
2.4.1. Analitik yöntem validasyonu	43
2.4.1.1. Analitik yöntem validasyonunda kapsam	44
2.4.1.2. Analitik yöntem validasyon aşamaları	44
2.4.1.3. Analitik yöntem validasyon parametreleri	45
2.5. Sistem Uygunluk Testleri.....	50
2.6. Literatürde Yapılan Çalışmaların Özeti.....	62

BÖLÜM 3.

MATERYAL VE YÖNTEM.....	69
3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Materyaller	69
3.1.1. Kullanılan cihazlar	69
3.1.2. Kullanılan cam malzemeler ve diğer sarf malzemeleri.....	70
3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler	70
3.2. Deneyler İçin Gerekli Hazırlıklar	70
3.2.1. Etken maddelerin saflığı	70
3.2.2. Fosfat tampon çözelti hazırlanışı	71

3.2.3. Çözücünün hazırlanması	71
3.2.4. İnsan plazmasının kullanıma hazırlanması	71
3.2.5. Standart çözeltilerin hazırlanması	71
3.2.6. Farmasötik preperat çözeltilerinin hazırlanması	73
3.2.7. Standart ekleme metodunda kullanılan standart çözeltilerin hazırlanması	73
3.2.8. Doğruluk çalışması için gerekli çözeltilerin hazırlanması	73
3.2.9. Plazmalı ortamda standart çözeltilerin hazırlanması	74
3.2.10. Plazmalı ortamda farmasötik preperat çözeltilerinin hazırlanması	75
3.2.11. Plazmalı ortamda standart ekleme metodunda kullanılan standart çözeltilerin hazırlanması	76
3.2.12. Plazmalı ortamda doğruluk çözeltilerinin hazırlanması	76
3.3. Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi	77
3.3.1. YPSK yöntemi ile yapılan çalışmalar	77
3.3.1.1. Yöntemin optimizasyonu	77
3.3.1.2. Kromatografik şartlar	78
 BÖLÜM 4.	
BULGULAR VE TARTIŞMA	81
4.1. Seçicilik	81
4.1.1. Çözücü ortamındaki kromatogramlar ve üç boyutlu spektrumlar	81
4.1.2. Plazma ortamındaki kromatogramlar ve üç boyutlu spektrumlar	85
4.2. Çalışma aralığı	89
4.3. Doğrusallık	89
4.4. Doğruluk	92
4.4.1. Yöntemin plasebo ve standartlarla uygulanması	92
4.4.2. Standart ekleme yöntemi ile elde edilen sonuçlar	94
4.5. Kesinlik	95
4.5.1. Sistem kesinliği	95
4.5.2. Metot kesinliği	95
4.5.3. Gün-içi ve günler-arası kesinlik	96
4.6. LOD ve LOQ	98

4.7. Sistem uygunluk parametreleri	99
4.8. İstatiksel değerlendirmeler	99
BÖLÜM 5.	
SONUÇLAR VE ÖNERİLER	100
KAYNAKLAR.....	104
ÖZGEÇMİŞ	109



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

A_s	: Pik asimetri oranı
A	: Çoklu akış yolları ve Eddy difüzyonu
B	: Boyuna difüzyon
% BH	: % Bağıl hata, doğruluk
C	: Konsantrasyon
C_s	: Maddenin sabit fazdaki konsantrasyonu
C_m	: Maddenin mobil fazdaki konsantrasyonu
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece
cm	: santimetre
DAD	: Diyot Array Dedektör, Diod Dizisi Dedektör
dk	: Dakika
GLC	: Gaz-sıvı kromatografisi
GSC	: Gaz-katı kromatografisi
GB	: Görünür bölge
h	: Hacim
H	: Tabaka yüksekliği (cm)
RP-HPLC	: Reverse Phase-High performance liquid chromatography
ICH	: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı
IUPAC	: International Union of Pure and Applied Chemistry, Uluslararası Kimya Birliği
k'	: Kapasite faktörü
K	: Dağılma (partisyon) katsayısı
L	: Kolon dolgusunun uzunluğu (cm)
L	: Litre
LC	: Sıvı kromatografisi
LOD	: Nitel tayin limiti (tespitsınırı)

LOQ	: Nicel tayin limiti(miktartayinlimiti)
M	: Molarite
mA	: Miliabsorbans
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
μg	: Mikrogram
μm	: Mikrometre
n	: Deneme sayısı
nm	: Nanometre
N	: Teorik tabaka sayısı
ODS	: 18 karbon atomu zincirinden oluşan oktadesilsilan
pH	: Power of hydrogen, Hidrojenin gücü
r	: Korelasyon katsayısı
R^2	: Regresyon katsayısı
RSD	: Bağlı standart sapma
R_s	: Ayırım gücü
RT	: Alıkonma zamanı
rpm	: Dakikadaki devir sayısı, revolution per minute
SD	: Mutlak standart sapma
SS	: Standart sapma
S_M	: Regresyon doğrusu eğiminin standart sapması
S_b	: Regresyon doğrusundaki kaymanın standart sapması
SUT	: Sistem uygunluk testleri
t_R	: Maddenin alıkonma zamanı
t_0	: Hareketli fazing alıkonma zamanı, kolon ölü zamanı
Tb	: Tablet
u	: Çizgisel hız
UV	: Morötesi, ultraviole
V	: Ortalama göç hızı
VIS	: Görünür bölge
V_0	: Hareketli fazing alıkonma hacmi, ölü hacim

V_R	: Maddenin alıkonma hacmi
YPSK	: Yüksek basınçlı (performanslı) sıvı kromatografisi
W	: Pik taban genişliği
X	: Ortalama
α	: Seçicilik katsayısı



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Tiyokolşikosid'in molekül yapısı	8
Şekil 1.2. Etodolak'ın molekül yapısı	13
Şekil 2.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazının şematik gösterimi	31
Şekil 2.2. Kromatogram parametreleri	50
Şekil 2.3. Tek bileşenli bir karışım için tipik bir kromatogram	52
Şekil 2.4. Teorik tabaka sayısı için kromatogram	53
Şekil 2.5. Kapasite faktörü için kromatogram	54
Şekil 2.6. Ayırım gücü için kromatogram	56
Şekil 2.7. Rezolüsyon faktörünün kromatogramlara göre değişimi	57
Şekil 2.8. Van Deemter eğrisi	59
Şekil 2.9. Pik asimetri oranının hesaplanması	59
Şekil 2.10. Temel üç izoterm şekilleri ile alıkonma zamanı ve pik şekline etkileri	60
Şekil 3.1. Tiyokolşikosid'e ait spektrum	78
Şekil 3.2. Etodolak'a ait spektrum	78
Şekil 3.3. Tiyokolşikosid ve Etodolak'ın karşılaştırılmış spektrumları	79
Şekil 4.1. 259 nm'de çözücüye ait kromatogram	81
Şekil 4.2. 259 nm'de çözücüye ait üç boyutlu spektrum	82
Şekil 4.3. 259 nm'de plaseboya ait kromatogram	82
Şekil 4.4. 259 nm'de plaseboya ait üç boyutlu spektrum	82
Şekil 4.5. 400 µg mL ⁻¹ 'lik Etodolak'a ait kromatogram	83
Şekil 4.6. 400 µg mL ⁻¹ 'lik Etodolak'a ait üç boyutlu spektrum	83
Şekil 4.7. 8 µg mL ⁻¹ 'lik Tiyokolşikosid'e ait kromatogram	83
Şekil 4.8. 8 µg mL ⁻¹ 'lik Tiyokolşikosid'e ait üçboyutlu spektrum	84
Şekil 4.9. 8 µg mL ⁻¹ 'lik Tiyokolşikosid ve 400 µg mL ⁻¹ 'lik Etodolak'a ait kromatogram	84

Şekil 4.10. 8 µg mL ⁻¹ 'lik Tiyokolşikosid ve 400 µg mL ⁻¹ 'lik Etodolak'a ait üç boyutlu spektrum.....	84
Şekil 4.11. 8 µg mL ⁻¹ 'lik Tiyokolşikosid ve 400 µg mL ⁻¹ 'lik Etodolak içeren Etotio tablete ait kromatogram.....	85
Şekil 4.12. 8 µg mL ⁻¹ 'lik Tiyokolşikosid ve 400 µg mL ⁻¹ 'lik Etodolak içeren Etotio tablete ait üç boyutlu spektrum	85
Şekil 4.13. 259 nm'de plazma ortamındaki çözücüye ait kromatogram.....	85
Şekil 4.14. 259 nm'de plazma ortamındaki çözücüye ait üç boyutlu kromatogram	86
Şekil 4.15. 400 µg mL ⁻¹ 'lik Etodolak'ın plazma ortamındaki kromatogramı.....	86
Şekil 4.16. 400 µg mL ⁻¹ 'lik Etodolak'ın plazma ortamındaki üç boyutlu spektrumu.....	86
Şekil 4.17. 8 µg mL ⁻¹ 'lik Tiyokolşikosid'in plazma ortamındaki kromatogram ..	87
Şekil 4.18. 8 µg mL ⁻¹ 'lik Tiyokolşikosid'in plazma ortamındaki üç boyutlu spektrumu.....	87
Şekil 4.19. 8 µg mL ⁻¹ 'lik Tiyokolşikosid ve 400 µg mL ⁻¹ 'lik Etodolak'ın plazma ortamındaki kromatogramı	87
Şekil 4.20. 8 µg mL ⁻¹ 'lik Tiyokolşikosid ve 400 µg mL ⁻¹ 'lik Etodolak'ın plazma ortamındaki üç boyutlu spektrumu	88
Şekil 4.21. 8 µg mL ⁻¹ 'lik Tiyokolşikosid ve 400 µg mL ⁻¹ 'lik Etodolak içeren Etotio tabletin plazma ortamındaki kromatogramı	88
Şekil 4.22. 8 µg mL ⁻¹ 'lik Tiyokolşikosid ve 400 µg mL ⁻¹ 'lik Etodolak içeren Etotio tabletin plazma ortamındaki üç boyutlu spektrumu	88
Şekil 4.23. YPSK ile çözücü ortamında, Tiyokolşikosid'in standart çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi	90
Şekil 4.24. YPSK ile plazma ortamında, Tiyokolşikosid'in standart çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi	90
Şekil 4.25. YPSK ile çözücü ortamında, Etodolak'ın standart çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi	91
Şekil 4.26. YPSK ile plazma ortamında, Etodolak'ın standart çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi	91

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1.1. NSAİİ'ların kimyasal yapısına göre sınıflandırması.....	12
Tablo 2.1. Çeşitli yollardan alınan ilaçların emilim hızları	19
Tablo 2.2. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması	22
Tablo 2.3. Ters faz ve normal faz sıvı kromatografilerinin karşılaştırılması.....	25
Tablo 2.4. İlaç analizlerinde yöntemlere göre değişen parametreler	46
Tablo 3.1. Gradient elüsyon	79
Tablo 4.1. Test çözeltisinden elde edilen pik saflığı değerleri.....	89
Tablo 4.2. YPSK sisteminde, çözücü ortamında Tiyokolşikosid standart çözeltilerinden elde edilmiş istatistiksel analiz sonuçları (259 nm'de) (n=6)	92
Tablo 4.3. YPSK sisteminde, çözücü ortamında Etodolak standart çözeltilerinden elde edilmiş istatistiksel analiz sonuçları (259 nm'de)(n=6).....	92
Tablo 4.4. YPSK sisteminde, plazma ortamında Tiyokolşikosid standart çözeltilerinden elde edilmiş istatistiksel analiz sonuçları (259 nm'de) (n=6)	92
Tablo 4.5. YPSK sisteminde plazma ortamında Etodolak standart çözeltilerinden elde edilmiş istatistiksel analiz sonuçları (259 nm'de) (n=6)	92
Tablo 4.6. YPSK sisteminde, çözücü ortamında, Tiyokolşikosid ve Etodolak standart çözeltilerinin geri kazanım değerleri	93
Tablo 4.7. YPSK sisteminde, plazma ortamında, Tiyokolşikosid ve Etodolak standart çözeltilerinin geri kazanım değerleri	93
Tablo 4.8. YPSK sisteminde, çözücü ortamında, standart ekleme yöntemi ile elde edilmiş analiz sonuçları.....	94
Tablo 4.9. YPSK sisteminde, plazma ortamında, standart ekleme yöntemi ile elde edilmiş analiz sonuçları.....	94

Tablo 4.10. Tiyokolşikosid ve Etodolak standart çözeltilerine ait çözücü ortamındaki analiz RSD değerleri (n=6)	95
Tablo 4.11. Tiyokolşikosid ve Etodolak standart çözeltilerine ait plazma ortamındaki analiz RSD değerleri (n=6)	95
Tablo 4.12. Ticari preparat numunelerinin çözücü ortamındaki geri kazanım ve RSD değerleri	96
Tablo 4.13. Ticari preparat numunelerinin plazma ortamındaki geri kazanım ve RSD değerleri	96
Tablo 4.14. YPSK sisteminde, çözücü ortamında Etodolak standart çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası kesinlikve tekrarlanabilirlik analiz sonuçları (n=6)	97
Tablo 4.15. YPSK sisteminde, çözücü ortamında Tiyokolşikosid standart çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası kesinlikve tekrarlanabilirlik analiz sonuçları (n=6)	97
Tablo 4.16. YPSK sisteminde, plazma ortamında Etodolak standart çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası kesinlikve tekrarlanabilirlik analiz sonuçları (n=6)	97
Tablo 4.17. YPSK sisteminde, plazma ortamında Tiyokolşikosid standart çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası kesinlikve tekrarlanabilirlik analiz sonuçları (n=6)	98
Tablo 4.18. YPSK yönteminde, çözücü içerisinde ve plazma ortamında hazırlanmış ticari preparatlar için ($400 \mu\text{g mL}^{-1}$ Etodolak, $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ Tiyokolşikosid) elde edilen ANOVA testi verileri ($\alpha=0,05$, % 95 güvenle) (n=12)	99

ÖZET

Anahtar kelimeler: Etodolak, Tiyokolşikosid, Etotio Tablet, Ters Faz-Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi, Plazma, Validasyon

Bu çalışmanın amacı; aynı tablet formu (Etotio tablet) içerisinde bulunan Etodolak ve Tiyokolşikosid etken maddelerinin her ikisinin bir arada miktar tayini için, bir Ters Faz-Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (TF-YPSK) yöntemi geliştirmektir.

Bu maksatla; çözücü ortamında farmasötik preparattan Etodolak ve Tiyokolşikosid'in aynı anda belirlenmesi için Ters Faz-Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (TF-YPSK) yöntemi kullanılmıştır. Geliştirilen YPSK yöntemi Etodolak ve Tiyokolşikosid'in insan plazması içerisinde in vitro olarak eş zamanlı miktar tayinini gerçekleştirmede de kullanılmıştır. Plazma örnekleri ekstraksiyon işlemine gerek kalmadan TF-YPSK sisteminde analiz edilmiş ve oldukça yüksek geri kazanımlar elde edilmiştir.

Her iki çalışmadan elde edilen verilere tüm validasyon parametreleri uygulanarak, yöntemin güvenilirliği test edilmiştir. Plazma otamında ve çözücü ortamında elde edilen sonuçlar Anova, testiuygulanarak istatistiksel olarak karşılaştırılmışve iki yöntem arasında ortalamalar vestandart sapmalar yönünden % 95 olasılık düzeyinde anlamlı bir fark olmadığıbulunmuştur.

QUANTITATIVE ANALYSIS OF ETODOLAC AND THIOLCHICOSIDE COMBINATION FORMS BY RP-HPLC

SUMMARY

Keywords: Etodolac, Thiocolchicoside, Etotio Tablet, Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography, Plasma, Validation

The aim of this study is to develop a Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) method for simultaneous determination of Etodolac and Thiocolchicoside in the same tablet preparation (Etotio pharmaceutical tablet).

For this purpose RP-HPLC method was used for the simultaneous determination of etodolac and thiocolchicoside from pharmaceutical preparation in a solvent medium. The developed HPLC method was applied for the determination of etodolac and thiocolchicoside in human plasma in-vitro studies. Plasma samples were successfully analyzed by RP-HPLC without using extraction method and high percentage of recoveries were obtained.

All validation parameters were applied to data which were obtained from both studies and method reliability was tested. Results in human plasma and solvent medium compared to each other as a statistical with ANOVA test application and in terms of means and standart deviations there wasn't found any significant difference on %95 probability level between two methods.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

1.1. İlaç

İlaç, canlı hücre üzerinde meydana getirdiği tesir ile bir hastalığın teşhisini, iyileştirilmesi veya belirtilerinin azaltılması amacıyla tedavisini veya bu hastalıktan korunmayı mümkün kılan, canlılara değişik uygulama yöntemleri ile verilen hayvansal, bitkisel, mineral veya sentetik kaynaklardan elde edilen doğal, yarı sentetik veya sentetik kimyasal preparatlardır [1]. Dünya Sağlık Örgütü tanımıyla ilaç, fizyolojik sistemleri veya patolojik durumları insanın yararı için değiştirmek veya incelemek amacıyla kullanılabilen bir maddedir [2].

İlaçlar etken madde ve taşıyıcı madde olmak üzere iki kısımdan oluşur. Etken madde; canlıda fizyolojik etki gösteren bir veya birkaç kimyasal madde karışımıdır. Taşıyıcı madde ise; etken maddenin hasta tarafından kolay alınabilmesi veya iyi doze edilebilmesi için katılan fizyolojik etkisi olmayan kimyasal maddelerdir; glukoz, parafin, gliserin gibi [1].

Verilen herhangi bir ilacın etkisi; hastaya, ilacın dozuna, verilen ilacın izlediği yola ve ilacın metabolizmasına bağlı olarak değişir. Doğrudan dokuya uygulanan ilacın tatbik edildiği bölgede meydana getirdiği tesire lokal etki denir. İlaç herhangi bir yolla vücuda alındıktan sonra, kana geçerek etki edeceği yere gider. Sistematik etkide birçok organ etkilenir, üstelik bir organa olan etkisi, diğer organa göre daha fazla olabilir.

Vücudun ilacı ortadan kaldırmak üzere kullandığı iki yöntem vardır; birincisi ilacın dışarı atılması, diğeri ise ilacın aktif olmayan bir hale dönüştürülmesidir. İlaçların vücuttan atılımı, akciğerler veya böbrekler yoluyla gerçekleşmektedir. Genel

anesteziye kullanılan gazlar ve buharlaşabilen sıvılar akciğerlerden dışarı atılırlar. Alınan alkolün belirli bir oranı da akciğerlerden dışarı atılır. Böbrek yetmezliğinden kaynaklanan nedenlerle ilacın vücuttan atılması daha yavaşlayabilir. İlacın vücuttan atılımının ikinci yolu ise ilacın aktif olmayan (inaktif) bir hale dönüştürülmesidir. Metabolik reaksiyonların büyük bir kısmı karaciğerde gerçekleşmektedir ve ilaçların inaktif hale getirilmesi de karaciğerde olmaktadır. Karaciğer yetmezliğinde ilacın inaktif hale getirilmesi de aksar [3].

1.1.1. İlaçların sınıflandırılması

İlaçlar iki şekilde sınıflandırılırlar:

1.1.1.1. Farmasötik şekillerine göre ilaçların sınıflandırılması

a. Katı ilaç şekilleri

1. Tozlar
2. Granüller
3. Mikropelletler
4. Mikropartiküller
5. Pastiller
6. Tabletler
 - Kapsız tabletler
 - Kaplı tabletler
 - Efervesan tabletler
7. Drajeler
8. Kapsüller

b. Sıvı ilaç şekilleri

1. Çözeltiler
 - Aromatik sular
 - Şuruplar
 - Posyonlar

- Elik sirler
- Kollutuv arlar

c. İki fazlı sistemler

1. Süspansiyonlar
2. Emülsiyonlar
3. Gliseroller
4. Linimentler
5. Musilajlar

d. Yarı katı ilaç şekilleri

1. Merhemler
2. Suppozituv arlar
3. Ovuller
4. Jeller

e. Aerosoller

1. Çözelti
2. Süspansiyon
3. Emülsiyon
4. Yarı katı sistemler
5. Katı sistemler

f. Parenteral preparatlar

1. Enjeksiyon yolu ile verilenler
 - Çözeltiler (tek doz, çok doz, büyük hacim)
 - Süspansiyon
 - Emülsiyon
 - Kuru toz (yeniden yapılandırmak için)
2. İmplantlar, pelletler

g. Radyofarmasötikler

h. Kontrollü salım sistemleri

1. Nano ve mikropartiküller
2. Lipozomlar
3. Transdermal sistemler
4. Vajinal sistemler
5. Tabletler (Matriks, sisme kontrollü, mukozaya yapışan)
6. Mini pompalar
7. Oküler sistemler
8. Nasal sistemler
9. Rektal sistemler

1. Diğer preparatlar

1. Göz preparatları
2. Kulak preparatları
3. Burun preparatları

i. Pansuman ve cerrahi malzemeler

1. Flasterler
 - Etkin madde içeren flasterler
 - Etkin madde içermeyen flasterler
 - Yakılar
2. Pansuman ve cerrahi malzemeler

1.1.1.2. Tedavi edici gruplarına göre ilaçların sınıflandırılması

a. Antibiyotikler ve diğer kemoterapötikler

1. Beta-laktam antibiyotikler: penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler, monobaktamlar
2. Makrolid ve linkozamid antibiyotikler
3. Tetrasiklinler
4. Amfenikoller
5. Aminoglikozidler

6. Antistafilokokal ilaçlar
7. Antianaerobik ilaçlar
8. Polipeptid yapılı antibiyotikler
9. Sülfonamidler, ko-trimoksazol ve trimetoprim
10. Fluorokinolonlar
11. Antifungaller
12. Antitüberküloz ilaçlar
13. Lepraya karşı kullanılan ilaçlar
14. Üriner enfeksiyon tedavisine özgü ilaçlar
15. Antiamibik ve diğer antiprotozoal ilaçlar
16. Antimalaryal ilaçlar
17. Antihelmintik ilaçlar
18. Ektoparazitlere karşı kullanılan ilaçlar
19. Antiviral ilaçlar
20. Antiseptikler ve dezenfektanlar
21. Antineoplastik ilaçlar
22. İmmünomodülatör ilaçlar

b. Kalp-damar sistemi ilaçları

1. Antihipertansif ilaçlar
2. Periferik vazodilatörler
3. Antianjinal ilaçlar
4. Antiaritmik ilaçlar
5. Kalp yetmezliğine karşı kullanılan ilaçlar
6. Hipolipidemik ilaçlar
7. Antitrombotik ilaçlar: antikoagülan, antitrombositik ve trombolitik ilaçlar
8. Hemostatik ilaçlar ve replasman için kullanılan hemostatik kan ürünleri
9. Plazma hacmini genişleten solüsyonlar, kan ve plazma ürünleri

c. Su-tuz ve asit- baz dengesini etkileyen ilaçlar ve diüretikler

d. Solunum sistemi ilaçları

1. Antitusif ilaçlar
2. Ekspektoran ilaçlar
3. Sürfaktanlar
4. Bronkodilatör ilaçlar ve diğer antiastmatik ilaçlar
5. Oksijen ve diğer tedavi gazları

e. Santral sinir sistemini etkileyen ilaçlar

1. Genel anestezipler
2. Lokal anestezipler
3. Nöromüsküler bloke edici ilaçlar
4. Santral etkili kas gevşeticiler
5. Hipnosedatifler
6. Nöroleptik ilaçlar
7. Antidepresan ve antimanik ilaçlar
8. Narkotik analjezikler
9. Narkotik olmayan analjezikler
10. Antiepileptik ilaçlar
11. Parkinson hastalığının ve diğer hareket bozukluklarının tedavisinde kullanılan ilaçlar

f. Endokrin sistemi etkileyen ilaçlar

1. İnsülin, oral antidiyabetik ilaçlar ve diğerleri
2. Kortikosteroidler, kortikosteroid antagonistleri ve ACTH
3. Tiroid ilaçları: tiroid hormonları, antitiroid ilaçlar, tirotropin ve protirelin
4. Kalsiyotropik ilaçlar: paratiroid hormonu, D vitamini, kalsitonin
5. Androjenler, anabolik steroidler ve antiandrojenik ilaçlar
6. Estrojenler, projestinler ve antagonistleri ve hormonal kontraseptifler
7. Hipofiz ve hipotalamus hormonları

g. Otakoidler ve antihistaminikler

h. Vitaminler, mineraller ve kombinasyonları

1. Antianemik ilaçlar

i. Sindirim sistemi ilaçları

1. Peptik ülser tedavisinde kullanılan ilaçlar
2. Laksatif ve pürgatifler
3. Antidiyareik ilaçlar
4. Antiemetik ilaçlar
5. Dijestanlar
6. Koleretik ve kolagog ilaçlar
7. Antispazmodikler
8. Antikolinesterazlar

j. Dermatolojik ilaçlar [4].

1.2. Santral Etkili Kas Gevşeticiler

Etkilerini beyin ve omuriliğin değişik bölgeleri üzerinde gösteren ilaçlara, santral sinir sistemi ilaçları denir. Santral sinir sistemini etkileyen ilaçlar, sinirsel iletinin çeşitli evrelerini etkiler. Bazıları nörotransmitter maddelerin sentez, depolanma ve etkinin sonlandırılması evrelerini değiştirerek presinaptik etki gösterir. Bazıları ise postsinaptik reseptörleri bloke veya aktive eder.

Santral sinir sistemi ilaçlarının etki mekanizmaları; nörotransmitterlerin biyosentezini artırır veya azaltır, nörotransmitterin metabolik parçalanmasını artırır veya azaltır, presinaptik uçlarda, nörotransmitterin geri alınmasını ve tekrar kullanılmasını değiştir.

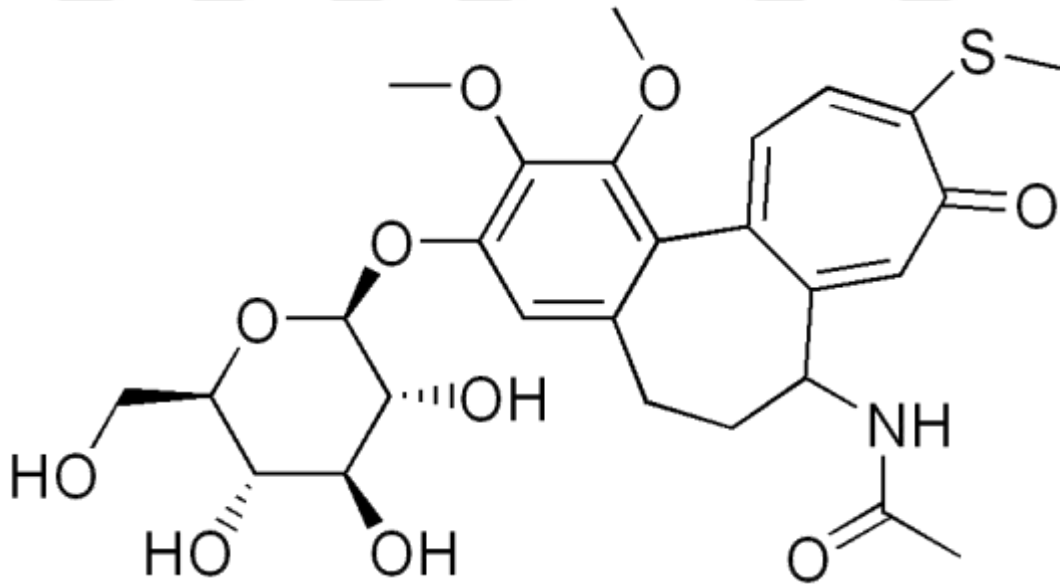
Santral etkili kas gevşetici ilaçlar; santral sinir sistemini etkileyerek artmış kas tonusunu azaltır ve spazmı giderir. Myoreleksan ya da spazmolitikler olarak da adlandırılır.

Santral etkili kas gevşeticilerin endikasyonları; kas iskelet kaynaklı spazmlarda kullanılır. Kireçlenme, iltihap, tümör vb. nedenlere bağlı olaylarda kas, kemik ve eklemler baskı altında kalır. Spazm oluşur. Bu tür spazmlarda hastada ağrı vardır. Narkotik olmayan analjeziklerle birlikte kullanılır, santral kaynaklı spazmlarda ve bazı nörolojik kökenli spazmların tedavisinde kullanılır [5].

Tiyokolşikosid bu grubun en bilinen ve yaygın olarak kullanılan etken maddelerinden biridir.

1.2.1. Tiyokolşikosid

Tiyokolşikosid N-((7S)-3-(beta-D-glucopiranosiloksi)-1,2-dimetoksi-10-(metilsülfanil)-9-okso-5,6,7,9-tetrahidrobenzo(a)heptalen-7-il) asetamid olarak adlandırılan, $C_{27}H_{33}NO_{10}S$ kapalı formülünde sahip bir maddedir. Molekül ağırlığı 563.618 g/mol'dür. Molekül yapısı Şekil 1.1.'de verilen Tiyokolşikosid'in CAS numarası 602-41-5'dir [6].



Şekil.1.1. Tiyokolşikosid'in molekül yapısı

Tiyokolşikosid, Gloriosa Superba tohumlarından elde edilir. Gloriosa, tropikal Afrika ve Asyada yetişen Colchicaceae familyasına ait bir bitkidir. Bu bitki yaprak dökken,

uzun ömürlü yumrulu bir bitkidir. Afrika, Güneydoğu Asya ve Malezya doğal yetiştirme alanlarıdır ve yaygın olarak yetiştirilmektedir. *Gloria superba*, Zimbabwenin ve Hindistan'ın Tamilnadu şehrinin ulusal çiçeğidir. Tiyokolşikosid, kas gevşetici farmakolojik etkinliğe sahip, yarı-sentetik sülfürlenmiş bir kolşikosid türevidir. Tiyokolşikosid, in-vitro ortamda sadece GABA_A reseptörleri ve striknine duyarlı glisinergic reseptörlere bağlanır. Bir GABA_A reseptör antagonisti olarak etkinlik gösteren tiyokolşikosidin, kas gevşetici etkilerini supraspinal düzeyde düzenleyici kompleks mekanizmalarla gösterebileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte tiyokolşikosidin glisinergic etki mekanizmasının da olabileceği düşünülmektedir. Tiyokolşikosidin, GABA_A reseptörleriyle etkileşim özellikleri dolaşımdaki ana metaboliti olan glukuronid türeviyle, kalitatif ve kantitatif açıdan ortaktır. Tiyokolşikosid ve ana metabolitinin kas gevşetici özellikleri, in vivo olarak sıçan ve tavşanlarda gerçekleştirilen çeşitli prediktif modellerde gösterilmiştir. Tiyokolşikosidin spinalize sıçanlarda kas gevşetici etkisinin bulunmaması, bu bileşiğin baskın supraspinal etkisini göstermektedir. Ayrıca, elektroensefalografik çalışmalar, tiyokolşikosidin ve ana metabolitinin hiçbir sedatif etkisinin olmadığı göstermiştir. Tiyokolşikosid, santral etkili miyorelaksan olup beyaz-sarı renkli kristal tozudur. Tiyokolşikosid insanlarda serum proteinlerine düşük oranda bağlanır ve bu bağlanma terapötik tiyokolşikosid konsantrasyonuna bağımlı değildir. Serum protein bağlanmasında esas olarak serum albümini rol oynamaktadır. Sağlıklı gönüllülerde oral uygulama sonrası tiyokolşikosid mevcut haliyle tespit edilmemiştir. Aktif glukuronid metaboliti, 1 saatlik ortalama T_{max} ile plazmada hızla görülür. Oral yoldan tek doz 8 mg tiyokolşikosid uygulamasından sonra, tiyokolşikosidin ve aktif glukuronid metabolitinin aktif bileşenlere maruz kalma durumunu yansıtan ortalama eğri altındaki alanı (EAA) yaklaşık 500 ng.saat/mL'dir. Oral yoldan tek doz 8 mg tiyokolşikosid uygulamasından 4 sonra, aktif glukuronid metabolitinin aktif bileşenlere maruz kalma durumunu yansıtan ortalama eğri altındaki alanı (EAA) yaklaşık 126 ng.saat/mL'dir. Tiyokolşikosidin görünür dağılım hacmi ve sistemik klerensi yaklaşık olarak sırasıyla 43 L/saat ve 19 L/saattir. Tiyokolşikosid'in kan dolaşımdaki iki temel şekli, tiyokolşikosid aglikon ve aktif glukuronid türevidir. Aktif glukuronid türevi, intramüsküler uygulama sonrasında da görülmüştür. Sağlıklı gönüllülerde oral uygulama sonrası tiyokolşikosid bu halde tespit edilmemiştir. Aktif

glukuronid metaboliti plazmada hızla ortaya çıkar. Tiyokolşikosid iskelet kası üzerinde gevşetici etkiye sahiptir ve bununla beraber antiinflamatuvar, analjezik ve anestezi etkileride vardır. Bu etkileri nedeniyle ortopedik, travmatik ve romatolojik bozuklukların tedavisinde kullanılır. Tiyokolşikosid oral ve intramüsküler yolla verilir. Kas spazmları için yetişkin dozu; günlük başlangıçta oral 16 mg ve intramüsküler 8 mg'dır. Sağlıklı gönüllülerde, oral yoldan uygulamayı takiben, tiyokolşikosid yaklaşık 7 saatlik ortalama final yarı ömür ile elimine edilir. ¹⁴C radyoaktif tiyokolşikosidin oral uygulamasını takiben, uygulanan dozun % 79'una dışkıda, % 20'sine idrarda rastlanır. Tiyokolşikosid 6 aya kadar olan oral dönemlerde iyi tolere edilebilir. Tiyokolşikosid, yüksek dozlarda, oral yoldan akut uygulamayı takiben köpeklerde şiddetli kusmaya, sıçanlarda diyareye ve hem rodentlerde hem de rodent-olmayanlarda konvülsiyonlara sebep olmuştur. Hem sıçanlarda ≤ 2 mg/kg/günlük tekrarlayan dozlarda hem de insan-olmayan primatlarda $\leq 2,5$ mg/kg/günlük tekrarlayan dozlarda, 6 aylık dönemlere kadar oral yoldan uygulanan tiyokolşikosid ile primatlarda 0,5 mg/kg/güne kadar tekrarlayan dozlarda 4 hafta süreyle intramüsküler yoldan uygulanan tiyokolşikosid iyi tolere edilmiştir. Tiyokolşikosid, tekrarlayan uygulamalarda, oral yoldan uygulandığında gastrointestinal rahatsızlıklara, intramüsküler yoldan uygulandığında ise kusmaya sebep olmuştur. Tiyokolsikosid'in karsinojenik potansiyeli henüz değerlendirilmemiştir. Majör metaboliti anojenik olmasına rağmen, tiyokolşikosidin terapötik dozda kullanıldığında mutajenik potansiyeli olmadığı gösterilmiştir. Çok yüksek dozlarda teratojenik etki ve 5 perinatal toksisite gösterilmiştir. Tiyokolşikosidin 3 mg/kg/gün dozlarına kadar teratojenik etkilerine dair bir kanıt gösterilememiştir. Tiyokolşikosid, metabolitinin anojenik aktivitesine rağmen fertilite üzerinde advers etki göstermemiştir. Tiyokolşikosid, çok güçlü konvülzan aktiviteye sahiptir. Bundan dolayı nöbet eğilimli kişilerde kullanılmamalıdır [7].

1.3. Narkotik Olmayan Analjezikler

Narkotik olmayan analjezikler; analjezik amaçlı kullanımları yaygın olan ilaçlardır. Bu ilaçlar bağımlılık oluşturmaz. Ağrı sentezinde rol oynayan prostoglandinin fonksiyonlarını bozarak etkili olurlar. Çoğunun antienflamatuar (enflamasyon, yangı ve iltihabı giderici) ve antipiretik (ateş düşürücü) etkileri de vardır. Enflamasyonla seyreden ve uzun süre analjezik alınması gereken romatoid artrit, osteo artrit gibi vakalarda kullanılır. Şiddetli ağrılarda narkotik analjezikler tercih edilir. Güçlü antienflamatuar etkisi olan glukortikoidlerden ayırmak için Nonsteroidal Antienflamatuar (NSAİ) ilaçlar olarak da adlandırılır [5].

NSAİ'lerin kısa tarihçesine bakıldığında; ilk kez 1820'de kolşisin, 1860'da salisilik asitin tanımlanmış ve ilk Aspirin tablet 1897'de Felix Hoffman tarafından sentezlenmiştir. Non-stereoid antiinflamatuar ilaç isminin 1949 yılında ilk kullanılışı, fenilbutazon'un sentezlenmesi ile eş zamanlıdır. 1971'de John R. Vane etki mekanizmaları konusunda yaptığı çalışmalar sonucunda ilk defa siklooksijenaz (COX) enzimini tanımlamış ve bu buluşla Nobel ödülü almıştır. 1976'da ise ilk defa prostoglandin endoperoksit sentetaz (siklooksijenaz) enzimi elde edilmiştir. Bu konu ile ilgili son gelişme 1990'ların başında COX'un tek bir molekül olmadığı, birden fazla izomerlerinin ve bunların da farklı işlevlerinin olduğunun gösterilmesi olmuştur. Semptomatik iyileşme sağlayan bu ilaçlar halen dünyada en çok reçete edilen ilaçların başında gelmektedir. Toplumda NSAİ kullanım prevalansının yaklaşık %5 olduğu düşünülmektedir.

NSAİ'ler kimyasal yapılarına göre asidik, nonasidik ve koksib olmak üzere 3 gruba (Tablo 1.1.) ve yarı ömürlerine göre ise kısa ve uzun etkili olmak üzere 2 gruba ayrılır. Klinik uygulamada kısa etkili olanlar akut olarak analjeziye gerek olan durumlarda (spora bağlı travma, gut atağı gibi), uzun etkili olanlar romatoid artrit gibi kronik iltihabi durumlarda etkilidir [8-11].

Tablo 1.1. NSAİ'ların kimyasal yapısına göre sınıflandırması

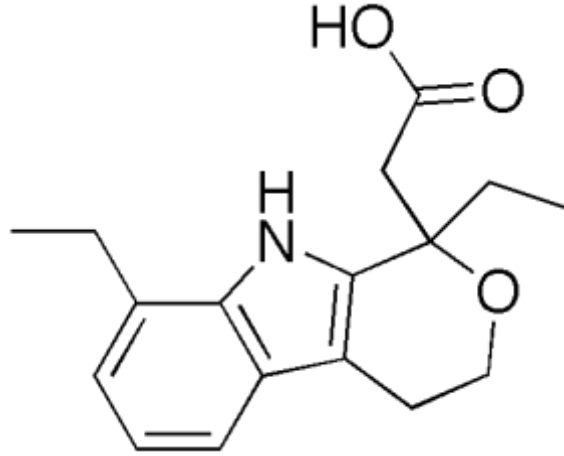
I.Asidik yapıdaki deriveler	
1. Karboksilik asit deriveleri	
1.1. Salisilik asit ve esterleri	Aspirin, Diflunisal, Kolin salisilat, Metil salisilat, Magnezyum Salisilat, Salisil salisilat (salsalat)
1.2. Fenamik asitler	Flufenamik asit, Metafenamik asit, Meklofenamik asit, Niflumik asit
1.3. Propionik asitler	Ibuprofen, Naproksen, Flurbiprofen, Fenbufen, Benaksopropen, Fenoprofen, Ketoprofen, Indoprofen, Tiaprofenik asit, Soprofen, Karprofen, Oksaprozin, Pirprofen
1.4. Asetik asitler	Diklofenak, İndometazin, Etodolak, Sulindak, Tolmetin
2. Enolik Asitler	
2.1. Pirazonlar	Fenilbutazon, Oksifenbutazon, Azopropazon
2.2. Oksikamlar	Piroksikam, Pesoksikam, Sudoksikam, Tenoksikam, İsoksikam
II. Asit olmayan deriveler	Nabumeton
III. Koksibler	Rofekoksib, Selekoksisib, Valdekoksib, Parekoksisib, Etorikoksib, Lumirakoksib

Narkotik olmayan analjezikler; yüzeysel, künt, orta şiddetteki ağrılarda analjezik olarak, antipiretik etkileri nedeniyle ateş düşürücü olarak ve uzun süreli analjezik kullanılması gereken durumlarda kullanılırlar [5].

Etodolak bu grubun tercih edilen bir türüdür, çünkü gastrointestinal yan etkilerinin daha düşük olduğu görülmüştür.

1.3.1. Etodolak

Etodolak (RS)-1,8-dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano-[3,4-b] indol-1-asetik asit olarak adlandırılan $C_{17}H_{21}NO_3$ kapalı formülüne sahip bir maddedir. Molekül ağırlığı 287.354 g/mol'dür. Molekül yapısı Şekil 1.2.' de verilen etodolakin CAS numarası 41340- 25-4'dür [12].



Şekil.1.2. Etodolak'ın molekül yapısı

Etodolak non-streoid antiinflamatuvar ilaçtır ve tercih edilen inhibisyonu Siklooksijenaz-2 (COX-2)'dir. Gastrointestinal yan etkileri daha düşük görüldüğü için daha güvenilidir ve enflamatuvar artrit hastalarında kronik ağrı tedavisinde kullanılır. Non-streoid antiinflamatuvar etkilerine ilave olarak son çalışmalar etodolak ve diğer anti-enflamatuvar ilaçların antitümör/kimyasal yoldan önleyici aktivitesi gözlenmiştir.

Etodolak, R(-) ve S(+) etodolak'ın rasemik bir karışımıdır. Diğer NSAİ ilaçlar gibi, bu ilacın da S(+) formunun biyolojik yönden aktif olduğu saptanmıştır. Her iki enantiomer de stabildir ve in vivo ortamda R(-) enantiomeri S(+) enantiomerine dönüşmemektedir [13].

Endikasyonları: Osteoartrit, romatoid artrit ve ankilozan spondilitin belirti ve bulgularının tedavisinde, ağrı tedavisinde, endikedir.

Kontrendikasyonları: Etodolaka duyarlı kişilerde, peptik ülser hikâyesi olan veya aktif peptik ülserli hastalarda kullanılmamalıdır. Olası bir kros-reaksiyondan dolayı aspirin veya diğer non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlarla tedavi sırasında astım, rinit veya ürtiker gelişen hastalarda da kullanılmamalıdır.

Yetişkinlerde 2-3x200-400 mg, şeklinde kullanılabilir. Günlük max doz 1000 mg'dır Anne sütüne geçer. Gebelik için ise yeterli çalışma yoktur [14].

Etodolak ve Tiyokolşikosid kombine tablet formu; osteoartrit, vertebral kolonun ağrılı sendromları, eklem dışı romatizma, ağrılı kas spazmlarının semptomatik tedavisinde, travma sonrası ve postoperatif ağrılarda endikedir.

Türkiye’de Etotio tablet, üretici firma Mustafa Nevzat İlaç San. A.Ş. dir.

1.4. Etotio Tablet

Her bir film kaplı tablet, etkin madde olarak 400 mg etodolak ve 8 mg tiyokolşikosid içerir. Yardımcı maddeler ise, çekirdek tablette; laktoz monohidrat, mikrokristalin selüloz, sodyum nişasta glikolat, koloidal silikondioksit, polivinilpirolidon, magnezyum stearat, film kaplamada; hidroksipropilmetilselüloz, titanyumdioksit, polietilen glikol400 içerir (Karışım halinde temin edilir).

Non-Selektif COX İnhibitörleri-Kas-İskelet sistemi ilaçları kombinasyonudur. Etodolak, hayvan modellerinde antiinflamatuvar, analjezik ve antipiretik etkiler gösteren bir nonsteroidal antiinflamatuvar (NSAİ) ilaçtır. Diğer NSAİ ilaçlarda olduğu gibi, etodolağın etki mekanizması da kesin olarak bilinmemektedir, fakat prostaglandin biyosentezinin inhibisyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Tiyokolşikosid, in-vitro ortamda yalnızca GABA-A ve striknine-duyarlı glisin reseptörlerine bağlanır. Bir GABA-A reseptör agonisti olarak etkinlik gösteren tiyokolşikosid, kas gevşetici etkilerini supraspinal düzeyde düzenleyici kompleks mekanizmalarla gösteriyor olabilir; bununla birlikte glisinerjik etki mekanizması hariç tutulamaz.

Etodolak ve tiyokolşikosidin eşzamanlı uygulaması, bu ilaçların tek başına uygulandıklarında belirlenen farmakokinetik özelliklerini değiştirmemektedir. Etodolak iyi absorbe edilir ve solüsyon formülasyonu ile karşılaştırıldığında, 200 mg kapsülün rölatif biyoyararlanımı % 100’dür. Etodolak yemekten sonra uygulandığında absorbsiyon derecesi değişmez. Ancak, besin alımı erişilen doruk konsantrasyonunu yaklaşık yarıya kadar azaltır ve doruk konsantrasyona kadar olan süreyi de 1,4-3,8 saat artırır. Terapötik doz sınırları içinde etodolak, > % 99 oranda

plazma proteinlerine bağlıdır. Serbest fraksiyon $< \% 1$ 'dir ve bu oran araştırılan doz sınırlarında toplam etodolak konsantrasyonundan bağımsızdır. Etodolak karaciğerde yoğun şekilde metabolize edilir. Terminal metabolizma yarı ömrü $7,3 (\pm 4,0)$ saattir. Tiyokolşikosidin oral uygulamasından sonra plazmadaiki metabolitine rastlanır: Farmakolojik olarak aktif metabolit SL18.0740 ve inaktif metabolit SL59.0955. Tiyokolşikosid insanlarda serum proteinlerine düşük düzeyde bağlanır ($\%13$) ve bu bağlanma terapötik tiyokolşikosid konsantrasyonuna bağımlı değildir. Oral uygulama sonrasında tiyokolşikosid önce aglikon 3-demetiltiyokolşikoside (SL59.0955) metabolize olur. Daha sonra SL59.0955, tiyokolşikoside eşdeğer farmakolojik etkinliğe sahip olan SL18.0740'a metabolize olur. Radyolojik işaretli tiyokolşikosidin oral uygulamasını takiben, uygulanan dozun $\% 72$ 'sine dışkıda, $\%16$ 'sına idrarda rastlanır. SL18.0740 metaboliti, tiyokolşikosidin oral uygulaması sonrasında 3,2-7 saat arasında değişen bir görünür yarılanma ömrü ile elimine edilir. SL59.0955 metabolitinin ortalama yarı ömrü yaklaşık 0,8 saattir.

Yetişkinlerde ve 16 yaştan itibaren adolesanlarda osteoartrit, vertebral kolonun ağrılı sendromları, eklem dışı romatizma, akut spinal patolojideki ağrılı kas spazmlarının tedavisinde, travma sonrası ve postoperatif ağrılarda endikedir.

Etodolak ve tiyokolşikosid içeren bileşiklere ve ilacın içerdiği herhangi bir maddeye karşı aşırı duyarlılığı olan hastalarda; olası çapraz ilaç reaksiyonlarından dolayı aspirin ya da diğer NSAİ ilaçlar ile tedavi sırasında alerjik reaksiyonlar gelişen hastalarda ya da akut astım, rinit, ürtiker geçmişi olan hastalarda; daha önceki NSAİ ilaçlarla tedavi ile ilgili gastrointestinal kanama veya perforasyon geçmişi bulunan hastalarda; ciddi kalp yetmezliği olan hastalarda, by-pass ve kalp ameliyatından hemen önce veya sonra; aktif peptik ülseri olanlarda veya peptik ülser hastalığı geçmişi olan hastalarda, gevşek paralizide, adele hipotonisinde, tüm gebelik ve laktasyon süresince, 16 yaş ve altındaki çocuklarda, çocuk doğurma potansiyeli olan ve etkili kontrasepsiyon kullanmayan kadınlarda kontrendikedir.

Etotio özellikle içerdiği etodolaktan dolayı diğer NSAİ ilaçlarda olduğu gibi kardiyak, renal ya da hepatik yetmezliğe karşı dikkatli kullanılmalıdır. Doz düşük

olmalı ve böbrek fonksiyonları monitörize edilmelidir. Karaciğer hastalığı ile uyumlu klinik belirti ve bulgular meydana gelirse ya da sistemik belirtiler görülürse (döküntü, eozinofili gibi), etodolak tedavisi durdurulmalıdır. Bronşiyal astım hikayesi olan ya da bronşiyal astımlı hastalarda, NSAİ kullanımı ile bronkospazm gelişimi bildirildiği için, bu hastalarda Etotio dikkatli kullanılmalıdır. Etotio, sıvı retansiyonu, hipertansiyonu ya da kalp yetmezliği olan hastalarda dikkatli kullanılmalıdır. Etodolak gibi NSAİ ilaç tedavisi sırasında gastrointestinal ülserasyon ve kanama belirti ve semptomları için dikkatli olunmalıdır ve gastrointestinal advers etki potansiyeli riskini minimuma indirmek için, etkili en düşük doz, mümkün olan en kısa süreyle uygulanmalıdır. Yüksek riskli hastalar için NSAİ ilaçları içermeyen alternatif tedaviler düşünülmelidir. Hastalara bazı durumlarda fatal olabilen ciddi deri reaksiyonlarının belirti ve semptomları bildirilmeli ve deri döküntüsü ya da aşırı duyarlılığın herhangi başka bir belirtisinde ilacın durdurulması gerektiği söylenmelidir. Etotio'nun içeriğinde yer alan tiyokolşikosid özellikle epilepsisi olan hastalarda ya da nöbet riski olan hastalarda nöbetleri hızlandırabilir. Oral uygulamayı takiben diyare görülmesi halinde Etotio tedavisi kesilmelidir. İstenmeyen etkiler, semptomları kontrol etmek için gereken en düşük etkin dozu, en kısa süre ile kullanarak azaltılabilir.

Etodolak ile ilişkili yaygın olarak yorgunluk, baş dönmesi, depresyon, sinirlilik, bulanık görme, kulak çınlaması, dispepsi, karın ağrısı, diyare, flatulans, bulantı, konstipasyon, gastrit, melena, kusma, kaşıntı, döküntü, disüri, sık idrar, titreme ateş yan etkileri görülmüştür.

Tiyokolşikosid ile ilişkili yaygın olarak somnolans, diyare, gastralji yan etkileri yan etkileri görülmüştür.

Etodolak ile bağlantılı etkileşimler: diğer NSAİ ilaçlar ile olduğu gibi, etodolak ile aspirinin eşzamanlı uygulanması, yan etkilerdeki artış potansiyeli nedeniyle, genelde önerilmemektedir. ADE-inhibitörleri, furosemid, lityum, metotreksat, varfarin, kardiyak glikozidler, siklosporinler, fenilbutazon ve probenesid, anti-trombosit ajanlar ve seçici serotonin gerilim inhibitörleri, kortikosteroidler, takrolimus,

zidovudin, mifepriston, kinolon antibiyotikler ile eş zamanlı kullanımında etkinlik ve istenmeyen etkiler açısından dikkatli olunmalıdır.

Tiyokolşikosid ile bağlantılı etkileşimler: Tiyokolşikosidin kas gevşetici etki gösteren diğer ilaçlarla birlikte alınması, birbirlerinin etkisini artırabileceklerinden dolayı önerilmemektedir. Aynı nedenle, düz kaslar üzerine etkili olan bir diğer ilaçla birlikte kullanılması durumunda, istenmeyen etkilerin görülme sıklığının artması ihtimaline karşı, daha dikkatli olunmalı ve hasta izlenmelidir. Gebelikte ve çocuk doğurma potansiyeli olup etkili kontrasepsiyon kullanmayan kadınlarda kontrendikedir. Tiyokolşikosid anne sütüne geçtiği için, Etotio emzirme döneminde kullanılmamalıdır. Etotio baş dönmesi, sersemlik hissi, yorgunluk ve görmede anormalliklere sebep olabilir. Hastalar araç ve makine kullanmadan önce, bu ilacın etkilerine karşı dikkatli olmaları konusunda uyarılmalıdır [15].

BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyoeşdeğerlik

Biyoeşdeğerlik, farmasötik eşdeğer olan iki ilaç ürününün (biri test ürün, diğeri referans ürün) aynı molar dozda verilişinden sonra biyoyararlanımlarının (hız ve derece boyutlarıyla) ve böylece terapötik etkilerinin hem etkinlik hemde güvenlik bakımından aynı olmasını sağlayacak derecede benzer olmasıdır. Başka bir tanıma göre, biyoeşdeğerlik "uygun olarak tasarımlanmış bir klinik çalışmada benzer koşullarda aynı molar dozda verildikleri zaman farmasötik eşdeğer veya farmasötik alternatif olan iki ilaç ürünü arasında, etkin maddenin yada etkin molekül kısmının etki yerinde var olma hızı ve derecesi bakımından anlamlı fark olmayışı" diye tanımlanır [16].

Yeni bir etkin madde ile ilaç üretildiğinde ilacın yeterliliği ispatlanıp patenti alındıktan yirmi yıl sonra aynı etkin madde ile yeni ilaçlar geliştirilebilmekte ve bu ilaçların reçetelere yazılabilmeleri ve kullanılabilmeleri için üretilen ilk ilaca eşdeğer olduklarının ispatlanması gerekmektedir. Bu yüzden ilk üretilen ilaç ve onun kopyalarının tedavi edici niteliklerinin eşdeğerliğinin, etkin ve güvenilir olup olmadığının belirlenmesinde biyoeşdeğerlik çalışmalarından yararlanılmaktadır [17].

2.2. Biyoyararlanım

Biyoyararlanım; sistemik etki oluşturmak için verilen ilaçtan vücudun ne kadar yararlandığını gösteren somut bir ölçüdür. Vücutta ilaçtan yararlanılması istenen kısım ilacın etki yeri olan dokular ve organlardır. Biyoyararlanım geniş anlamıyla, farmasötik şekil içinden aktif maddenin absorbe edilme ve vücut içindeki etki yerine erişebilme hızı ve derecesi diye tanımlanabilir [16].

Oral veya emilmenin söz konusu olduğu diğer bir yolla ilaç etken maddesi vücuda verildiğinde, farmasötik şekilde yer alan etken maddenin emilme oranı (miktarı) ve emilme hızıdır [18].

İlaçların emilim hızı ilacın veriliş yöntemiyle ilgilidir. Aynı dozda damar içine verilen bir ilaç, oral olarak kullanılan ilaçtan daha hızlı biyoyararlanım göstermekle beraber doğrudan doğruya kan sıvıları ve vücut dokularının bazılarına şırınga ile verilen ilaç, en hızlı şekilde etkiyi yapmaktadır. Çeşitli yollardan alınan ilaçların emilim hızları Tablo 2.1.'de verilmiştir [19].

Biyoyararlanım standartlarının ve testlerinin temel amacı, önerilen ilacı alan bir hastanın, gerçekten önerilen ilacı, önerilen dozda ve önerilen sınırlar içerisinde aldığından emin olmaktır [20].

Tablo 2.1. Çeşitli yollardan alınan ilaçların emilim hızları

Alındığı Yol	Etkisinin ortaya çıktığı zamana kadar geçen süre (dk)
Deriden	Değişken
Ağızdan	30 – 90
Cilt altı	15 – 30
Kas içi	10 – 20
Dilaltı tablet	3 – 5
Solunum	3
Damar yolu	0,5–1
Kalp içine	0,25

2.3. Kromatografi

Kromatografinin ilk kez 1900'lerin başında Rus botanikçi Michael Tswett tarafından geliştirildiği ve kullanıldığı kabul edilir [21]. Tswett, cam bir kolonda, CaCO_3 adsorbanı üzerinden bitki ekstresinin petroleterli çözeltisini geçirmiş ve kolonda sarı, yeşil bantlarla bir ayırma işleminin olduğunu görmüştür. Bu alandaki ilk yayınların

Rusça olması nedeni ile diğer araştırmacıların ilgisini çekerek gelişme sağlaması 1930'lu yılları bulmuştur.

Kromatografi, bir örnekte karışım halinde bulunan kimyasal bileşenlerin ayrılması, tanınması ve tayini için kullanılan analitik bir yöntemdir. Kromatografi ile ayrılan maddeler teşhis edilebilirler, izole edilebildikleri için de bu, aynı zamanda bir saflaştırma yöntemidir. Başka bir ifade ile ayrılan maddelerin teşhislerini ve miktar tayinlerini mümkün kıldığı için kromatografi, kalitatif ve kantitatif tayin yöntemidir. Kromatografik yöntemlerle, kimyasal ve fiziksel özellikleri birbirine çok yakın bileşenlerden oluşan karışımları, tümüyle, kolayca ve kısa sürede ayırmak olanaklıdır.

2.3.1. Kromatografi'nin temel prensibi ve tanımları

Durgun faz: Sabit faz, katı veya (katı destek üzerine emdirilmiş bir) sıvıdır. Mobil faz içerisinde gelen örneğe ait bileşenlerin etkileşime girdikleri ve belirli ölçüde alıkonuldukları fazdır. Bileşenler kendi hızları ile hareket ederken yavaşlatıcı güç olarak etki eder.

Mobil faz: Hareketli faz, sıvı veya gaz olabilir. Sabit faz üzerinde hareket ederek numune bileşenlerini, kolon (sabit faz) boyunca taşıyan ve ayrılmalarını sağlayan itici güçtür. Sabit fazdan veya kolondan kesintisiz olarak geçirilen çözücüdür.

Karışımı (numune) oluşturan bileşenler: Karışımı oluşturan bileşenler, birbiri ile karışmayan iki faz (durgun-mobil) arasında farklı göç sergiler ve böylece birbirlerinden ayrılabilirler. Mobil fazın içerisinde yer alan bileşenler, sabit faza ait dolgu maddesiyle etkileşimleri sebebiyle, bir miktar tutulurlar. Bu tutulma, örnekteki farklı bileşenler için farklı miktarlarda olur. Böylece bileşenler sabit fazın sonlarına doğru, farklı hızlarda ilerledikleri için, birbirinden ayrılmış vaziyette sabit fazı farklı zamanlarda terkederler.

Alıkonma: Mobil faz içerisinde gelen, analizi yapılacak maddeye ait bileşenlerin sabit faz ile etkileşime girerek belirli oranda tutulması daha doğrusu yavaşlatılması ve böylece daha geç olarak sabit fazı terk etmesi olayıdır. Bu özellikten yola çıkılarak, belirli sabit analitik koşullar altında, her kimyasal madde için parmak izi niteliği taşıyan alıkonma zamanı (retention time) tanımı türetilmiştir. Bu kavram belirli sabit deneysel koşullarda analizi yapılan maddenin sabit fazı terketmesi için geçen süreyi göstermektedir.

Kromatogram: Kolondan çıkan bileşenlerin derişimlerinin uygun bir yöntemle ölçülerek zaman veya hareketli fazın hacmine karşı çizilen grafiğine denir. Kromatografik analiz sonucunda elde edilen grafiktir. Y-ekseni, kullanılan dedektörün ölçtüğü fiziksel özelliği (absorbans, fluoresans, iletkenlik, akım, kırılma indisi vb.), X-ekseni ise zamanı göstermektedir (alıkonma zamanı için kolaylık olması bakımından genellikle dakika cinsinden). Zamana karşı Y-ekseninde ölçülen fiziksel özelliğin artıp tekrar azalması şeklinde oluşan pik şeklindeki eğrilerin herbiri analizlenen maddeye ait bir bileşeni göstermektedir. Bu piklere ait değerler (pik alanı, yüksekliği, vb.) kullanılarak kalitatif ve kantitatif analizler yapmak olasıdır.

Elüsyon: Bir kolondan sürekli taze çözücü geçirerek çözünmüş bileşenlerin yıkanarak taşınmasıdır.

Elüent: Durgun faz tarafından alıkonan analiti hareket ettirmek için kullanılan çözücüdür.

Ayırmayı etkileyen parametreler şunlardır; kolon (türü, boyutları), hareketli faz (türü, bileşimi, akış hızı), ölçüm (dedektör türü, dalga boyu), örnek (örnek derişimi, örnek hacmi).

Sabit faz tarafından kuvvetli tutulan karışım bileşenleri, hareketli fazın akışıyla yavaş hareket ederken, sabit faz tarafından zayıf tutulan bileşenler, hızlı hareket ederler.

Hızlardaki bu farklılık sonucu, numune bileşenleri birbirlerinden kalitatif veya kantitatif olarak analizlenebilen farklı bantlar veya bölgeler şeklinde ayrılırlar.

2.3.2. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması

Tablo 2.2. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması

Sabit faz	Mobil faz	Uygulama Şekli	Dayandığı fiziksel prensip
Katı	Sıvı	İTK, Kolon K.	Adsorbsiyon
Sıvı	Sıvı	İTK, Kolon K., Kağıt K., YPSK	Dağılma
Katı	Gaz	Gaz / Katı krom.	Adsorbsiyon
Sıvı	Gaz	Gaz / Sıvı krom.	Dağılma

Ayrılma mekanizmalarına (dayandıkları prensiplere) göre sınıflandırma:

- Adsorbsiyon kromatografisi
- Dağılma kromatografisi
- İyon değiştirici kromatografi
- Boyut eleme kromatografisi
- İyon çifti kromatografisi
- Afinite kromatografisi

Uygulama tekniğine göre sınıflandırma:

- Düzlemsel kromatografi
 - ince tabaka kromatografisi
 - kağıt kromatografisi
 - elektrokromatografi
- Kolon kromatografi
 - gaz kromatografisi
 - yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
 - süperkritik akışkan kromatografisi

Faz tiplerine göre sınıflandırma:

- Sıvı kromatografisi

1. sıvı / katı kromatografisi
2. sıvı / sıvı kromatografisi

b. Gaz kromatografisi

1. gaz / katı kromatografisi
2. gaz / sıvı kromatografisi

2.3.2.1. Ayrılma mekanizmalarına göre sınıflandırma

a. Adsorpsiyon kromatografisi: Adsorpsiyon kromatografisi sıvı-katı yada gaz-katı kromatografisidir. Sabit faz polar, hareketli faz ise apolar veya çok az polardır. Bileşenler birbirlerinden katı yüzeye olan farklı derecede ilgileri nedeniyle ayrılırlar. Adsorpsiyon denge sabiti, büyük olan bileşen kolonda daha uzun süre kalır. Ayrılacak bileşenin sabit fazla etkileşmesi dipol-dipol çekmeleri, Van Der Waals kuvvetleri veya hidrojen bağları sonucunda gerçekleşir. Polarlıkları farklı bileşenlerden oluşan karışımların ayrılmasında iyi sonuç verir. Polar maddeler polar, apolar maddeler ise apolar sabit faz tarafından daha fazla tutulurlar.

b. Dağılma (partisyon) kromatografisi: Dağılma kromatografisi sıvı-sıvı kromatografisidir. Ayrılacak bileşenler, sabit faz ve hareketli faz arasında dağılma katsayılarına bağlı olarak dağılırlar, sabit faz ve hareketli faz karışmamalı, birbirlerini çözmemeli ve polarlıkları farklı olmalıdır. Bu dağılım farklı oranda göçe neden olur ve ayırım gerçekleşir [22-24]. Durgun fazda çözünürlüğü yüksek olan bileşen kolonda daha uzun süre kalır. Düşük ve orta mol kütleli, iyonik olmayan polar moleküllerin bu yöntemle analizi gerçekleştirilir.

Dağılma kromatografisinde Nerst'in dağılma katsayısı geçerlidir. Nernst'e göre; "bir biri ile karışmayan iki sıvı madde karışımında çözünen üçüncü bir maddenin iki ayrı sıvı fazdaki konsantrasyonunun birbirine oranı sabittir (Denklem 2.1)."

$$K = C_s / C_M \quad (2.1)$$

K: Dağılma (partisyon) katsayısı

C_s : Maddenin sabit fazdaki konsantrasyonu

C_M : Maddenin mobil fazdaki konsantrasyonu

K değeri büyük ise sabit fazdaki konsantrasyon, mobil fazdakinden daha fazladır. Molekül sabit fazda daha uzun süre kalıyor anlamına gelir.

YPSK ile ilaç analizi yapabilmek için yaygın olarak dağılma kromatografisi uygulanır. Bu kromatografi türünde uygun bir analiz yapabilmek için maddenin belli bir çözücüde çözünmüş olması gerekir. Maddenin apolar veya polar olmasına göre maddenin polaritesine yakın bir sabit faz seçilir. Örneği oluşturan bileşenlerin iyi ayrılabilmesi için sabit faz ile hareketli faz polaritesi farklı olmalıdır.

Bu teknik sıvı-sıvı ve sıvı-bağlı faz kromatografisi olmak üzere iki alt sınıfa ayrılabilir. İki teknik arasındaki fark, katı parçacıklar yüzeyine sabit fazın tutturulmasındaki metot farkından kaynaklanır. Sıvı-sıvı tekniğinde, sabit faz katı yüzeyine fiziksel adsorpsiyonla; bağlı faz tekniğinde ise kovalent kimyasal bağlarla tutunur. Bağlı faz dolgu maddeleri, fiziksel olarak yüzeye tutturulmuş dolgulara göre daha kararlı olma gibi bir üstünlüğe sahiptir. Yüzeye fiziksel olarak tutturulan fonksiyonel gruplar, zamanla hareketli fazda çözünerek sürüklenebilir ve etkisizleştirilebilir. Bağlı faz dolgu maddelerinin sakıncası ise; biraz daha sınırlı numune kapasitesine sahip olmalarıdır [25].

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:

Normal faz sıvı kromatografisi: Normal faz sıvı kromatografisinde sabit faz, mobil fazdan daha polardır. Polar sabit faz ve apolar veya düşük polariteye sahip hareketli fazdan oluşan kromatografi çeşididir. Silika veya alümina partiküller üzerine tutturulmuş su veya trietilenglikol gibi oldukça polar sabit faz, hareketli faz olarak ise hekzan, metilen klorür, kloroform, dietil eter ve bunların karışımı gibi nispeten az polar çözücüler kullanılır. Silika jelin üzerine kimyasal bağlarla $-CN$, $-NO_2$ veya $-$

NH₂ 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 terk etmektedir [26, 27]. Hareketli fazın polaritesindeki artış elüsyon zamanının azalması ile sonuçlanır.

Ters faz sıvı kromatografisi: Ters faz sıvı kromatografisinde mobil faz, sabit fazdan daha polardır. Apolar sabit faz ve polar hareketli fazdan oluşan kromatografi çeşididir. Ters faz kromatografide sabit faz apolardır ve çoğu zaman bir hidrokarbondur. Hareketli faz ise su veya sulu tampon çözeltileri ile metanol veya asetonitril gibi polar çözücülerden meydana gelmektedir. Bu yöntem apolar sabit fazda tutunmayı tercih eden maddeleri ayırmada başarılıdır ve polarlığı en çok olan madde kolondan önce elue olur. Ters faz kromatografide kaplamalardaki siloksandaki R grubu bir C₈ veya C₁₈ zinciridir.

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. Bu tür dolgu maddelerinde uzun zincirli hidrokarbon grupları parçacık yüzeyine dik ve birbirine paralel şekilde yerleştirilerek apolar bir yüzey elde edilmiş olur. Ayrıca C₈ ve daha kısa zincirli hidrokarbonlar, sikloheksil ve fenil bağlanmış sabit fazlar da kullanılmaktadır. Fenil gruplar alkil gruplardan daha polardır [26]. Hareketli faz ise çeşitli derişimlerde metanol, asetonitril gibi çözücülerini içeren sulu çözeltilerdir. Bu kromatografi türü, apolar sabit fazda daha fazla kalmayı tercih eden, yani daha fazla alıkonulan apolar maddelerin ayırımında kullanılır. Ters faz yönteminde en çok polar bileşenler en önde yürür ve hareketli fazın polaritesindeki artış, elüsyon zamanını artırır.

Tablo 2.3. Ters faz ve normal faz sıvı kromatografilerinin karşılaştırılması

	Ters Faz	Normal Faz
Sabit faz polaritesi	Düşük	Yüksek
Hareketli faz polaritesi	Ortadan yükseğe	Düşükten ortaya
Elüsyon sırası	Polar önce	Az polar önce
Hareketli faz polarite artışının etkisi	Elüsyon zamanını artırır	Elüsyon zamanını azaltır

Ters faz sıvı ve normal faz sıvı kromatografisinde madde, polaritesinin sabit faz polaritesine yakınlığına göre kolonda alıkonulur ve hareketli faz polaritesine yakın olan maddeler kolonu önce terk eder (Tablo 2.3.).

Ters faz sıvı kromatografisi, günümüzde en çok kullanılan ayırım tekniğidir. İlaç analizlerinde genel olarak ters faz sıvı kromatografisi normal faz sıvı kromatografisine göre tercih edilir.

Bunun nedenleri; normal faz kromatografide, sıvı fazın kontrolü çok önemli ve kritiktir. Hareketli faz bileşimindeki küçük değişiklikler kromatogramda belirgin farklılıklara neden olabilir. Ters faz sıvı kromatografisinin uygulaması ve sistem kontrolü daha kolaydır. Dengeye ulaşma normal faz kromatografide çok yavaştır.

Normal faz kromatografide polar maddelerin elüsyonu çok yavaştır ve yayvan piklere sebep olur.

Normal faz kromatografisinde kullanılan apolar çözücüler çok pahalıdır, ayrıca nemden uzak tutmak zordur. Ters faz kromatografisinde hareketli faz bileşiminde kullanılan organik çözücüler daha ucuzdur ve sulu tampon çözeltilerinin oranı yüksek tutulabilir.

İlaçlar genellikle daha apolar yapıdadırlar ve ters faz kromatografisinde kullanılan sabit fazda apolar yapıdadır.

c. İyon değiştirme kromatografisi: Sabit faz; zayıf ya da kuvvetli, katyon ya da anyon değiştirici bir reçine, hareketli faz ise genellikle tamponlanmış, istenen iyonların oluşmasına neden olan belli bir pH değerinde sulu çözelti olabilir.

Sabit fazdaki iyonlarla numunedeki aynı yükteki iyonların karşılıklı yer değiştirmesi esasına dayanır. Maddenin mutlaka iyonik halde olması veya iyonlaşması gerekir. Katıya kuvvetle bağlanan, uygun yükte bileşenler kolonda uzun süre kalır. Bu kromatografi çeşidi ilaçlar ve bunların metabolitleri, serumlar, gıda koruyucu

maddeler, vitamin karışımları, şekerler ve farmasötik preparatlar gibi çok farklı organik ve biyokimyasal sistemlere uygulanmaktadır. Bu kromatografi çeşidi, süt, kahve, şarap ve diğer ticari gıda ürünleri gibi çok sayıdaki maddenin teşhisi ve tayini için kullanılabilir.

d. Boyut eleme kromatografisi: Sabit faz; katı, jel yada gözenekli organik bileşik, hareketli faz ise sıvıdır. Maddeler molekül büyüklüğüne ve biçimine göre ayrılırlar. En içteki gözeneklere ulaşabilen küçük moleküllü bileşenler, kolonda uzun süre kalır. Jel geçirgenlik veya jel filtrasyon kromatografi adı da verilen bu kromatografi çeşidinde 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.

e. İyon çifti kromatografi: İyonik türlerin ayrılması ve tayini için kullanılan bir tür ters faz dağılma kromatografisidir. İyon-çifti kromatografideki hareketli faz metanol veya asetonitril gibi bir organik çözücü içeren bir sulu tampon ve tayin edilecek analit ile zıt yüklü karşıt iyon içeren bir iyonik bileşikten meydana gelmiştir. Karşıt iyon, analit ile birleşerek ters faz dolgu maddesi ile alıkonulabilen nötral iyon çifti oluşturan bir iyondur. Hareketli faza ilave edilen iyon çifti reaktif sabit faz tarafından adsorplanır ve iyonize olmuş maddeler bu iyon çiftleri ile iyonik etkileşime girerek birbirinden ayrılır. İyon çifti oluşturuvcu maddeler kuyruklanmayı engeller ve pik keskinliğini arttırlar. İyon çifti oluşturuvcu maddeler genel olarak; kuaterner aminler, tersiyer aminler, alkil sülfonik asitler, alkil sülfonatlardır.

f. Afinite kromatografisi: Alıkonma mekanizması maddeye özgün olmakta ve anahtar-kilit modeline uygun biyolojik materyaller dolgu malzemesi olarak kullanılmaktadır. Maliyetinin çok yüksek olması uygulama alanını kısıtlamaktadır. Enzim, hormon, protein saflaştırılmasında kullanılır.

2.3.2.2. Uygulama tekniğine göre sınıflandırma

a. Düzlemsel kromatografi: Sabit faz; katı, silikajel, alüminyumoksit ile kaplanan cam, plastik veya metal yüzeylerin ince bir plakası veya süzgeç kağıdı gözeneklerine yerleşen sudur.

Her maddenin hareketli faz ile sürüklenmeleri farklıdır. Hareketli faz, düz bir plaka üzerine veya bir kağıdın gözenekleri arasına tutturulan sabit faz arasından kapiler etkisi ile veya yerçekimi etkisi ile hareket eder. Hızlı sonuç vermesi, iyi bir ayırım sağlaması ve ekonomik uygulama avantajları nedeni ile önemli bir yere sahiptir.

b. Kolon kromatografisi: Sabit faz; katı, silikajel, selüloz, alüminyumoksit, hareketli faz ise; sıvı, organik çözücüler (metanol, petrol eter, metilen klorür, etanol, benzen, etil asetat, aseton, toluen, dietil eter, karbon tetraklorür, n-butanol izopropanol)'dir.

Ayrımı yapılacak karışım uygun bir çözücüde çözülerek bir kolon içine doldurulmuş katı sabit fazdan geçirilir. Kolonda bileşenler sabit faz tarafından adsorblanırlar. Hareketli faz basınç altında veya yerçekimi etkisi ile kolondan geçirilerek bileşenler kolonun altından ayrı ayrı alınır. Çözücüsü buharlaştırılarak saf madde elde edilir. Sabit fazın kuvvetle tuttuğu maddeler kolonda uzun süre kalır. Kolon kromatografisi biyomoleküllerin saflaştırılmasında sıklıkla kullanılır.

2.3.2.3. Faz tiplerine göre sınıflandırma

a. Gaz kromatografisi: Uçucu olan veya uçucu hale getirilebilen maddelerin belirli bir sıcaklıkta, bir taşıyıcı gaz yardımıyla, sabit bir faz içinde ayrılmaları esasına dayanan kromatografik bir yöntemdir. Maddelerin ayrılmasında gaz kromatografisini uygulayabilmek için maddelerin gaz halinde olması ya da kolaylıkla buharlaştırılabilmesi gerekmektedir.

Gaz kromatografisi de, öteki kromatografi dalları gibi bir karışımda bulunan maddeleri ayırmaya yarar. Bu kromatografi dalında da, sabit ve hareketli olmak

üzere iki faz mevcuttur. Hareketli faz He, N₂, Ne ve Ar gibi inert gazlar olup taşıyıcı gaz olarak adlandırılmaktadır. Bundan dolayı, öteki kromatografi dallarında olanın aksine bu kromatografi dalında ayrılmaları istenen maddelerle sabit faz arasında hiçbir etkileşme olmaz. Hareketli fazın görevi sadece maddeleri taşımaktır. Sabit faz, bir katı veya bir katı yüzeyine adsorplanmış (katıya emdirilmiş) bir sıvı olabilir. Buna göre gaz kromatografisi ikiye ayrılır:

Sabit fazı sıvı olan gaz-sıvı kromatografisi (GLC): Sabit faz, uzun bir kolon içine yerleştirilmiş geniş yüzeyli dolgu maddelerine emdirilmiş bir sıvıdır (polimerler).

Sabit fazı katı olan gaz-katı kromatografisi (GSC): Sabit faz uzun bir kolon içine yerleştirilmiş geniş yüzeyli dolgu maddeleridir (silikajel, alümina).

Ayrımı istenen karışım, bir enjektör yardımıyla enjeksiyon kısmına enjekte edilir. Enjektör bölümü ısıtılmış durumdadır, karışım hemen buharlaşır ve buhar halinde inert taşıyıcı gaz ile birlikte kolona girer. Kolonda her bileşik kaynama noktasına, molekül büyüklüğüne ve kolondaki sabit faz ile etkileşimine bağlı olarak kolonda farklı hızlarda göç ederek devamlı taşınırlar ve böylece birbirlerinden ayrılarak farklı zamanlarda kolondan çıkarlar. Kolondan çıkan herbir bileşen dedektöre girer, dedektörde bileşenlerin miktarı ile orantılı olarak belirlenir ve kaydedicide grafik olarak çizilir. Her bileşik alıkonma zamanı ile belirlenir. Alıkonma zamanı bir bileşiğin enjekte edilmesinden dedektörden çıkışına kadar geçen süredir. Bu süre her bileşik için farklıdır.

b. Sıvı kromatografisi: Daha öncede anlatıldığı gibi hareketli fazı sıvı olan kromatografi çeşitleri dağılma kromatografisi, adsorbsiyon kromatografisi veya sıvı-katı kromatografisi, iyon değişimi kromatografisi ve boyut eleme veya jel kromatografisidir.

Bir sıvıda çözünmüş ayrılacak bileşenler, bir kolon içerisinde bulunan genellikle katı bir destek üzerindeki sabit faz ile farklı etkileşmelere girerek, kolon içinde değişik hızlarda ilerler. Kolonu değişik zamanlarda terkederler ve böylece birbirlerinden

ayrılırlar. Teknolojinin ilerlemesiyle klasik yer çekimi-akışlı sıvı kromatografinin basit cam kolonlardaki durumun aksine, (kolon boyunca hareketli fazın ilerlemesini sağlamak için) yüksek basınçta çalışan, gelişmiş cihazlara ihtiyaç duyulmuştur. Bu tür kolonlarda yüksek basınç altında (100-400 atm) gerçekleştirilen kromatografi türüne yüksek basınçlı (performanslı) sıvı kromatografisi (YPSK) adı verilir. Burada taşıyıcı faz olan sıvı, pompalarla kolona basıldığından yüksek akış hızındadır. Bu nedenle ayırma daha kısa sürede ve tam olarak gerçekleşmektedir.

2.3.3. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

Yüksek performanslı sıvı kromatografisinde hareketli faz sıvı, durgun faz ise katı veya katı destek maddesi üzerine tutturulmuş sıvı fazdır.

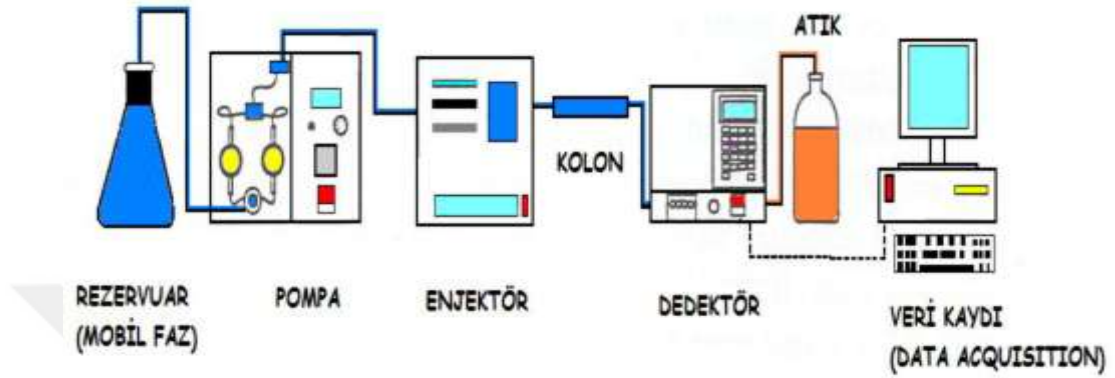
YPSK; yüksek performans, yüksek hız ve yüksek ayırıcılığı ifade eder ve bütün analitik ayırma teknikleri arasında en yaygın kullanılanıdır. Yöntemin bu kadar yaygın olmasının sebepleri, duyarlılığı, kesinliği ve seçiciliğinin yüksek olması, kantitatif tayinlere kolaylıkla uygulanabilir olması, uçucu olmayan türlerin veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen türlerin ayrılmasına uygun olması ve sanayinin, birçok bilim dalının ve halkın birinci derecede ilgilendiği ilaçlar ve gıda bileşenleri gibi 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. Kısacası, uygun dedektör, uygun kolon ve uygun hareketli faz olduğu sürece bütün kimyasal maddelerin ayrılmasında ve analizinde YPSK kullanılabilir.

2.3.3.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazı

Sıvı Kromatografisi cihazı (Şekil 2.1.) aşağıdaki birimlerden oluşur:

- a. Hareketli (taşıyıcı) faz haznesi
- b. Pompa: Taşıyıcı faz hareket birimi
- c. Numune enjeksiyon sistemleri: Enjeksiyon (örnek yükleme) birimi

- d. Kolon: Ayırma birimi
- e. Dedektör: Ölçüm birimi
- f. Kaydedici: Yazım birimi
- g. Atık deposu



Şekil 2.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazının şematik gösterimi

Hareketli fazı kolona gönderen pompadır. Pompa hareketli faz deposundan aldığı çözücüyü önce enjeksiyon sistemine gönderir. Örneğin rahat yüklenmesi ve hareketli faz akışının enjeksiyondan etkilenmemesi için örnek çok uçlu bir vananın içerdiği kangala verilir. Vananın pozisyonu değiştirilerek hareketli fazın kangaldan geçmesi, dolayısıyla enjeksiyon sağlanır. Çözücü enjeksiyon sisteminden geçtikten sonra, sıvı kromatografisi sisteminin ayırma birimi olan kolona gelir. Koşullar iyi ayarlandığında, kolonda birbirinden ayrılan maddeler taşıyıcı faz ile birlikte ölçüm birimi olan dedektöre gelirler. Dedektör maddenin derişimi ile doğru orantılı bir özelliğini ölçmelidir. Akış hücresine gelen madde derişimi ve/veya cinsi değiştiğinde dedektör sinyalinde değişiklik olur. Kaydedici, zamana göre dedektörden gelen sinyali (voltaj değişimini) kaydeder.

a. Hareketli faz haznesi: Bir YPSK cihazı, bir veya daha fazla, her biri 200-1000 mL çözücü içeren camdan veya çelikten yapılmış hareketli faz hazneleri içerir. Bu hazneler çoğunlukla kolonda veya dedektör sisteminde bozucu etkilere neden olan çözünmüş gazların (özellikle oksijen ve azot) giderilmesi için bir bölüm (gaz giderici) ile donatılmıştır. Ayrıca bu hazneler, çözücü içinde bulunabilecek toz ve partikül halindeki maddelerin pompaya veya enjeksiyon sistemine zarar vermemesi

yada kolonu tıkamaması için toz ve partikül maddeleri süzmeye yarayan bir süzme düzeneği de içerirler. Hareketli fazın cihaza verilmeden önce süzülmesi ve çözünmüş gazlarının giderilmesi gerekir. Aksi halde sistemin düşük basınçlı kısmı olan dedektörde, çözünmüş gazlar (özellikle hava) kabarcık oluşturur. Bu durum, dedektörden çok hatalı değerler alınmasına neden olur. Süzme işlemi için 0,45-0,6 µm 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 ultrasonik banyoda (ultrasonikatör) bekletme veya çözücünden inert bir gaz geçirme işlemleri uygulanabilir.

Hareketli faz su ve/veya sulu tampon içeriyorsa kimyasal bozunma veya mikrobiyolojik üreme sonucunda kolonu tıkayabilir. Bu nedenle, YPSK analizleri sırasında taze hazırlanmış hareketli faz çözücüleri kullanılır [21, 26, 28].

İyi bir hareketli faz; sabit fazın özelliklerini değiştirmemeli, örnekteki bileşenlerin hepsini çözmeli, düşük viskozitede olmalı, (gerektiğinde) ayrılan bileşenlerden kolayca ayrılabilmesi (kolayca buharlaşabilmesi), kullanılan dedektöre uygun olmalı, ekonomik ve istenen saflıkta kolayca bulunabilir olmalıdır.

İzokratik ve gradient elüsyon: Sabit bileşimde tek bir çözücü kullanılarak yapılan ayırma izokratik elüsyon olarak adlandırılır. Polariteleri önemli derecede birbirinden farklı iki veya üç çözücü sistemi kullanılarak yapılan ayırma ise gradient elüsyondur. Gradient elüsyonda; sisteme gönderilen hareketli faz bileşimi veya akış hızı gibi parametreler, elüsyon başladıktan sonra belli bir programa göre, sürekli veya bir seri basamaklar halinde değiştirilerek ayırma işlemi gerçekleştirilir. YPSK cihazları, çözücülerin hacimsel oranı zamanla doğrusal olarak veya üstel olarak değiştirilebilecek şekilde, iki veya daha fazla hazneden aldığı çözücüleri bir karıştırma odasında sürekli olarak değişen oranlarda bir araya getiren sistemlerle donatılmıştır. İzokratik elüsyon ile ayrılamayan maddeler gradient elüsyonla ayrılabilmekte, madde karışımlarının alıkonma zamanları kısaltılabilmektedir.

b. Pompa: Bir YPSK sisteminde pompanın görevi hareketli fazın kolon boyunca akışını sağlamaktır. Hareketli fazı kolona gönderen pompadır. YPSK uygulamalarında mobil fazı oluşturan çözücü karışımlarının, enjektör, kolon ve dedektör içerisinden belirli, sabit veya değişken bir hızda, belirli basınç altında geçmesini sağlar. Modern YPSK donanım pompaları bilgi işlemci kontrollü olup, çeşitli firmalar tarafından değişik modellerde üretilmektedir. Pompa imalinde paslanmaz çelik, titanyum, polietilenketon, teflon ve seramik materyaller kullanılır. Bir YPSK pompalama sistemi için gerekli şartlar şunlardır; 400 atm'ye kadar basınç üretimi, puls içermeyen basınç çıkışı, 0,1-10 mL dk⁻¹ aralığında akış hızları, % 0,5 veya daha iyi bir tekrarlanabilirlikle akış kontrolü, korozyona dayanıklı parçalar.

Pistonlu pompalar: Genellikle motor kontrollü bir pistonun ileri ve geri hareketiyle çözücünün pompalandığı küçük bir silindirden meydana gelmiştir. Pistonlu pompaların üstünlüğü, küçük iç hacimleri, yüksek çıkış basıncı, gradient elüsyona uyarlanmaya hazır oluşları ve kolon geri basıncından ve çözücü viskozitesinden büyük ölçüde bağımsız olan sabit akış hızlarıdır. Pistonların biri emerken diğeri bastığından sıvı kromatografisi için çok önemli olan düzgün akış elde edilir.

Sürgülü pompalar: Bir kademeli motordan güç olan 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 (≈ 250 mL) ve çözücü değiştirilmesi gerektiğinde karşılaşılan güçlüklerdir.

Pnömatik pompalar: 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.

c. Numune enjeksiyon sistemleri: Enjektör; örneğin sabit faz (kolon) öncesinde mobil faza enjekte edilmesi için kullanılır. YPSK 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 (5 μ L'den 500 μ L'ye kadar) çok küçük olmalıdır ve sistemin basıncını düşürmeden numunenin sisteme girişinin sağlanması gereklidir.

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

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.

Otomatik enjektör (autosampler): 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.

d. Kolon: Bileşenlerin birbirinden iyi çözünürlükle ayırımından sorumlu sabit fazdır. Kolon imalatında yapı materyali olarak 316 paslanmaz çelik, teflon, cam veya PEEK en sık tercih edilenlerdir. Kolonun ayırım gücü ve performansı yapıldığı materyalden çok, iç yüzeyine yapılan kaplamada kullanılan malzemenin kimyasal ve fiziksel özelliklerinden etkilenmektedir. Kullanılan bu tür kaplama malzemeleri çok çeşitli olup, kullanılacak mobil fazın ve uygulanacak YPSK metodunun özelliklerine ve analizi yapılacak örneğin bilinen kimyasal ve fiziksel özelliklerine göre seçilmelidir. Seçilecek kolonun YPSK uygulamasında kullanılacak akış hızı ve dolayısıyla

oluşacak basınca dayanıklı olmasına dikkat edilmelidir. Birçok analitik kolonun iç çapı 2-5 mm aralığında değişmektedir. Kolon iç çapı arttıkça akış hızı ve iç doldurma hacmi artmakta ama oluşacak piklerin çözünürlüğü dolayısıyla duyarlılık azalmaktadır. Sıvı kromatografi kolonları, düz veya sarmal olabilirler. Kolonların boyları (uzunluğu) çok çeşitli olup genellikle 5-30 cm aralığında değişmektedir. Kolonların iç çapı 2-5 mm, kolon dolgu maddelerinin tanecik büyüklüğü ise genellikle 5-10 µm arasındadır. Günümüzde en sık kullanılan kolon 25 cm uzunluğunda, 4,6 mm iç çapında ve 5 µm tanecik büyüklüğüne sahip kolonlardır. Kolon uzunluğu arttıkça örnek bileşenlerinin ayırımı daha iyi olmakta fakat analiz süresi uzadığı için daha fazla mobil faz harcanmaktadır. Son yıllarda hız ve minimum çözücü sarfıyatı bakımından diğer kolonlara göre üstünlük sağlayan daha küçük boyutlarda yüksek hız ve yüksek performanslı kolon üretimi de söz konusudur.

Emniyet (koruyucu) kolonu: Analitik kolonun ömrünü artırmak amacıyla analitik kolondan önce genellikle kısa bir kolon yerleştirilir. Bu kolonların görevi partikül haldeki maddeleri, çözücü içindeki yabancı maddeleri tutmak, numune içinde bulunan ve sabit faza tersinmez olarak bağlanan bileşenleri tutmaktır. İlave olarak hareketli fazı sabit faz ile doyurarak analitik kolondaki çözücü kaybının en aza indirilmesini sağlar. Bu emniyet kolonunun tanecik boyutu, basınç düşüşünü en aza indirmek amacıyla genellikle büyüktür. Emniyet kolonundaki dolgu maddesi analitik kolondaki dolgu maddelerinin benzeridir. Emniyet kolonu kirlendiği zaman yenisiyle değiştirilmek suretiyle daha pahalı olan analitik kolonun korunması sağlanır [23, 29, 30].

Kolon termostatları: Kolonların sıcaklığını kontrol etmek gerekli olmakla birlikte genellikle kolonlar oda sıcaklığında kullanılırlar. Ancak kolon sıcaklığı sabit tutulduğu zaman elde edilen kromatogramların daha iyi olduğu gözlenmiştir. Buna dayalı olarak, kolonların sıcaklığının 100-150 °C'ye kadar her sıcaklıkta sabit tutabilen kolon ısıtıcıları ve kolonların bağlı bulunduğu sabit sıcaklıktaki bir su banyosu tarafından beslenen su ceketini kullanımı da mümkündür.

Kolon dolgu maddeleri ve özellikleri: YPSK cihazında kullanılan kolonlar, yüksek basıncı korumak için paslanmaz çelikten yapılmışlardır. Bunlar düzgün bir iç çapa sahiptirler ve ticari olarak değişik büyüklüklerde mevcuttur. Bir kromatografik sistemin performansı, kolonda gerçekleştirilen ayırma ile yani kolon dolgu maddesinin seçilmesi ve kullanılması ile tayin edilir. İyi bir kolon dolgu maddesi kararlı olmalıdır ve hem hareketli faz çözücülerine hem de örnek çözeltilere karşı inert olmalıdır. Ayrıca geniş bir yüzey alanına düzgün olarak dağılmış ve hareketli fazla kolay etkileşebilen, açık yapılı bir yüzeye de sahip olmalıdır. Aynı zamanda yüksek basınç ve yüksek akış hızlarından da etkilenmemelidir.

Sıvı kromatografide temel olarak iki tip kolon dolgu maddesi kullanılmaktadır. Bunlar film dolgular ve gözenekli dolgulardır. YPSK çalışmalarında sabit faz olarak en çok kullanılan dolgu maddesi silikajeldir. İçerdiği SiOH grupları nedeniyle zayıf asidik özellik gösteren silikajel, bazik özellik gösteren bileşikler bazlık kuvvetlerine göre tutar. Silikajel doğrudan dolgu maddesi olarak kullanıldığı gibi, katı yüzeyine film halinde de kaplanabilir. Asidik özellik gösteren bileşiklerin ayrılmasını sağlayan, yani bazik özellik taşıyan bir kolon dolgu maddesi de aluminadır. Bu dolgu maddesi de katı bir yüzeye film halinde kaplanarak kullanılır.

e. Dedektör: Kolonda ayırımı yapılan analizlenecek maddeye ait bileşenlerin alıkonma zamanlarına göre sırayla içerisinden geçerken miktar tayinlerinin yapıldığı YPSK donanımdır. Kullanılacak dedektörün türü analizlenecek maddenin fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre seçilmelidir.

Sıvı kromatografide kullanılan dedektörler iki başlık altında toplanabilir:

Yığın Özellikli Dedektörler: Bunlar analit tarafından değiştirilen yığın özelliklerine cevap verirler. Hareketli fazın kırılma indisi, dielektrik sabiti ve yoğunluğu gibi özelliklerinin değişimi sonucu ölçüm yapılır.

Analit Özellikli Dedektörler: UV absorbansı, floresans şiddeti gibi analitin sahip olduğu, fakat hareketli fazın sahip olmadığı özelliklere cevap verirler. Bu

özelliklerdeki değişimler ölçülerek sonuç elde edilir. Bilimsel araştırmalarda en çok kullanılan dedektör tipleri; UV absorbands, floresans, kırma indisi, elektrokimyasal ve kütle spektrometrisi dedektörleridir.

Ultraviole-görünür bölge dedektörler (Ultraviolet/Visible dedector-UV/VIS): 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. Çoğu ilaç analizinde kullanılan UV-GB dedektörler, maddenin ışığı absorplayıp absorplamadığını anlamak için ışık kaynağından gelen ışığın şiddetinin ölçülmesi amacıyla kullanılan dedektörlerdir. Ayrıca, UV-GB dedektörleri bir ya da daha fazla dalga boyunda ölçüm yapabilme olanağı da sağlar. Absorbans ölçülür. Lambert-Beer yasası geçerlidir. Bunlar iki tiptir:

Sabit dalga boylu dedektörler: Basit bir dedektör olup, dalga boyunun seçimi için farklı interferanslı filtreler kullanılır. Bu dedektörlerde genellikle UV kaynağı olarak civa lambası kullanılır. Bunun dışında alternatif ışık kaynakları ile daha değişik dalga boylarını gözlemekte mümkündür.

Değişken dalga boylu dedektörler: 108-400 nm arasında sürekli ışık verebilen döteryum lamba ya da 400-800 nm arasında ışık veren bir tungsten lambaya sahip ve istenilen dalga boyunu seçmek için de bir monokromatör taşıyan fotometrelerdir. Maddenin maksimum absorpsiyonunun bulunduğu dalga boyunda çalışma olanağı sağlayan bu dedektörler, hassasiyeti arttırdığı için ve düşük dalga boyunda çalışabildiği için son derece kullanışlıdır.

Diyod sıralı dedektörler (DAD): Değişken dalga boylu UV-GB dedektörlerdir. Hem sabit hem de taramalı dalga boylarında incelemeye müsait olan dedektörlerdir. Kullanılan ışık kaynağı döteryum veya tungsten lambadır. 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.

Diyod array dedektörler, seçimlilik ve hassasiyet açısından değişken dalga boylu UV dedektör ile aynı avantajlara sahiptir. Bunlara ek olarak, aynı anda spektrumun bütün dalga boylarında piklerin ölçümü yapılabilir yada istenilen dalga boyu aralığı ayarlanarak ölçüm alınabilir. Çok hızlı spektrum taraması yapılabilir ve istenilen pikin üç boyutlu kromatogramı alınabilir. 512 elementden oluşan bir yüzeyde, her elementin ayrı bir dalga boyundaki absorbansı eş zamanlı olarak ölçülebilir. Analiz edilecek maddelerin maksimum dalga boyları farklı olduğunda DAD'ler birden fazla dalga boyunda ölçüm alabilir.

Spektrumların çakıştırılması yöntemi ile kromatografik piklerin saflık kontrolü veya birden fazla pikten oluşup oluşmadıklarının tayini yapılabilir. 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.

f. 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.

2.3.3.2. YPSK sistem türleri

- a. İzokratik sistem (tek pompa, tek solvent, solvent karışım olabilir, ayırım yetersiz)
- b. Düşük basınçlı gradient sistem (tek pompa, max 4 farklı mobil faz, karışma pompadan önce)

- c. Yüksek basınçlı gradient sistem (2 yada 3 pompa, 2 yada 3 farklı mobil faz, karışma pompadan sonra)

2.3.3.3. YPSK’de ayırma teknikleri

- a. Normal faz (Normal phase-NP) (ilk geliştirilen teknik, kolon polar, mobil faz apolardır, kullanılan kolonlar silikajel, cyano, amino, diol veya nitro kolonlardır)
- b. Ters faz (Reverse phase-RP) (en sık kullanılan teknik, kolon apolar, mobil faz polardır, kullanılan kolonlar C₁₈, C₈, C₄, phenyl, TMS, cyano’dur)
- c. Ters faz iyon çifti (Reverse phase ion pairing-IP)

2.3.3.4. YPSK yönteminin avantajları

- a. YPSK kolonu, rejenerasyon gerekmeksizin pek çok kez kullanılabilir.
- b. Duyarlılığı yüksektir.
- c. Kantitatif tayinlere (nicel analiz) kolayca uygulanabilir.
- d. Uçucu olmayan, sıcaklıkla kolayca bozunabilen türlerin ayrımı için uygundur.
- e. Pek çok maddeye geniş şekilde uygulanabilir.
- f. Aynı sabit faz kullanılarak farklı hareketli faz sistemleriyle aynı anda birçok maddenin duyarlı olarak miktar tayininin yapılmasına olanak sağlar.
- g. Numunedeki maddelerin, bozulma ürünlerinin yanında miktar tayinlerine olanak sağlar.
- h. Biyolojik sıvılardan gerek ilaç etken maddelerinin, gerekse metabolitlerinin analizi için geniş bir kullanım alanına sahiptir.
- ı. YPSK tekniği kullanıcının becerisine daha az bağımlıdır ve tekrarlanabilirlik daha yüksektir.
- i. Analiz süresi kısadır.
- j. Burada numunenin miktarı çok az da olsa sonuç alınabilir.

2.3.3.5. YPSK yönteminin dezavantajları

- a. Ekonomik olarak pahalı sabit faz ve hareketli faz sistemlerine gereksinim göstermektedir.
- b. Hareketli faz sistemlerinin mutlaka pahalı membran sistemlerinden süzülmesi gerekmektedir.

2.3.3.6. Yüksek performanslı sıvı kromatografisinin uygulama alanları

YPSK, benzer yapılı kimyasal maddelerin ayrılması, saflaştırılması ve belirlenmesi işlemlerinde oldukça yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. İlaç etken maddesinin hızlı, duyarlı ve güvenilir analizini yapmaya yarayan bir yöntemdir. Bu yöntemle saflık ve kalite kontrolü, stabilite tayini ve reaksiyon sırasında reaksiyon ara ve sonuç ürünlerinin saptanması ile enantiyomer ayırımları sağlanabilmektedir. Biyolojik materyallerde ilaç ve ilaç metabolitlerinin analizine de olanak sağlayan bu yöntemde, plazmadaki ilaç düzeyinin saptanması, doz ayarlanması ve biyoyararlılık gibi konularda çalışmalar yapılabilir.

2.3.3.7. Saflaştırma

Herhangi bir karışım içerisindeki hedef bir bileşiğin, diğer bileşiklerden ya da safsızlıklardan ayrılmasıdır. Saflaştırma işleminde, saflaştırılacak bileşiğin özelliklerine uygun hareketli faz ve kolon seçimi yapıldığında iyi bir ayırım gerçekleştirilebilir. Ayrıca yüksek saflık elde edebilmek için de diğer bileşiklerin kolon içerisindeki göç hızlarının yeteri derece birbirinden farklı olması gerekmektedir.

2.3.3.8. Kalitatif analiz

Az sayıda ve bilinen türleri içeren karışımlardaki bileşenlerin varlığını tanımak amacıyla YPSK yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Örneğin, tek bir kromatogramla, bir peptit parçalanmasında 30 kadar aminoasit yeterince kesin bir şekilde

görülebilmektedir. Öte yandan kromatogram, karışımdaki her tür için, tutulma süresi gibi yalnızca tek bir bilgi içerir. Bu nedenle anılan tekniğin bilinmeyen bileşimdeki karmaşık numunelere uygulanmasındaki başarısı sınırlıdır. Bunun için YPSK kolonunun NMR, infrared veya kütle spektrofotometrelerine bağlanmasıyla oluşturulan ikili cihazlar, bu sınırlamaları önemli ölçüde ortadan kaldırmıştır.

2.3.3.9. Kantitatif analiz

YPSK'nin çalışmalarda çok kullanılması, onun kantitatif analizlerde kullanılabilir olmasından kaynaklanmaktadır. Kantitatif analizde, analit pik yüksekliği veya pik alan değerleri derişime karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edilir. Sonra bilinmeyen maddenin derişimi kalibrasyon eğrisi yardımıyla bulunur [31, 32].

2.3.3.10. YPSK metodunun geliştirilmesi

YPSK analizlerinde öncelikle bir metodun tanımlanması ve geliştirilmesi gerekliliği vardır. Metod geliştirme aşamasında, öncelikle aşağıdaki deneysel koşullar ve deneysel verileri uygulamalı olarak saptanmalıdır.

- a. Örneğe ait fiziksel ve kimyasal özelliklerin belirlenmesi
- b. Örnek hazırlanmasına ait detayların belirlenmesi
- c. Dedektör seçiminin yapılması
- d. Kromatografik ayırma koşullarının saptanması
- e. Kromatografik ayırma koşullarının optimize edilmesi
- f. Muhtemel problemler için özel çözüm işlemlerin saptanması
- g. Rutin laboratuvar analizleri için metodun validasyonu

Elde edilen veriler analizi istenilen hassasiyette olanaklı hale getiriyorsa bir sonraki aşama olarak metodun yazılması yani tanımlanması gerçekleştirilir.

2.4. Validasyon

Validasyon, ürün kalitesine etki edebilecek tüm imkân ve işlemlerin önceden belirlenmiş spesifikasyonları sağlayacak şekilde işlendiğini garanti altına almak amacıyla yürütülen çalışmalardır [33]. Validasyon;

- a. GMP kuralları (Good Manufacturing Practices) için yapılması gerekir.
- b. Kaliteyi güvence altına alır, değişkenliği en aza indirger.
- c. İyi kontrol edilmiş, güvenilir prosesler oluşmasını sağlar. Çünkü kimyasal sonuçlardan elde edilen bilgiler güvenilir olmalıdır.
- d. Cihaz ve prosesler hakkında daha iyi bilgi sahibi olunmasını sağlar.
- e. Bozuk çıkan malın imhası, yeniden işlem görmesi, yeniden numune alınması, ekstradan analiz yapılması gibi olaylardan dolayı maliyeti azaltır.
- f. Verimliliği artırır.
- g. Organizasyon içinde bulunan birimlerdeki koordinasyon, iletişim ve bilgi akışını artırır.

Validasyonun temel işlemleri, aslında yapılan tüm işi tanımlamaktır. Aynı zamanda, tanımlanan işlemi kanıtlamak ve bu kanıtlanan bulguları tekrarlayıp, sonuçları yorumlamaktır. Validasyon işlemi, tüm ürünlerin kalite kontrollerine uygulanabilir. Ülkemizde validasyon işlemi genellikle ilaç sektöründe geniş uygulama alanı bulmaktadır. İlaç endüstrisinde uygulanan validasyon çeşitleri:

Temizlik yöntemleri validasyonu: İmalat alanında bulunan tüm imalatla ilgili cihazların temizlenmesinde uygulanacak olan validasyon işlemleridir.

Analitik yöntem validasyonu: Analitik prosedürün kalitatif ve kantitatif olarak doğru sonuçlar verdiğini belirleyen çalışmalardır.

Makine/cihaz validasyonu: Cihazın doğru bir şekilde çalışıp çalışmadığını, fonksiyonlarını doğru bir şekilde yerine getirip getirmediğini gözlemlemek amacıyla yapılan çalışmalardır.

Proses validasyonu: Spesifik olarak bir ürünün araştırma kademesinden son ürün haline gelene kadar geçen sürede yapılan validasyondur [34].

2.4.1. Analitik yöntem validasyonu

Analitik yöntem validasyonu tasarlanmış analitik yöntemin kabul edilebilirliğini kanıtlamak ve aynı zamanda analitik prosedürün kantitatif ve kalitatif olarak doğru sonuçlar verdiğini belirleyen sonuçlar elde etmektir. Kısacası, analiz yönteminde kullanılacak olan tüm parametreleri ve yapılacak tüm işlemleri tanımlar [33].

Yöntem validasyonu hazırlanırken dikkat edilmesi gereken hususlar şunlardır:

- a. Yöntem validasyonu, rutin çalışmalarda kullanılan örnek, reaktif veya standartların laboratuardaki deneyimlerini göstermeli
- b. Kullanılan reaktifler ve standartlar, bileşenin saflığı ve doğruluğu için kontrol edilmeli
- c. Bir validasyon planı hazırlanmalı ve adım adım hangi aşamaların yapılacağı belirtilmeli
- d. Özel bir yöntemin validasyonu; örnekler ya da bilinmeyen örnek ile aynı özellik gösteren standartlarla laboratuvar deneylerinde çalışılmalı, hazırlık ve yürütme ve validasyon protokolü izlenmeli
- e. Bir yöntemin validasyonu, analizin gerektirdiği koşullardan ayrılmamalı ve sapmamalı ve ayrıca yeni bir analitik yöntemin validasyonu ve geliştirilmesi bu süreç içinde tekrarlanabilir olabilmeli
- f. Her validasyon çalışması sırasında yöntem anahtar parametreleri belirlenmeli ve sonra gelen bütün validasyon adımlarında bu parametreler kullanılmalı, her defasında tekrarlanan çalışmaları minimuma indirmek ve yöntem koşulları sağlandıktan sonra bir sonraki çalışmalara geçilmelidir.

2.4.1.1. Analitik yöntem validasyonunda kapsam

Analitik yöntem validasyonu, yöntemin belirlenen amaç için uygun olduğunu ve yöntemin kapsamını göstermelidir. Aynı zamanda yöntemin performans özelliklerini de içermelidir. Yöntemin kabul edilebilir limitlerini içeren bir planda izlemelidir. Farklı tiplerde donanım ve yöntemin yürütüleceği yerin farklı koşullarda olduğunu da belirtmelidir. Farmakopede kayıtlı olan validasyon yöntemleri 3 grupta toplanır:

Etken madde analiz yöntemi: Hammadde veya bitmiş ürün içindeki koruyucu maddeler dâhil aktif maddenin tayininde kullanılan yöntemlerdir.

Safsızlık yöntemi: Hammaddedeki safsızlıkları veya bitmiş ürünündeki parçalanma ürünlerini tayin etmeye yarayan yöntemlerdir.

Bitmiş ürün analiz yöntemi: Performans özelliklerini tayin için kullanılan yöntemlerdir.

2.4.1.2. Analitik yöntem validasyon aşamaları

Analitik yöntem validasyonunda kimyasal ölçümlerden elde edilen verilerin doğruluğunu kanıtlayan delillerin sağlanması için adımların teker teker gerçekleştirilmesi gerekmektedir:

- a. İlk olarak bir validasyon protokolü seçilir.
- b. Uygulama ve amaç belirlenir, yöntemin kapsamı ve onun validasyon kriterleri belirlenir. Bu validasyon kriterleri önceden dikkat edilmesi gereken noktalar bölümünde belirtilen bileşenler, matriksler, analizin kalitatif yada kantitatif oluşu, tanıma ve miktar limitleri, çalışma aralığı, kesinlik ve doğruluk, donanım tipi ve analiz ortamıdır.
- c. Validasyon deneyleri belirlenir.
- d. Yöntem parametreleri ve kabul edilebilir limitler belirlenir.
- e. Standart ve belirteç gibi materyaller belirlenir.

- f. Yöntem parametreleri ve/veya kabul edilebilir kriterleri ayarlanır ve artık validasyon deneyleri uygulanmalıdır.
- g. Revalidasyon kriterleri belirlenir ve gerekiyorsa yöntem yeniden valide edilir.
- h. Analitik kalite kontrol denetimleri yöntemin rutini için belirlenir ve /veya sistem uygunluk testlerinin sıklığı ve tipi belirlenir.
- i. Son olarak validasyon deneyleri raporlandırılır.

2.4.1.3. Analitik yöntem validasyon parametreleri

Validasyon deneylerinin sırası hakkında resmi bir yönerge yoktur ve en uygun sıra yöntemin kendi özelliğine bağlıdır. Yöntem validasyonu için parametreler, farklı kuruluşlarda, uluslararası komitelerde ve literatürlerde çeşitli şekillerde tanımlanmıştır. Bazı tanımlar farklı organizasyonlar arasında farklı şekildedir. Farmasötik uygulamalar için International Conference on Harmonization gibi bazı organizasyonlar tarafından belirlenen aşağıda sırasıyla verilen parametreler izlenmelidir [35].

- a. Seçicilik (spesifiklik)
- b. Doğrusallık
- c. Çalışma aralığı
- d. Doğruluk ve geri kazanabilirlik
- e. Kesinlik (tekrarlanabilirlik)
 - 1. Laboratuvar içi tekrarlanabilirlik
 - 2. Laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik
- f. Tutarlılık
- g. Nitel tayin limiti (LOD)
- h. Nicel tayini limiti (LOQ)
 - 1. Güvenilirlik

İlaç analizlerinde genel olarak 3 yöntem kullanılır:

- Hammadde veya bitmiş ürün içindeki koruyucular dâhil aktif maddenin tayininde kullanılan yöntemler,
- Hammaddedeki safsızlıkları veya bitmiş ürünlerdeki parçalanma ürünlerini tayin etmeye yarayan yöntemler,
- Ürünün performans özelliklerinin tayini için kullanılan yöntemler.

Bu yöntemlerin amacına göre valide edilecek parametreler farklılık göstermektedir. Tablo 2.4.'de bu yönteme göre değişen parametreler gösterilmektedir.

Tablo 2.4. İlaç analizlerinde yöntemlere göre değişen parametreler

Parametreler	1. yöntem	2. yöntem		3. yöntem
		Kantitatif tayin testi	Limit	
Seçicilik	+	+	+	-
Doğrusallık	+	+	-	+
Çalışma aralığı	+	+	*	*
Doğruluk ve geri kazanım	+	+	-	*
Keskinlik	+	+	*	+
Tutarlılık	+	+	+	+
Tanıma limiti	+	+	+	*
Miktar tayin limiti	+	+	+	*

(*) Spesifik testlere bağlı olarak gerekilirse yapılır.

a. Seçicilik/spesifiklik: Spesifiklik, genellikle tek bir analit için üretilen yönteme karşılıktır. Seçicilik ise birbirinden ayırt edilen ya da edilemeyen kimyasal içerikler için kullanılmıştır. Kısacası; katkı maddeleri, değişik interferanslar varlığında analitin doğru olarak ölçebilen seçiciliğini tanımlar. Sıvı kromatografisinde seçicilik optimum ayırma ve kolon koşullarının seçimiyle elde edilmiştir. Seçiciliğin üstünlüğü, kullanılan analiz yönteminde sadece o etken maddeye özgü ve spesifik olduğunu ifade etmelidir. Bizim yöntemimiz sadece etken maddeyi ölçebilmeli ve diğerleri ile reaksiyon vermemelidir. Burada amaç, ilacın içindeki yardımcı maddeler ile etken maddenin ve bilinen bozunma ürünleri veya safsızlıkların birbirinden ayrı bir şekilde tanımlanabilir olmasıdır. Bunun için özellikle LC'de (Sıvı

Kromatografisi) uygun kolon ve kromatografi koşulları (mobil faz bileşimi, kolon sıcaklığı ve dedektör dalga boyu gibi) seçilmelidir [36].

b. Doğruluk ve geri kazanabilirlik: Yöntem ile elde edilen test sonuçlarının gerçek değerde uygunluğunun bir ölçüsüdür. Doğruluk değerlendirilmesi ise birçok yolla elde edilebilir. Referans yöntemi ile numune yönteminin karşılaştırılması bir yoldur. Bu yaklaşımda, referans yönteminin belirsizliği bilinmektedir.

Doğruluk, konsantrasyonları bilinen bir numunenin analizi yolu ile de tayin edilebilir. Örneğin; bir sertifikalı numune ve ölçülmüş doğru değer kıyaslanır. % geri kazanım, bulunan sonuçların gerçek değere yakınlığının ölçülmesidir. Elimizde sertifikalı örnek bulunmuyorsa, boş numune matriksine konsantrasyonu bilinen hacimde ve ağırlıkta analit eklenir. Sonra matriksten, analitin ekstraksiyonu sonucu elde edilen analitin standart çözeltilere göre geri kazanımları hesaplanır. Bu sayede plaseboya ilave edilen etken maddenin tam olarak geri kazanıp kazanılmadığı anlaşılır. Elde edilen geri kazanım değerleri % 100 ± 3 limitleri içinde olmalıdır. Ama analit konsantrasyonu çok düşük olduğu zaman bu sınır genişler. Beklenen geri kazanım, numune matriksine, işleme konulan örneğe ve analit konsantrasyonuna bağlıdır. Bu doğruluk değerlendirilmesi numune preparatın etkinliğini ölçmektedir [34].

c. Kesinlik: Bir yöntemin kesinliği, birkaç kez enjeksiyon yapıldığında sonuçların birbirine uygunluk derecesidir. Yani homojen bir karışımdan, kısa aralıklarla birden fazla numune alındığında elde edilen sonuçların birbiriyle uyumlu olmasıdır. Bir yöntemin kesinliği genellikle test sonuçlarının RSD (Bağıl Standart Sapma)'si ile ölçülmüştür. Bu standart sapmalar 3 kategoride toplanmıştır:

Tekrarlanabilirlik: Bir analistin laboratuarda bir cihaz ile kısa zamanda analizi gerçekleştirdiğinde elde edilen sonuç tutarlılığıdır. En azından 5 yada 6 saptama, 3 farklı matriks, 2 yada 3 farklı konsantrasyon ile analiz gerçekleştirilmeli ve % RSD hesaplanmalıdır. Kesinlik için kabul edilebilir kriter, yapılan bir çok tip analizin türüne bağlıdır. Farmasötik analizlerde kalite kontrolde % 2 RSD kolayca başarılır.

Oysa biyolojik numunelerde duyarlılık konsantrasyon limitlerinde yaklaşık % 15 ve diğer konsantrasyon düzeylerinde % 10'dur. Çevresel ve gıda numunelerinde kesinlik matrikse, analit konsantrasyonuna ve analiz tekniklerine bağlıdır. RSD % 2-20 arasında değişmektedir.

Laboratuvar içi tekrarlanabilirlik: Laboratuvar içi tekrarlanabilirlik, haftalar boyunca aynı laboratuvarda yapılan bir yöntemin karşılaştırılması ile belirlenmiştir. Aynı laboratuvarda farklı analistlerle, farklı cihazlarla, farklı standartlar, farklı kolonlar kullanılarak veya bunların kombinasyonları yapılarak aynı analiz farklı günlerde yapılmıştır. Bir yöntemin laboratuvar içi tekrarlanabilirliği, farklı operatörler, farklı firmalar, farklı aletler, farklı standartlar, farklı belirteçler ya da bunların farklı kombinasyonları ile elde edilen sonuçlarda uyumsuzluk gösterebilmiştir. Laboratuvar içi tekrarlanabilirlik validasyonunun amacı; analiz sona erdiğinde aynı laboratuvarda, yöntemin aynı sonuçları doğrulamış olmasıdır.

Laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik: Laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik, farklı laboratuvarlardan elde edilen kesinlik sonuçlarını göstermektedir. Amacı farklı laboratuvarlardan elde edilecek sonuçları sağlayacak yöntemleri doğrulamaktır. Bir analitik yöntemin laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliği, farklı laboratuvarlarda, farklı analistlerle, farklı işlevsel ve çevresel şartlar altında ama aynı belirli yöntem parametreleri ile analiz edilerek belirlenmiştir. Eğer yöntem farklı laboratuvarlarda kullanılacaksa validasyonu önemlidir. Bir yöntemin laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliğini etkileyen faktörler; oda içindeki sıcaklık ve nem farklılıkları, farklı tecrübe ve farklı gayretteki analistler, farklı özellikteki donanım (örneğin; YPSK'deki alıkonma hacmi), malzeme ve aletlerdeki koşulların varyasyonları, (örneğin; YPSK'deki mobil faz karışımı, pH, akış oranı gibi), farklı şirketlerin kolonları, çözücüler, belirteçler ve farklı kalitedeki aletler olarak belirlenmiştir [36].

d. Tutarlılık: Bir analiz yönteminin tutarlılığı, analiz numunesinin uzun zaman aralıklarında farklı koşullarda analizi yapıldığında, bu değişikliklerden etkilenip etkilenmemesinin bir ölçüsü olarak tanımlanmıştır. Yani normal koşullarda, farklı kişiler veya farklı laboratuvarlarda elde edilen sonuçların ölçülmesidir [37].

e. Nitel tayin limiti (LOD): Analitin analitik bir işlemle tayin edilebilecek en düşük konsantrasyonudur [38].

Tayin sınırının belirlenmesi aletli ve aletsiz olmak üzere yöntemle göre değişir. Aletli işlemlerde bilinen en düşük konsantrasyonda analit içeren örnek sonuçlarının kör sonuçlarıyla karşılaştırılmasıyla yani sinyal/gürültü oranı ile belirlenir. Genelde sinyal/gürültü oranı 2:1 veya 3:1 olarak kabul edilir. Tayin sınırının hesaplanmasında diğer bir yöntem, kör örneklerinin analizlenerek analitik geri zemin cevabının ölçülmesi ve bu değerin standart sapmasının 2 veya 3 gibi faktörle çarpılmasıdır [39].

f. Nicel tayin limiti (LOQ): Analitik bir yöntemle analitin, uygun doğruluk ve kesinlikle tayin edilebilecek en düşük konsantrasyonudur [38].

Analitin bilinen miktarlarla azaltılmasıyla hazırlanan örnekler ölçülür ve kabul edilebilir kesinlik ve doğruluğa sahip en düşük miktar tespit edilir. Niceleme sınırı genelde varyasyon katsayısı ile varyasyon katsayısının % 15-20'yi aşan konsantrasyonlarıyla ifade edilir. Pek çok durumda niceleme sınırı, tayin sınırının iki, üç katıdır.

Niceleme sınırının tayini için deneysel işlemlerde genel yaklaşım, belli bir sayıda kör örneği analizlenerek analitik geri zemini ölçmek, bu değerlerin standart sapmasını 10 veya 20 gibi bir faktör ile çarpılmasıdır. Bu sınır, sınıra yakın yada sınırda hazırlanmış belli sayıda örnek analizi ile kontrol edilmelidir [39].

g. Güvenilirlik: Güvenilirlik testleri, yöntemde ufak değişiklikler yapıldığı zaman sonuçların yine de uygun olduğunu göstermek için yapılmıştır. ICH dökümanlarına (Uluslararası Harmonizasyon Konferansı) göre ilaç geliştirme aşamaları sırasında yöntem üzerinde güvenilirlik değerlendirilmesinin düşünülmesi tavsiye edilmiştir [37].

V_0 : Hareketli fazın alıkonma hacmi, ölü hacim

V_R : Maddenin alıkonma hacmi (numuneyi elüe etmek için kolondan geçen çözücü hacmi)

V_S : Sabit fazın alıkonma hacmi

a. Dağılma (partisyon) katsayısı (K): Dağılma kromatografisiyle bir karışımdaki maddelerin farklı iki faz (hareketli faz ve durgun faz) arasındaki farklı çözünmelerinden yararlanılarak birbirlerinden ayrılması gerçekleştirilebilmektedir. Bütün bu ayırma işlemlerinde etkili olan parametre, çözünenlerin hareketli ve durgun sıvı faz arasındaki dağılma (partisyon) derecesini temel alır. A çözüneni için söz konusu denge, aşağıdaki eşitlikle (Denklem 2.2) gösterilebilir:

$$A \text{ hareketli} \leftrightarrow A \text{ sabit} \quad (2.2)$$

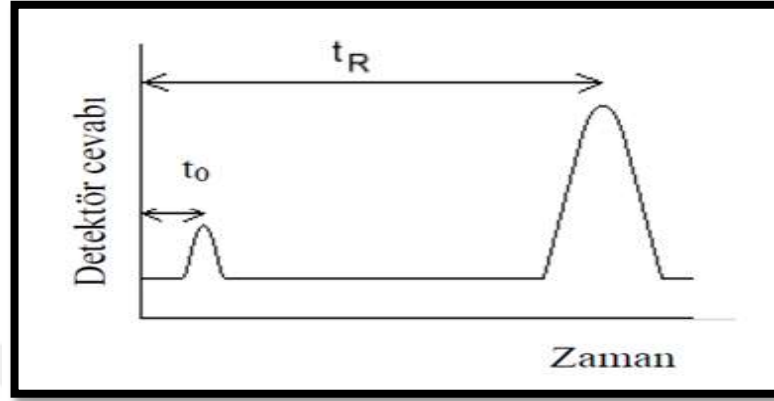
Bu reaksiyonun denge sabiti K'ya, dağılma (partisyon) oranı veya dağılma (partisyon) katsayısı adı verilir. Dağılma katsayısı (K), analitin sabit fazdaki molar derişiminin (C_S), analitin hareketli fazdaki molar derişimine (C_M) oranlanması ile hesaplanır (Denklem 2.3).

$$K = C_S / C_M \quad (2.3)$$

İdeal olarak çözünen madde derişimlerinin geniş aralıkta dağılma oranı sabittir. Diğer bir deyişle; C_S doğrudan C_M ile orantılıdır.

b. Alıkonma (retention) zamanı (t_R): Alıkonma zamanı (t_R) numune enjeksiyonundan sonra analitin dedektöre ulaşması için geçen zamana denir. Numune enjeksiyonundan sonra gelen pik için, pik süresi ölü zaman olarak adlandırılır ve t_0 ile gösterilir. Ölü zaman, hareketli fazın ortalama göç hızını verir ve analit piklerinin tanınmasında önemli rol oynar. Numune içinde veya hareketli fazda çoğu zaman kolonda tutulmayan bir tür olabilir. Yoksa bile diğer piklerin tanınmasına yardımcı olmak için böyle bir tür ortama katılabilir.

Şekil 2.3.'teki sağ taraftaki pik bir analit türüne aittir. Numunenin enjeksiyonu ile bu pikin dedektöre ulaşması için geçen süreye alıkonma (tutulma) zamanı denir ve t_R simgesiyle gösterilir.



Şekil 2.3. Tek bileşenli bir karışım için tipik bir kromatogram

t_0 : Hareketli fazın alıkonma zamanı

t_R : Maddenin alıkonma zamanı

Alıkonma zamanı yerine alıkonma hacmi terimi de (V_R) kullanılmaktadır. Bir bileşenin sabit fazdan elüe olması için gereken hareketli faz hacmine alıkonma hacmi denir.

Hacim akış hızı (F), birimi $\text{cm}^3/\text{saniye}$ veya $\text{cm}^3/\text{dakika}$ olup, maddenin alıkonma zamanının alıkonma hacmine bölünmesiyle hesaplanır (Denklem 2.4).

$$F = V_R / t_R \quad (2.4)$$

Lineer akış hızı (U), hareketli faz moleküllerinin ortalama doğrusal hızıdır. Birimi cm/saniye olup kolon uzunluğunun (L) hareketli fazın alıkonma zamanına (t_0) bölünmesiyle hesaplanır. Lineer akış hızı, kolonun enine kesitinden bağımsız olup, çözücü moleküllerinin kolon boyunca hareketleri sırasındaki ortalama hızlarını gösterir (Denklem 2.5).

$$U = L / t_0 \quad (2.5)$$

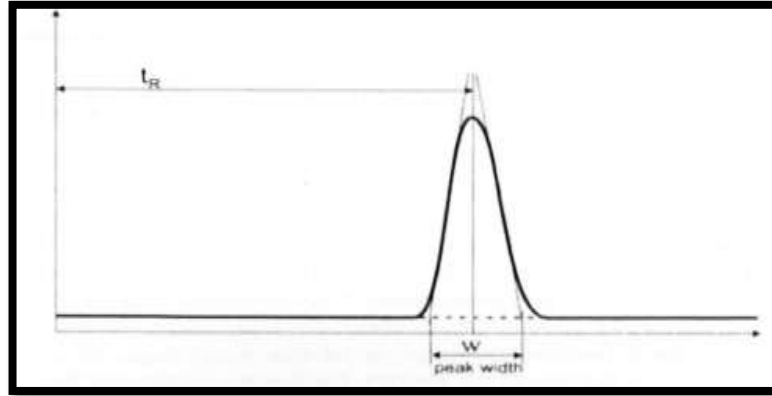
Analitin kolon içerisinde hareketi esnasında ortalama göç hızı V ; kolon dolgusunun uzunluğu (L) ve maddenin alıkonma zamanından (t_R) hesaplanır (Denklem 2.6).

$$V = L / t_R \quad (2.6)$$

Kromatografik parametrelerden biri olan dağılım katsayısı K ile maddenin alıkonma hacmi (V_R) doğrudan ilişkilidir. Bu eşitlikte V_0 kolondaki hareketli faz hacmi, V_S kolondaki sabit faz hacmidir (Denklem 2.7).

$$V_R = V_0 + K.V_S \quad (2.7)$$

c. Teorik tabaka sayısı (N): Kolonun en önemli parametresidir. Kolondan çıkan pikin sivri ve dar olması ve piklerin birbirlerinden iyi ayrılması ile ilgilidir (Şekil 2.4.). N 'in sayısal değeri, analizi yapılan maddenin cinsine bağlı olduğu gibi, deney koşullarına, akış hızı, sıcaklık, kolon kalitesi ve dolumun tek biçimliliği gibi çeşitli faktörlere de bağlıdır. Tavsiye edilen değer $N > 2000$ 'dir. Denklem 2.8' de gösterildiği gibi hesaplanır.



Şekil 2.4. Teorik tabaka sayısı için kromatogram

$$N = 16 (t_R/W)^2 \quad (2.8)$$

t_R : Maddenin alıkonma zamanı

W : Elde edilen pikin taban genişliği

d. Kapasite faktörü (k'): Kapasite faktörü (k') çözünen maddelerin kolonda göç hızlarını tanımlamakta yaygın olarak kullanılan önemli bir parametredir. Kapasite faktörü, hareketli faz ve durgun faz bileşimlerinin değiştirilmesiyle ayarlanabilir. Her maddenin kendine özgü bir kapasite faktör değeri vardır. Kolon performansı ve alıkonmanın uzun süreli tekrarlanabilirliği ile ilgilidir. Bir kromatografik ayırmada hesaplanan kapasite faktörü değerinden faydalanan ayırım hakkında bilgi sahibi olunabilir. Kapasite faktörü, Şekil 2.5.'teki parametreler kullanılarak, Denklem 2.9'da görüldüğü gibi hesaplanır.



Şekil 2.5. Kapasite faktörü için kromatogram

t_0 : Hareketli fazın alıkonma zamanı, ölü zaman

t_R : Maddenin alıkonma zamanı

V_0 : Hareketli fazın alıkonma hacmi, ölü hacim

V_R : Maddenin alıkonma hacmi

$$k' = (V_R - V_0) / V_0 \quad (2.9)$$

Akış hızı sabitse, kapasite faktörü Denklem 2.10'da görüldüğü gibi hesaplanabilir:

$$k' = (t_R - t_0) / t_0 \quad (2.10)$$

Kapasite faktörü, maddenin hareketli ve sabit faz arasındaki dağılım katsayısına bağlıdır (Denklem 2.11).

$$k' = K V_s/V_0 \quad (2.11)$$

t_R ve t_0 değerleri kromatogramlardan kolayca bulunur. Çözünen bir madde için kapasite faktörü birden çok küçük ise, ayrılma hızlı gerçekleşir ve alıkonma zamanının doğru olarak belirlenmesi zor olur. Öte yandan kapasite faktörü 20-30 gibi bir sayıdan daha büyük olursa, ayrılma zamanı gereksiz bir şekilde uzun olur. İdeal bir ayırma da kapasite faktörü değerinin 1-5 arasında olması gerekmektedir.

e. Seçicilik faktörü (α): Bir karışımdaki iki maddenin ayırımını değerlendirmek için kullanılır ve bir kolonun söz konusu maddeleri ne kadar iyi ayıracağını bir ölçüsüdür. A ve B bileşenli bir karışımda seçicilik faktörü (α), her iki bileşenin kapasite faktörü oranına eşittir (Denklem 2.12).

$$\alpha = k'. B / k'. A \quad (2.12)$$

$k'. B$: Daha kuvvetli tutunan veya alıkonma zamanı uzun olan maddenin kapasite faktörü

$k'. A$: Daha az kuvvetle tutunan veya alıkonma zamanı kısa olan maddenin kapasite faktörü

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

Deneyssel bir kromatogramdan α 'yı belirlemek için aşağıdaki eşitlik kullanılmaktadır (Denklem 2.13):

$$\alpha = [(t_R)_B - t_0] / [(t_R)_A - t_0] \quad (2.13)$$

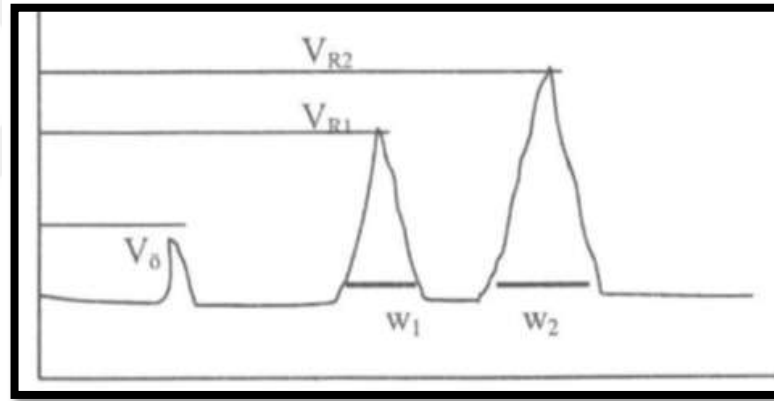
$(t_R)_A$: 1. maddenin alıkonma zamanı

$(t_R)_B$: 2. maddenin alıkonma zamanı

t_0 : Hareketli fazın alıkonma zamanı

İki pikin elde edildiği sistemlerde kullanılır. Genel olarak bu değerin 1'den büyük olması istenir.

f. Ayırım gücü (R_S): Kromatografide amaç karışım içindeki maddeleri ayırmaktır. Ayırıcılık terimi (R_S) bu amacın ne derecede gerçekleştiğinin bir ölçütüdür. Birbirini takip eden 2 adet bileşene ait piklerin birbirinden ayırımlarının başarısını (oranını) gösterir. Takip eden pikler için iyi bir çözünürlükten bahsedebilmek için hesaplanan R değerinin 1-1,5 civarında olması istenir. Genellikle 5 veya daha az madde içeren numunelerde bu değerin 1,5'dan büyük olması kolaylıkla sağlanabilir. Bu sonuç, maksimum kesinliğin göstergesidir. Ayırım gücü, bir kolonun eskiliğini, günler arası ayırım şartlarındaki değişiklikleri gösterir. Ayırım gücü Şekil 2.6.'daki parametrelerden yararlanılarak aşağıdaki gibi hesaplanır (Denklem 2.14).



Şekil 2.6. Ayırım gücü için kromatogram

t_1 : 1. bileşenin alıkonma zamanı

t_2 : 2. bileşenin alıkonma zamanı

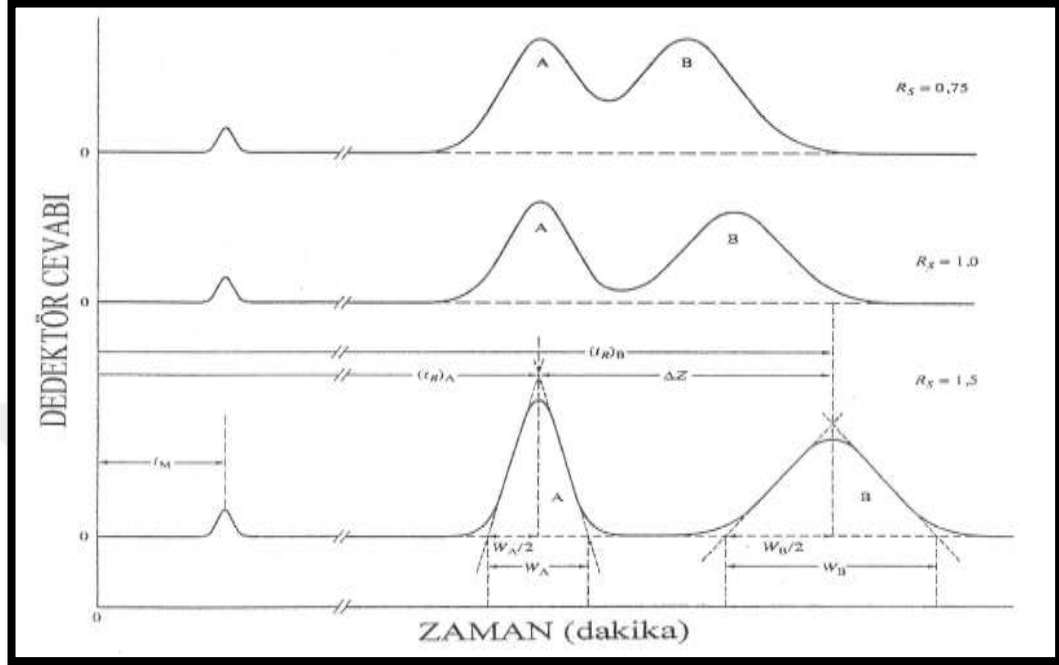
W_1 : 1. bileşenin taban genişliği

W_2 : 2. bileşenin taban genişliği

$$R_S = 2(t_2 - t_1) / (W_1 + W_2) \quad (2.14)$$

Genel ayırımlarda bu değer 2'nin, miktar tayini çalışmalarında 1,5'un, biyolojik sıvılardan yapılan çalışmalarda 1,2'nin üstünde olması kabul edilebilir değerlerdir.

Nicel analizler için pikler arasındaki ayırıcılığın 1,5'den büyük ($R_s \geq 1,5$) olması önerilir (Şekil 2.7.).



Şekil 2.7. Rezolüsyon faktörünün kromatogramlara göre değişimi

g. Kolon verimi: Başarılı bir kromatografinin amacı verimli bir ayırım ve dar bir kromatografik bant elde etmektir. Kromatografik kolon verimliliklerinin kantitatif ölçümünde birbiriyle bağıntılı iki terim sıkça kullanılır:

1. Tabaka yüksekliği, H (Plate Height)
2. Teorik tabaka sayısı, N (Number of Theoretical Plate)

Bu ikisi arasındaki bağıntı aşağıdaki eşitlikle verilir (Denklem 2.15):

$$N = L / H \quad (2.15)$$

L : Kolon dolgu uzunluğu (cm)

Kromatografik kolonun verimliliği teorik tabaka sayısı arttıkça ve teorik tabaka yüksekliği azaldıkça artar. Hareketli ve durgun fazların bileşimi, kolon dolgu

maddesinin tanecik büyüklüğü ve kolon çapına bağlı olarak kolonun tipi kolon verimliliğine etki etmektedir. Kolon dolgu maddesinin tanecik çapı küçüldükçe, kolon tabaka sayısı artmakta ve bu da kolon verimliliğini artırmaktadır.

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 (Denklem 2.16).

$$H = (A + B)/(u + C_U) \quad (2.16)$$

H: Teorik tabaka yüksekliği (cm)

A: Çoklu akış yolları ve Eddy difüzyonu

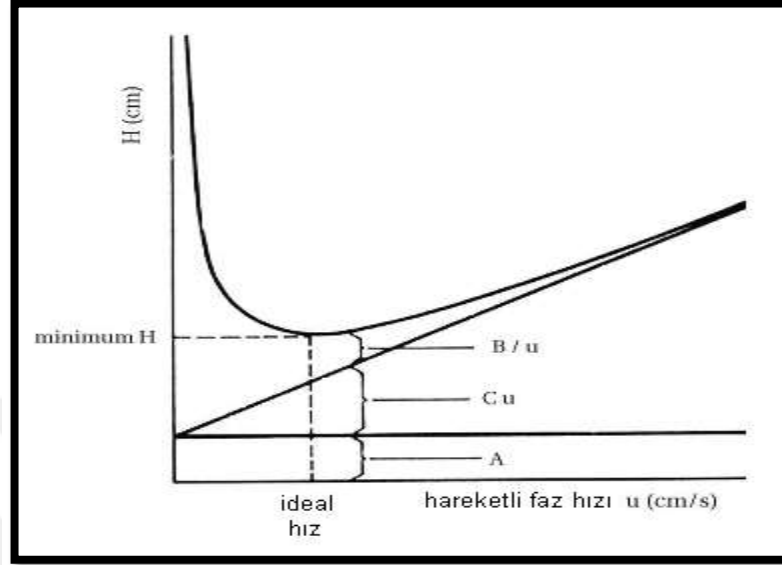
B: Boyuna difüzyon

C_U : Fazlar arasındaki kütle aktarımı

u: Çizgisel hız

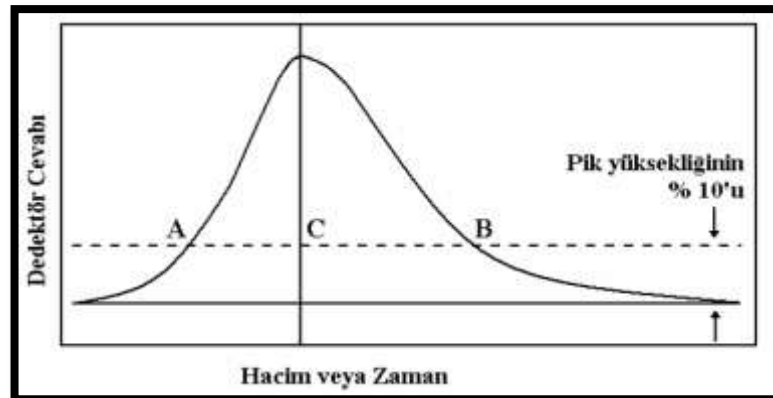
Bir kromatografi kolonunun verimli çalışması için önce bu kolon için kullanılacak optimum akış hızının saptanması gerekir. H değerinin küçültülmesi için bir dizi önlem alınarak kolonun etkinliği artırılabilir. Formül 2.15'teki akış hızından bağımsız olan A değeri, madde moleküllerinin kolonda ilerlerken 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 faz

viskozitesinin az olması, kolon sıcaklığının arttırılması, sabit faz ince bir sıvı film ile kaplıysa bu filmin kalınlığının çok küçük bir değere sahip olması gerekir (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Van Deemter eğrisi

h. Kuyruklanma faktörü (T) ve pik asimetri faktörü (A_s): Bu faktör pikin simetrik olması ile ilgilidir. Çalışmalarda daima simetrik pikler seçilmelidir. Simetrik olmayan piklerde; doğru olmayan tabaka sayısı ve ayırım gücü sonuçları, kararlı olmayan miktar tayinleri, gözlemlenemeyen pik kuyruklanmaları, alıkonmanın tekrarlanabilirliğinin düşük olması gibi sorunlarla karşılaşılır.



Şekil 2.9. Pik asimetri oranının hesaplanması

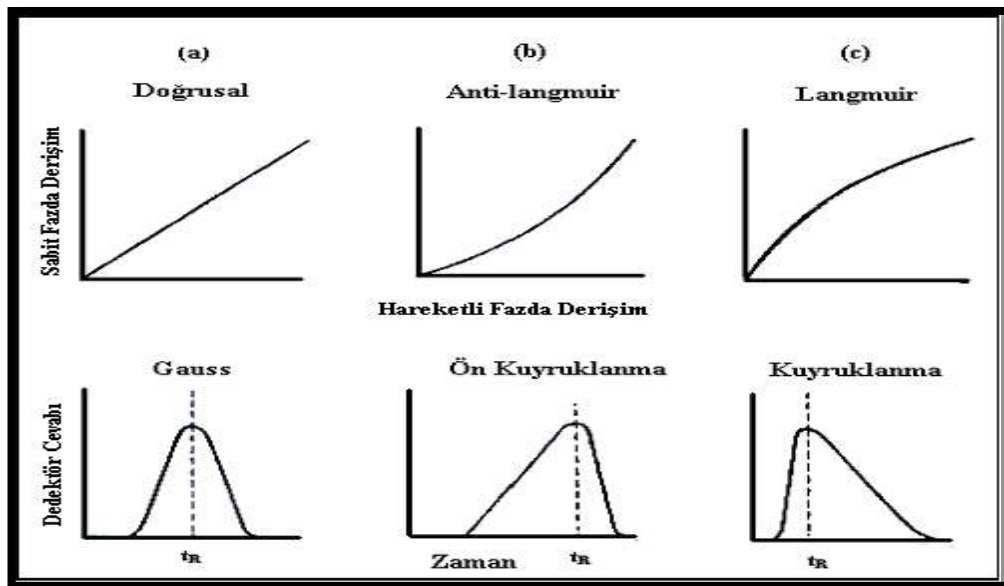
Pik asimetri oranının hesaplanması aşağıdaki eşitlikle verilir (Denklem 2.17):

$$A_s = (CB / AC) \quad (2.17)$$

CB ve AC uzunlukları Şekil 2.9’da tanımlanmıştır.

Pik asimetrisi taban yüksekliğinin % 10’u civarında, kuyruklanma faktörü ise % 5’i civarında ölçülür. Tam simetrik bir pik için $A_s = 1$ ’ dir. Pratikte 0,9-1,2 arasında A_s değerleri kabul edilmektedir. Kuyruklanma faktörü için uygun değerler ise 2’nin altındaki değerlerdir.

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. Analitin hareketli fazdaki denge derişimi (C_M) sabit fazdaki denge derişimine (C_S) karşı grafiğe geçirildiğinde bir dizi izoterm elde edilir.



Şekil 2.10. Temel üç izoterm şekilleri ile alıkonma zamanı ve pik şekline etkileri

Şekil 2.10. 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.

Dışbükey izoterm (Şekil 2.10. 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 2.10. 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.

Kolon performansının optimizasyonu için istenilen ayırmayı sağlamak için optimum koşullar araştırılırken α , k' ve N (veya H) gibi temel parametrelerin az ya da çok birbirinden bağımsız olarak ayarlanabileceği unutulmamalıdır. Böylece α ve k' , en kolay sıcaklık ve hareketli fazın bileşimindeki oynamalar ya da değişik bir kolon dolgusu kullanılarak değiştirilebilir. Herhangi bir çalışmada, teorik tabaka sayısı, kolon boyunun değiştirilmesi, tabaka yüksekliği, hareketli fazın akış hızı, kolon dolgu maddesi tane büyüklüğü, hareketli fazın viskozitesi ve sabit fazı oluşturan absorbe edilmiş sıvı filmin kalınlığı gibi parametreler değiştirilerek iyi bir ayırım gerçekleştirilebilir.

Kromatografik çalışmalarda deney koşulları, bir karışımın bileşenlerini en kısa sürede net bir şekilde ayıracak biçimde optimize edilerek belirlenir. Optimizasyon deneyleri; bant genişlemesini azaltmak, bileşiğin rölatif göç hızını değiştirmek amacıyla yapılır.

Bant genişlemesi ve dolayısıyla kolon verimliliğinin kaybı, çözünen bileşenlerin kolon içerisinde göçleri sırasında yeralan çok sayıda kütle-aktarım işlemlerinin belli hızlara sahip oluşunun bir sonucudur. Bu hızları etkileyen bazı değişkenler denetlenebilir ve ayırmaları iyileştirmek için kullanılabilir.

Cihaz, pik alanı veya yüksekliğinin tekrar edilebilirliği (% bağıl standart sapma): En az 6 defa tekrarlanan deneyler sonucu elde edilen pik alanı veya yüksekliklerinin bağıl standart sapmalarının hesaplanması ile elde edilir. Genel ayırımlarda % bağıl standart sapma değerinin 1,5'un, biyolojik sıvılardan yapılan çalışmalarda 5,0'ın altında olması ve eser madde miktar tayininde 5-15 arasında olması istenen değerlerdir. Cihaz tekrarlanabilirliği için alıkonma zamanlarının % bağıl standart sapmasının 5'den daha çok sayıda tekrar edilen enjeksiyonlar için % 1'den küçük olması istenir [40, 41].

2.6. Literatürde Yapılan Çalışmaların Özeti

Etodolak analizleri için, hızlı, basit ve seçici bir spektroskopik metot geliştirmişlerdir. Yöntem Etodolak'ın Bakır (II) asetat ve demir (III) klorit le kompleks oluşturması ve diklorometan ile ekstrakte edilmesi sonucunda elde edilen kompleksin 684 ve 385 nm'de Cu (II) ve Fe (III)'e karşı absorpsanların ölçülmesine dayanmaktadır. Reaksiyona etki eden pH, reaksiyona girenlerin konsantrasyonları, zaman, gibi faktörlerin etkisi çalışılmıştır. Devamlı varyasyonlu Job yöntemi ile reaksiyonun stokiyometrik katsayıları Cu (II) için 1:2 ve Fe (III) için 1:3 bulunmuştur. Metot Beer kanununa Cu (II) için 2-9 ve Fe (III) için 0,5-2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyon aralıklarında uymaktadır. Yöntemde oluşan matrikslerin stabilitesi de çalışılmıştır ve reaksiyon sonucu oluşan bileşikler sonraki araştırmalar için saf olarak elde edilmiştir. Komplekslerin molar absorbtivitesi Cu (II) 32,14 $\pm$ 0,97 ve Fe (III)

için $168,32 \pm 1,12$ bulunmuştur. Oluşturulan yöntem saf etodolak ve farmasötik formülasyonlarında uygulanmıştır. Yöntemin validasyonu standart eklenmesi yöntemi ile test edilmiş ve sonuçlar diğer spektrometrik yöntemlerle karşılaştırılmıştır. Kesinlik ve doğruluk yönünden fark gözlemlenmemiştir [42].

Spesifik, kesin, ve doğru ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemiyle tablet formundaki etodolak ve asetaminofen' in miktar tayinini yapmışlardır. BDS Hypersil C-18, 100x4,6 mm, 5 μ m kolon, 274 nm ve izokratik hareketli faz olarak % 0,05'lik fosforik asit ve asetonitril karışımı kullanmışlardır. Akış hızı 1 mL dk⁻¹'dir. Etodolak ve asetaminofen in tutulma zamanları 1,32 ve 4,24 dk olarak bulunmuştur. Bulunan yöntem spesifiklik, doğrusallık, doğruluk, kesinlik ve güvenilirlik parametreleri ile valide edilmiştir. Girişim yapan herhangi bir pik, safsızlık veya bozunan madde bulunmadığı için bulunan yöntem spesifik ve stabilite göstergeli olarak değerlendirilmiştir. Doğrusallık eğim grafiğinin R² değerleri 0,9996 ve 0,998, geri kazanım değerleri % 101,32 ve % 100,94 bulunmuştur. Gün içi ve günler arası ortalama bağıl standart sapma % 2 den küçük bulunmuştur. Bulunan bu yöntem bu iki etken maddenin ayrı kombinasyonlarında veya birlikte olan kombinasyonlarında başarılı bir şekilde uygulanabilir [43].

Etodolakın kandaki tayini için basit, hızlı spesifik ve hassas ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Analiz süresi 5 dakika olan yöntemin teşhis limiti 0,5 μ g mL⁻¹ bulunmuştur. Geliştirilen yöntem Etodolak'ın biyoyararlanım ve farmakokinetik parametrelerinin analizlerinde kullanılmıştır. Elde edilen farmakokinetik parametreler, grafik altında kalan alan, maksimum kan konsantrasyonu, kandaki maksimum konsantrasyon zamanı, yarılanma zamanıdır. Kandaki maksimum konsantrasyon rektal yoldan 6,2 μ g mL⁻¹ ve oral yoldan 20,6 μ g mL⁻¹ bulunmuştur. Geliştirilen yöntem yeterli duyarlılıkta olup kandaki etodolak analizleri için kullanılabilir. Bu yöntem ayrıca diklofenak, sulindak, piroksikam, indometasin gibi başka etken maddeler için de kullanılmıştır [44].

Tiyokolşikosid'in kapsül dozaj formu için basit ve hassas, normal faz sıvı kromatografi yöntemi geliştirilmiştir. Mobil faz, N-heptan:metanol:kloroform:asetik

asit (70:20:10:0.2 h/h) karışımından oluşmaktadır. Akış hızı 1 mL dk⁻¹, dalga boyu 360 nm'dir. Alıkonma zamanı 7,787 dk olarak bulunmuştur. Validasyon parametreleri olarak doğrusallık, doğruluk, kesinlik, LOD, LOQ ve Sağlamlık çalışılmıştır ve uygun sonuçlar bulunmuştur. Kalibrasyon eğrisi, 5-15 µg mL⁻¹ aralığında çizilmiştir ve korelasyon katsayısı 0,999 olarak bulunmuştur. Doğruluk için % 80, % 100 ve % 120 seviyelerinde çalışılmıştır ve % 98-102 aralığında geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Gün-içi ve günler-arası kesinlik sonuçları ise % RSD 2'den küçük bulunmuştur [45].

Yapılan Tiyokolşikosid'in oral uygulamada intramüsküler uygulamaya göre, ilk geçiş etkisi sebebiyle düşük biyoyararlanım göstermesi sonucu alternatif bir form arayışına girilmiş, bu amaçla bukkal dozaj formları geliştirilmiş ve biyoyararlanımları incelenmiştir. Analjezik ilaçlar bukkal form gibi değişik formlarda formüle edilmiştir. Bukkal mukoza 150 m² gibi geniş bir yüzey alana sahip, geçirgenliği çok yüksek olan bir yüzeydir. Yanak mukozası tek sıra epitel hücrelerden ve skuamöz bağ dokusundan oluşmaktadır. Yanak mukozası boyunca ilaçlar transsellüler ve parasellüler yollarla taşınmaktadır. Bukkal mukozadan tiyokolşikosid gibi hidrofilik maddelerin geçişi kolay ve gayet hızlıdır. Bununla beraber bukkal dağılım pre-sistemik metabolizmayı ve ilk geçiş etkisini önleyebilir. Hidrofilik ilaçlar genellikle parasellüler pasif difüzyon yolu ile taşınmaktadır. Fakat yanak epitelyum hücreleri ilaçların penetrasyonunda büyük bir bariyer rolü oynamaktadır. Bu sebeple ilaçların mukozal membrana penetrasyonunu artırmak için bazı tuz formları sıklıkla kullanılmıştır. Genellikle mukozal membrana ilaç penetrasyonunu artırmak için safra tuzları tercih edilir. Tuzların bu etkilerinin, her zaman için konsantrasyona bağımlı ve geri dönüşümlü olması istenir. Glikodeoksikolatın buserelin'in bukkal mukozadan geçişini artırdığı, sodyum taurokolat'ın insülin ve alfa-interferon gibi peptit yapıdaki maddelerin geçişini artırdığı gösterilmiştir. Tiyokolşikosid için ise dil altında çözmek ve yanak mukozası ve diş etine yapıştırılarak kullanılmak suretiyle iki tiyokolşikosid dozaj formu dizayn edilmiştir. 4 mg Tiyokolşikosid içeren sodyum taurokolat (NaTC) ve sodyum taurodeoksikolat (NaTDC) ile hazırlanmış bu formlar ve insan ve domuz yanak mukozasına uygulanmıştır. Tiyokolsikosid'in analizi ters fazlı yüksek performanslı

sıvı kromatografisi (HPLC) ile yapılmıştır. Tayinler Shimadzu LC 10 AS HPLC sisteminde, kolon olarak Waters Nova-Pak C8 kolon, mobil faz olarak asetonitril:su (15:85) karışımı kullanılmıştır. Ölçümler 370 nm dalga boyunda UV dedektör ile yapılmıştır. Hareketli fazın akış hızı 1 mL dk⁻¹'dir. İnsan ve domuz üzerinde yapılan deneylerde NaTC ve NaTDC'nin farklı miktarlarda yanak mukozasından ve dilaltından penetrasyonu artırdığı gösterilmiştir. Bununla beraber tiyokolşikosid'in dilaltı formülasyonunun, yanak ve diş eti formülasyonuna göre emiliminin daha yüksek olduğu belirtilmiştir [46].

Kombine tablet dozaj formundaki Tiyokolşikosid ve Etorikoksib'in tayini amacıyla yapılan bir çalışmada dozaj formu kombine tablet etorikoksib ve tiyokolşikosid belirlenmesi için yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (HPTLC) yöntemi geliştirilmiştir. Çalışmada Nucoxia-MR tablet farmasötik form olarak kullanılmıştır. Etorikoksib ve Tiyokolşikosid için sırasıyla, 25 µg mL⁻¹ ve 20 µg mL⁻¹ konsantrasyonlarda stok çözeltiler hazırlanmıştır. Ayrımada, silikajel 60F254 (250 mikron) tabaka ile kaplanmış alüminyum levhalar kullanılmıştır. Hareketli faz olarak ise etil asetat-metanol (8:2, h/h) karışımı kullanılmıştır. Etorikoksib ve tiyokolşikosid için lineer kalibrasyon doğrusu 50-250 ng bant⁻¹ ve 100-500 ng bant⁻¹ aralığında elde edilmiştir. Ölçümler 290 nm'de yapılmıştır. LOD ve LOQ değerleri; Etorikoksib için sırasıyla, 10,993 ve 33,314 ng bant⁻¹, Tiyokolşikosid için sırasıyla, 25,133 ve 76,161 ng bant⁻¹ olarak bulunmuştur. Yöntemin doğrusallık, doğruluk, hassasiyet ve sağlamlığı belirlenmiştir. Geliştirilen yöntemin, farmasötik ilaçlara başarıyla uygulanabileceği belirtilmiştir [47].

Dexketoprofenin ve tiyokolşikosid'in kantatif olarak bulk dozaj formunun belirlenmesi için ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile fotodiod dedektör (PDA) kullanılarak geliştirilmiş bir yöntemdir. Mobil faz olarak Metanol:su (% 60:40 h/h) kullanıldı. C18 kromasil 250x4,6 mm, 5,0 µm kolonu ile 0,7 Ml akış hızında 254 nm'de yöntem gerçekleştirildi. Kolon sıcaklığı 35°C, enjeksiyon hacmi 10 µL'dir. Geliştirilen yöntemde doğrusallık, doğruluk, kesinlik, seçicilik ve sağlamlık parametreleri çalışılmıştır. Doğrusallık aralığı 3,125-125 mg mL⁻¹ olarak bulunmuştur. Tüm parametreler için sonuçlar limitler içerisinde. Yöntem tüm

pikleri ayırmıştır, basit, hızlı, ekonomik olduğu için özellikle rutin kalite kontrol analizlerinde uygulanabilir [48].

Etodolak ve Tiyokolşikosidin (200 mg/4mg) kombine tablet dozaj formu için basit, hızlı ve tekrarlanabilir Q-analiz UV-spektrofotometrik bir yöntem geliştirilmiştir. Etodolak için $\lambda_{max}=223$ Tiyokolşikosid için $\lambda_{max}=259,4$ ve ikisi için ortak nokta 236 nm'dir. Çözücü olarak her iki etken için uygun olan metanol kullanıldı. Doğrusallık Etodolak ve Tiyokolşikosid için sırasıyla 1-6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 4-24 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyon aralığında bulunmuştur. Araştırılan yöntemde ayrıca Etodolak ve Tiyokolşikosid insan idrarıylada spike edilmiştir. Etodolak ve Tiyokolşikosid asidik hidroliz ve alkali hidroliz ile bozundurulmuştur. Daha sonra üretilen numuneler geliştirilen yöntem kullanılarak degradasyon çalışmaları için kullanılmıştır. Tiyokolşikosidin alkali hidrolizden yoğun olarak etkilendiği görülmüştür. Etodolak ise tüm stres koşullarında kararlıdır. Yöntem ICH kurallarına uygun olarak geliştirilmiştir [49].

Etodolak ve tiyokolşikosid miktarının aynı anda belirlenmesi için bir ters faz sıvı kromatografi yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntem mobil faz olarak metanol ve fosfat tamponu pH 6,0 (85:15 h/h) ile ters-faz Phenomenex C-18 (250x4.60 mm 5 μm) kolonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Akış hızı 0,8 mL dk⁻¹'dir. Etodolak ve tiyokolşikosid saptanması için kullanılan dalga boyu 259 nm'dir. Alıkonma zamanları Etodolak ve Tiyokolşikosid için sırasıyla 4,39±0,10 dk. ve 3,52±0,10 dk. olarak saptanmıştır. Bu yöntemde ICH klavuzuna uygun olarak çalışma aralığı, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, miktarlandırma limiti (LOQ) ve dedeksiyon limiti (LOD) çalışılmıştır. Bu yöntemde etodolak için çalışma aralığı 16-96 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Tiyokolşikosid için çalışma aralığı 4-24 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Etodolak ve Tiyokolşikosid için geri kazanımlar sırasıyla % 99,90-101,08 ve % 99,75-99,98 arasında bulunmuştur. Bu yöntemde RSD % 2'den daha az olduğu tespit edilmiştir. Önerilen yöntem ile Etodolak ve Tiyokolşikosid'in kombine tablet dozaj formu (400 mg Etodolak ve 4 mg Tiyokolşikosid) eşzamanlı başarıyla uygulanabilir [50].

Etodolak ve tiyokolşikosid için geliştirilen başka bir ters faz sıvı kromatografi yönteminde mobil faz olarak asetonitril: 20 mM potasyum dihidrojen fosfat tomponu buffer (65:35, h/h) kullanılmıştır. Kolon HiQ Sil C18 HS 250x4.6 mm kullanılmıştır. Analiz 257 nm’de çalışılmıştır. Çalışma aralığı $25\text{-}150\mu\text{g mL}^{-1}$ Etodolak, $0,5\text{-}10\mu\text{g mL}^{-1}$ Tiyokolşikosid olarak belirlenmiştir. Uygun geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Talet formu 200 mg Etodolak ve 4 mg Tiyokolşikosid içermektedir [51].

İzokratik elüsyon ile Kromasil C18, 150x4,6 mm, 5 μm kolonu kullanılarak, asetat tamponu (pH 3,7) ve metanol (20:80 h/h) mobil fazı ile 0,8 mL dk⁻¹ akış hızında 242 nm Etodolak, Tiyokolşikosid tablet formu (400 mg Etodolak ve 4 mg Tiyokolşikosid) için bir analiz yöntemi geliştirilmiştir. Alıkonma zamanları Tiyokolşikosid ve Etodolak için sırasıyla 2,3 ve 3,2 dk olarak belirlenmiştir. Doğrusallık aralığı Tiyokolşikosid için $1\text{-}6\mu\text{g mL}^{-1}$, Etodolak için $100\text{-}600\mu\text{g mL}^{-1}$ ’dir. ICH parametrelerine uygun çalışılmıştır ve tüm validasyon parametrelerinde uygun sonuçlar bulunmuştur [52].

Etodolak ve Tiyokolşikosid’in eş zamanlı miktar analizi için Qualisil BDS RP C-18 250x4.6 mm, 5 μm kolonu ile mobil faz olarak metanol:asetat tamponu (pH:3,2), (85:15 h/h) kullanılarak 1 mL dk⁻¹’da, 223 nm’de analiz gerçekleştirilmiştir. Tiyokolşikosid ve Etodolak için alıkonma süreleri sırasıyla 3,0 ve 6,1 dk’dır. Tiyokolşikosid için $0,2\text{-}1\mu\text{g mL}^{-1}$, Etodolak için $10\text{-}50\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyon aralığında doğrusallık eğrileri çizilmiştir. ICH parametrelerine uygun geliştirilen yöntem, basit, hassas, doğru, seçici ve tekrarlanabilirdir [53].

Etodolak ve Tiyokolşikosid’in eş zamanlı miktar analizi için hassas, doğru ve kesin ve sağlam ters faz-sıvı kromatografi yöntemi geliştirilmiştir. C18, 250x4.6 mm, 5 μm kolon ile asetonitril:fosfat tamponu (60:40 h/h), pH 5, akış hızı 1 ml dk⁻¹, 259 nm’de analiz gerçekleştirilmiştir. Tiyokolşikosid ve Etodolak’ın sırasıyla çıkış zamanı 2,45-7,10 dk ve resolüsyonu 16,55 olara tespit edilmiştir. Doğrusallık aralığı Tiyokolşikosid için $10\text{-}50\mu\text{g mL}^{-1}$, Etodolak için $50\text{-}250\mu\text{g mL}^{-1}$ ’dır. Asidik, bazik, oksidatif, fotolitik ve ısı koşullarında, çeşitli stres parametrelerinde de çalışılmıştır. Yöntem ICH parametrelerine göre valide edilmiştir [54].

Etodolak ve tiyokolşikosid kombine tablet formu için basit bir ters faz sıvı kromatografi yöntemi geliştirilmiştir. Potasyum dihidrojen fosfat tamponu (pH:3,0):asetonitril, 50:50 (h/h) oranında karıştırılmıştır ve mobil faz olarak kullanılmıştır. 255 nm ve 1 mL dk⁻¹ akış hızında çalışılmıştır. Tiyokolşikosid'in alıkonma zamanı 2,6 dk ve Etodolak'ın alıkonma zamanı 4,3 dk olarak tespit edilmiştir. Çalışma aralığı Etodolak ve Tiyokolşikosid için sırasıyla 1-6 µg mL⁻¹ ve 100-600 µg mL⁻¹ olarak çalışılmıştır [55].



BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Materyaller

3.1.1. Kullanılan cihazlar

a. YPSK Cihazı (AGILENT)

1260 Hip ALS Auto Sampler

1290 Thermostat ALS soğutucu

1260 DAD dedektör

1260 Quat Pump degazer

1260 TCC Kolon fırını

OpenLab CDS Ezchrom programı

Samsung masaüstü bilgisayar

b. UV-Vis. Spektrofotometre Cihazı (Automated UV)

a. Hassas terazi (Mettler Toledo)

b. Buzdolabı (KIRSCH)

c. Vorteks karıştırıcı (VWR)

d. Santrifüj (NÜVE NF 400)

e. pH metre (Metrohm)

f. Etüv (MEMMERT)

g. Manyetik karıştırıcı (IKA RCT)

h. Ultrasonik banyo (BANDELIN SONOREX DIGITEC)

i. Ultra saf su cihazı (SARTORIUS)

j. Otomatik mikropipet (EPPENDORF)

k. Vakum pompası (VACUUBRAND)

3.1.2. Kullanılan cam malzemeler ve diğer sarf malzemeleri

- a. Tosoh Bioscience TSKgel ODS-80TM 4.6x150 mm 5µm ters faz kolonu
- b. 2 mL silikon septum kapaklı autosampler cam vial kiti (Agilent)
- c. 0,22 µm Hydrophilic PVDF Millipore Millex GV enjektör ucu filter
- d. 0,22 µm GSWP Millipore membrane filter
- e. 10x10 mm kuvarz küvet (PG INSTRUMENTS)
- f. Değişik hacimlerde balon joje, erlen, beher ve mezürler (ISOLAB)
- g. Cam santrifüj tüpü (ISOLAB)
- h. Metal spatül
- ı. Enjektör (SET INJECT)
- i. Otomatik pipet ucu (EPPENDORF)

3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler

Etodolak ve Tiyokolşikosid standartları ve bu ikili etken madde karışımını içeren ticari Etotio tablet Mustafa Nevzat İlaç Sanayii A.Ş. (İstanbul, Türkiye)'den temin edilmiştir. Plasebo (ilacın içindeki yardımcı maddeler), insan plazması, YPSK saflığında metanol (CH_3OH , MERCK), $M=32,04 \text{ g mol}^{-1}$, potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4 , MERCK), $M=136,08 \text{ g mol}^{-1}$, ortofosforik asit (H_3PO_4 , MERCK), $M=98 \text{ g mol}^{-1}$ kullanılmıştır.

3.2. Deneyler İçin Gerekli Hazırlıklar

3.2.1. Etken maddelerin saflığı

Etodolak ve Tiyokolşikosid etkin maddeleri sağlandıkları firma tarafından tüm testleri yapılmış (saflık, erime noktası, çözünürlük v.s.) olan sertifikalı saf standartlardır.

3.2.2. Fosfat tampon çözelti hazırlanışı

2,72 g Potasyum dihidrojen fosfat tartılarak 1000 mL balonjojede saf su ile çözülmüştür ve hacmine tamamlanmıştır. Elde edilen çözeltinin pH'ı $3,5 \pm 0,1$ 'e ortofosforik asit ile ayarlanmıştır. Vakum altında 0,22 μm membran filtreden süzülüp, ultrasonik banyoda 15 dk bekletilerek, çözünmüş gazları uzaklaştırıldıktan sonra, YPSK sisteminde kullanılmıştır. Gradient elüsyon için tampon (hareetli faz A) ve metanol (hareketli faz B) farklı hareketli faz haznelerine konulmuştur.

3.2.3. Çözücünün hazırlanması

Metanol ve tampon çözelti 70:30 (h/h) oranında karıştırılarak hazırlanır.

3.2.4. İnsan plazmasının kullanıma hazırlanması

Mor kapaklı EDTA'lı tüplere kan numunesi alınmıştır. Tüp 5-6 kez alt üst edilerek karıştırılmıştır. Daha sonra 4000 devirde 5 dakika santrifüj edilmiştir ve üstte kalan plazma bir behere alınarak kullanılmıştır.

3.2.5. Standart çözeltilerin hazırlanması

Tiyokolşikosid ana stok çözeltisi: 20 mg civarı hassas tartılmış Tiyokolşikosid çalışma standardı 250 mL'lik balon jojeye alındı. Üzerine 50 mL pH 3,5 fosfat tamponu ilave edildi ve 5 dk ultrasonik banyoda tutularak çözünmesi sağlandı. pH 3,5 fosfat tamponu ile hacmine tamamlanıp ve çalkalandı. (C_T : 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$)

Standart Çözelti % 5: 20 mg civarı hassas tartılmış Etodolak çalışma standardı 1000 mL'lik balon jojeye alındı ve üzerine 10 mL çözücü eklenerek 5 dk ultrasonik banyoda tutularak çözünmesi sağlandı. Üzerine 5,0 mL tiyokolşikosid stok standart çözeltisi eklendi ve çözücü ile hacmine tamamlandı. 0,22 μm PVDF filtreden süzülerek enjeksiyon yapıldı. (C_E : 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, C_T : 0.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$)

Standart Çözelti % 20: 16 mg civarı hassas tartılmış Etodolak çalışma standardı 200 mL'lik balon jojeye alındı ve üzerine 10 mL çözücü eklenerek 5 dk ultrasonik banyoda tutularak çözünmesi sağlandı. Üzerine 4,0 mL tiyokolşikosid stok standart çözeltisi eklendi ve çözücü ile hacmine tamamlandı. 0,22 μm PVDF filtreden süzülerek enjeksiyon yapıldı. (C_E : 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$, C_T : 1.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$)

Standart Çözelti % 50: 10 mg civarı hassas tartılmış Etodolak çalışma standardı 50 mL'lik balon jojeye alındı ve üzerine 10 mL çözücü eklenerek 5 dk ultrasonik banyoda tutularak çözünmesi sağlandı. Üzerine 2,5 mL tiyokolşikosid stok standart çözeltisi eklendi ve çözücü ile hacmine tamamlandı. 0,22 μm PVDF filtreden süzülerek enjeksiyon yapıldı. (C_E : 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, C_T : 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$)

Standart Çözelti % 80: 16 mg civarı hassas tartılmış Etodolak çalışma standardı 50 mL'lik balon jojeye alındı ve üzerine 10 mL çözücü eklenerek 5 dk ultrasonik banyoda tutularak çözünmesi sağlandı. Üzerine 4,0 mL tiyokolşikosid stok standart çözeltisi eklendi ve çözücü ile hacmine tamamlandı. 0,22 μm PVDF filtreden süzülerek enjeksiyon yapıldı. (C_E : 320 $\mu\text{g mL}^{-1}$, C_T : 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$)

Standart Çözelti % 100: 20 mg civarı hassas tartılmış Etodolak çalışma standardı 50 mL'lik balon jojeye alındı ve üzerine 10 mL çözücü eklenerek 5 dk ultrasonik banyoda tutularak çözünmesi sağlandı. Üzerine 5,0 mL tiyokolşikosid stok standart çözeltisi eklendi ve çözücü ile hacmine tamamlandı. 0,22 μm PVDF filtreden süzülerek enjeksiyon yapıldı. (C_E : 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$, C_T : 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$)

Standart Çözelti % 125: 25 mg civarı hassas tartılmış Etodolak çalışma standardı 50 mL'lik balon jojeye alındı ve üzerine 10 mL çözücü eklenerek 5 dk ultrasonik banyoda tutularak çözünmesi sağlandı. Üzerine 6,0 mL tiyokolşikosid stok standart çözeltisi eklendi ve çözücü ile hacmine tamamlandı. 0,22 μm PVDF filtreden süzülerek enjeksiyon yapıldı. (C_E : 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, C_T : 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$)

3.2.6. Farmasötik preperat çözeltilerin hazırlanması

20 adet tablet tek tek tartılarak, ortalama tablet ağırlığı bulundu ve havanda toz haline getirildi. Toz halindeki numuneden yaklaşık 450 mg civarı hassas tartılmış toz (4 mg tiyokolşikosid, ve 200 mg etodolağa eşdeğer) 500 mL balon joje içerisine tartıldı. Üzerine 150 mL çözücü eklendi ve 10 dakika boyunca ultrasonik banyoda çözünmesi sağlandı. Bu çözeltinin oda sıcaklığına gelmesi beklendi ve hacmine tamamlandı. 0,22 µm PVDF filtreden süzülerek enjeksiyon yapıldı. 6 ayrı test çözeltisi hazırlandı. (C_E : 400 µg mL⁻¹, C_T : 8 µg mL⁻¹)

3.2.7. Standart ekleme metodunda kullanılan standart çözeltilerin hazırlanması

500 mL balon joje içerisine 450 mg civarı hassas tartılmış Etotio tablet tozu (4 mg tiyokolşikosid, ve 200 mg etodolağa eşdeğer) tartılmıştır. Üzerine 150 mL çözücü eklenmiştir ve 10 dakika boyunca ultrasonik banyoda çözünmesi sağlandıktan sonra bu çözeltinin oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir ve hacmine tamamlanmıştır.

25 mL'lik 5 adet balon jojeye sırasıyla hazırlanan bu tablet çözeltisinden 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5 mL ve üzerlerine 1000 µg mL⁻¹ lik hazırlanan Etodolak standart çözeltisinden sırasıyla 7, 6, 5, 4, 3 mL eklenmiştir. Daha sonra tekrar üzerlerine 80 µg mL⁻¹'lik Tiyokolşikosid standart çözeltisinden de sırasıyla 1,75, 1,5, 1,25, 1, 0,75 mL konulmuştur. Son olarak tüm balon jojeler çözücü ile 25 mL'ye tamamlanmıştır.

3.2.8. Doğruluk çalışması için gerekli çözeltilerin hazırlanması

% 75 Doğruluk Çözeltisi: Yaklaşık 225 mg plasebo karışımı, 150 mg civarı hassas tartılan Etodolak çalışma standardı ve 3 mg civarı hassas tartılan Tiyokolşikosid çalışma standardı 500 mL balon joje içerisine alındı. Üzerine 150 ml çözücü eklendi ve 10 dakika boyunca ultrasonik banyoda çözünmesi sağlandı. Oda sıcaklığına gelmesi beklendi ve çözücü ile hacmine tamamlandı. 0,22 µm PVDF filtreden süzülerek enjeksiyon yapıldı. Üç ayrı test çözeltisi hazırlandı. (C_E : 300 µg mL⁻¹, C_T : 6 µg mL⁻¹)

% 100 Doğruluk Çözeltisi: Yaklaşık 225 mg plasebo karışımı, 200 mg civarı hassas tartılan Etodolak çalışma standardı ve 4 mg civarı hassas tartılan Tiyokolşikosid çalışma standardı 500 mL balon joje içerisine alındı. Üzerine 150 ml çözücü eklendi ve 10 dakika boyunca ultrasonik banyoda çözünmesi sağlandı. Oda sıcaklığına gelmesi beklendi ve çözücü ile hacmine tamamlandı. 0,22 µm PVDF filtreden süzülerek enjeksiyon yapıldı. Üç ayrı test çözeltisi hazırlandı. (C_E : 400 µg mL⁻¹, C_T : 8 µg mL⁻¹)

% 125 Doğruluk Çözeltisi: Yaklaşık 225 mg plasebo karışımı, 250 mg civarı hassas tartılan Etodolak çalışma standardı ve 5 mg civarı hassas tartılan Tiyokolşikosid çalışma standardı 500 mL balon joje içerisine alındı. Üzerine 150 mL çözücü eklendi ve 10 dakika boyunca ultrasonik banyoda çözünmesi sağlandı. Oda sıcaklığına gelmesi beklendi ve çözücü ile hacmine tamamlandı. 0,22 µm PVDF filtreden süzülerek enjeksiyon yapıldı. Üç ayrı test çözeltisi hazırlandı. (C_E : 500 µg mL⁻¹, C_T : 10 µg mL⁻¹)

3.2.9. Plazmalı ortamda standart çözeltilerin hazırlanması

Plazma numuneleri, in vitro olarak standart çözeltilerden plazma üzerine ilave edilerek (spike yöntemi ile) hazırlanmıştır.

Tiyokolşikosid ana stok çözeltisi: 250 mL’de 20 mg olacak şekilde çözücü ortamında hazırlanmıştır.

Tiyokolşikosid çalışma standart çözeltileri: 0,25’er mL insan plazması üzerine son konsantrasyonlar 0,4, 1,6, 4, 6, 8, 10 µg mL⁻¹ olacak şekilde, çözücü ile hazırlanan Tiyokolşikosid ana stok çözeltisinden, gerekli miktarlar eklenip, 20 mL’ye çözücü ile seyreltilerek, 6 adet çalışma standart çözeltisi hazırlanmıştır.

Etodolak ana stok çözeltisi: 50 mL’de 100 mg olacak şekilde çözücü ortamında hazırlanmıştır.

Etodolak çalışma standart çözeltileri: 0,25'er mL insan plazması üzerine son konsantrasyonlar 20, 80, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olacak şekilde, çözücü ile hazırlanan Etodolak ana stok çözeltisinden, gerekli miktarlar eklenip, 20 mL'ye çözücü ile seyreltilerek, 6 adet çalışma standart çözeltisi hazırlanmıştır.

Bütün plazma numuneleri önce ultrasonik banyoda bekletilmiştir daha sonra vorteks ile karıştırılmıştır. Daha sonra bu numunelerden santrifüj tüplerine alınan kısımlar, 4000 devir dk^{-1} 'da 5 dk santrifüjlenerek proteinlerin çökmesi sağlanmıştır. Üst faz 0,22 μm enjektör ucu filtre ile süzülerek, viallere konulmuştur, sisteme enjekte edilmiştir. Tüm plazma numuneleri ekstraksiyon yöntemine gerek duyulmadan kolayca hazırlanmıştır.

3.2.10. Plazmalı ortamda farmasötik preperat çözeltilerinin hazırlanması

20 adet tablet tek tek tartılarak ortalama tablet ağırlığı bulundu ve havanda toz haline getirildi. Toz halindeki numuneden yaklaşık 450 mg civarı hassas tartılmış toz (4 mg tiyokolşikosid, ve 200 mg etodolağa eşdeğer) 50 mL balon joje içerisine tartıldı. Üzerine 15 mL çözücü eklendi ve 10 dakika boyunca ultrasonik banyoda çözünmesi sağlandı. Bu çözeltinin oda sıcaklığına gelmesi beklendi ve hacmine tamamlandı. Bu çözeltiden alınan 2 mL'lik kısımlar, her biri 0,25'er mL plazma içeren 20'şer mL'lik 6 ayrı balon jojeye konulmuştur ve her biri çözücü ile 20 mL'ye tamamlanmıştır. Yapılan seyreltmeler sonucu 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Etodolak ve 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Tiyokolşikosid içeren 6 çözelti elde edilmiştir. Bu çözeltilerden santrifüj tüplerine alınan kısımlar, 4000 devir dk^{-1} 'da 5 dk santrifüjlenmiştir ve proteinlerin çökmesi sağlanmıştır. Üst faz 0,22 μm enjektör ucu filtre ile süzülerek, viallere konulmuştur, sisteme enjekte edilmiştir.

3.2.11. Plazmalı ortamda standart ekleme metodunda kullanılan standart çözeltilerin hazırlanması

50 mL balon joje içerisine 450 mg civarı hassas tartılmış Etotio tablet tozu (4 mg tiyokolşikosid, ve 200 mg etodolağa eşdeğer) tartılmıştır. Üzerine 15 mL çözücü eklenmiştir ve 10 dakika boyunca ultrasonik banyoda çözünmesi sağlandıktan sonra bu çözeltinin oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir ve hacmine tamamlanmıştır.

0,25'er mL plazma içeren 20 mL'lik 5 adet balon jojeye sırasıyla hazırlanan bu tablet çözeltisinden 6, 8, 10, 12, 14 mL ve üzerlerine $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ lik hazırlanan Etodolak standart çözeltisinden sırasıyla 5,6, 4,8, 4, 3,2, 2,4 mL eklenmiştir. Daha sonra tekrar üzerlerine $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik Tiyokolşikosid standart çözeltisinden de sırasıyla 1,4, 1,2, 1, 0,8, 0,6 mL konulmuştur. Son olarak tüm balon jojeler çözünü ile 20 mL'ye tamamlanmıştır. Bu çözeltilerden santrifüj tüplerine alınan kısımlar, $4000 \text{ devir dk}^{-1}$ 'da 5 dk santrifüjlenmiştir ve proteinlerin çökmesi sağlanmıştır. Üst faz $0,22 \mu\text{m}$ enjektör ucu filtre ile süzülerek, viallere konulmuştur, sisteme enjekte edilmiştir.

3.2.12. Plazmalı ortamda doğruluk çözeltilerinin hazırlanması

Plasebo stok çözeltisi: Yaklaşık 225 mg plasebo karışımı tartılıp 50 mL balon joje içerisinde çözücü ile hacmine tamamlanmıştır.

Tiyokolşikosid ana stok çözeltisi: 250 mL'de 20 mg olacak şekilde çözücü ortamında hazırlanmıştır.

Etodolak ana stok çözeltisi: 50 mL'de 100 mg olacak şekilde çözücü ortamında hazırlanmıştır.

% 75 Doğruluk Çözeltisi: 2 mL plasebo karışımı, 1,5 mL Tiyokolşikosid stok çözeltisi ve 3 mL Etodolak stok çözeltisi içerisinde 0,25'er mL plazma bulunan 20 mL'lik balon jojelere eklendi ve çözücü ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltilerden santrifüj tüplerine alınan kısımlar, $4000 \text{ devir dk}^{-1}$ 'da 5 dk santrifüjlendi ve

proteinlerin çökmesi sağlandı. Üst faz 0,22 µm enjektör ucu filtre ile süzülerek, viallere konuldu, sisteme enjekte edildi. Üç ayrı test çözeltisi hazırlandı.

% 100 Doğruluk Çözeltisi: 2 mL plasebo karışımı, 2 mL Tiyokolşikosid stok çözeltisi ve 4 mL Etodolak stok çözeltisi içerisinde 0,25'er mL plazma bulunan 20 mL'lik balon jojelere eklendi ve çözücü ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltilerden santrifüj tüplerine alınan kısımlar, 4000 devir dk^{-1} 'da 5 dk santrifüjlendi ve proteinlerin çökmesi sağlandı. Üst faz 0,22 µm enjektör ucu filtre ile süzülerek, viallere konuldu, sisteme enjekte edildi. Üç ayrı test çözeltisi hazırlandı.

% 125 Doğruluk Çözeltisi: 2 mL plasebo karışımı, 2,5 mL Tiyokolşikosid stok çözeltisi ve 5 mL Etodolak stok çözeltisi içerisinde 0,25'er mL plazma bulunan 20 mL'lik balon jojelere eklendi ve çözücü ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltilerden santrifüj tüplerine alınan kısımlar, 4000 devir dk^{-1} 'da 5 dk santrifüjlendi ve proteinlerin çökmesi sağlandı. Üst faz 0,22 µm enjektör ucu filtre ile süzülerek, viallere konuldu, sisteme enjekte edildi. Üç ayrı test çözeltisi hazırlandı.

3.3. Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi

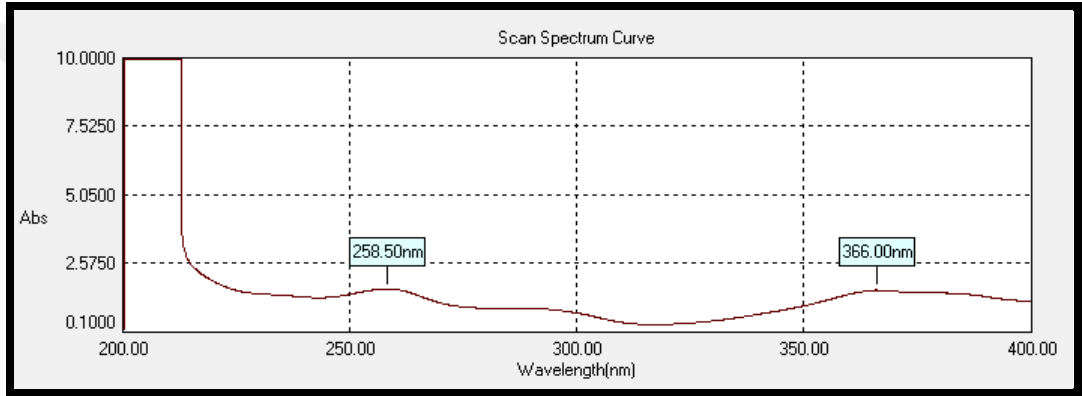
3.3.1. YPSK yöntemi ile yapılan çalışmalar

3.3.1.1. Yöntemin optimizasyonu

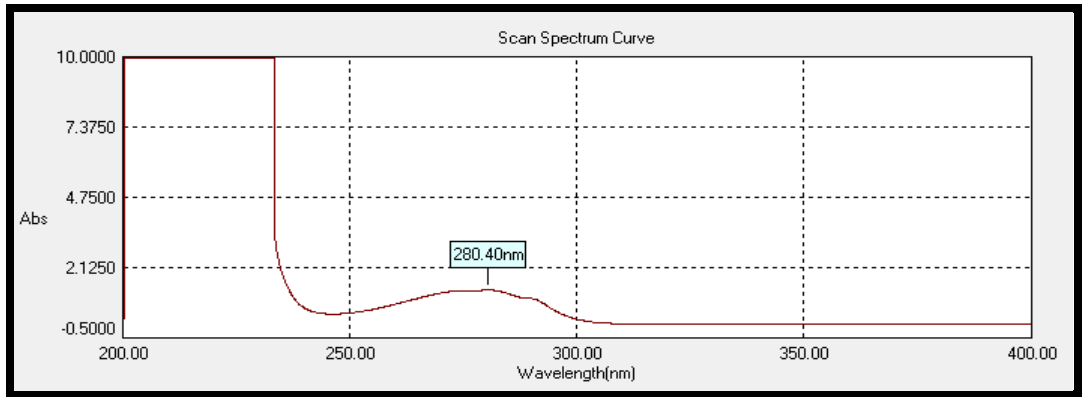
Etodolak ve Tiyokolşikosid'in YPSK ile farmasötik preparatlardan aynı anda analizi için kromatografik koşullar optimize edilmiştir. Bu amaçla dedektör, dalgaboyu, mobil faz seçimi, sabit faz seçimi (kolon seçimi), mobil faz sistemi, mobil faz bileşimi, mobil faz akış hızı, mobil faz pH'ı, enjeksiyon hacminin Etodolak ve Tiyokolşikosid ters-faz sıvı kromatografisi ile ayırımına etkileri incelenmiştir. Belirtilen şartlar altında geliştirilen yöntem ilaç maddelerinin tabletlerinden hazırlanan karışıma uygulanmıştır.

3.3.1.2. Kromatografik şartlar

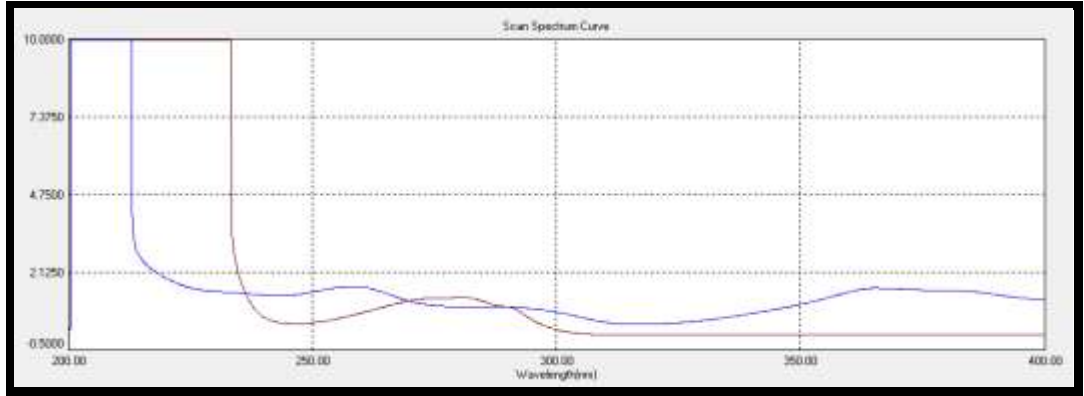
Geliştirilen YPSK yöntemi için en uygun şartlar: UV-Spektrofotometre kullanılarak 200-400 nm arası bölge taratılmış ve Tiyokolşikosid 258,50 nm maksimum absorbans, Etodolak 280,40 nm maksimum absorbans vermiştir. Tiyokolşikosid'in kullanılan tabletteki konsantrasyonu Etodolak'a göre çok düşük olduğu için Tiyokolşikosid'in maksimum absorbans gösterdiği 259 nm dalga boyu olarak seçilmiştir. Etodolak'a ait spektrum Şekil 3.1.'de, Tiyokolşikosid'e ait spektrum Şekil 3.2.'de ve ikisinin çakıştırılmış spektrumu Şekil 3.3.'te verilmiştir.



Şekil 3.1. Tiyokolşikosid'e ait spektrum



Şekil 3.2. Etodolak'a ait spektrum



Şekil 3.3. Tiyokolşikosid ve Etodolak'ın çakıştırılmış spektrumları

Diyot array dedektörlü (DAD) bir YPSK sisteminde 259 nm'de analiz Tosoh Bioscience TSKgel ODS-80TM 4,6x150 mm 5 μ m parçacık boyutlu kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. YPSK sisteminin tüm hatları ile günlük çalışmanın başlangıcında 20 dk boyunca deiyonize su ile temizlenmiştir. Daha sonra kolon takılarak hareketli faz ile kolon dengeye getirilmiştir. Basınç sabitlenene kadar mobil faz geçirilmiştir. Mobil faz için çeşitli kombinasyonlar kullanılmıştır. Fosfat tamponu çeşitli pH değerlerine ayarlanmıştır ve denemeler yapılmıştır. Farklı değişik gradient elüsyonlar denenmiştir. Bu denemeler sonucunda fosfat tamponu pH 3,5 (mobil faz A) ve metanol (mobil faz B)'ün gradient elüsyonuna karar verilmiştir.

Tablo 3.1. Gradient elüsyon

Zaman (dakika)	Hareketli Faz A (%)	Hareketli Faz B (%)
0	85	15
2	15	85
5	15	85
7	85	15
12	85	15

YPSK sisteminde yapılan denemeler sonucunda, 25°C'lik kolon fırını sıcaklığı, 20 μ L'lik enjeksiyon hacmi ve 1,0 mL dk⁻¹'lık akış hızı sistem için en uygun şartlar olarak seçilmiştir. Örnekleyici sıcaklığı 25°C'ye ayarlanmıştır. Bu şartlarda alınan kromatogramlardan Tiyokolşikosid ve Etodolak için alıkonma zamanları (RT, Retention Time) sırasıyla 4,1 ve 6,4 dakika olarak tespit edilmiştir. Çalışma sonunda

kolon 1 ml dk⁻¹ akış ile metanol ve su ile yıkanmış ve kolonun saklama çözeltisi olan % 70 metanol ve % 30 su ile son olarak bırakılmıştır. Sistem ise çalışmanın başında olduğu gibi tekrar tüm hatlarıyla 20 dakika boyunca deiyonize su ile yıkanmıştır.



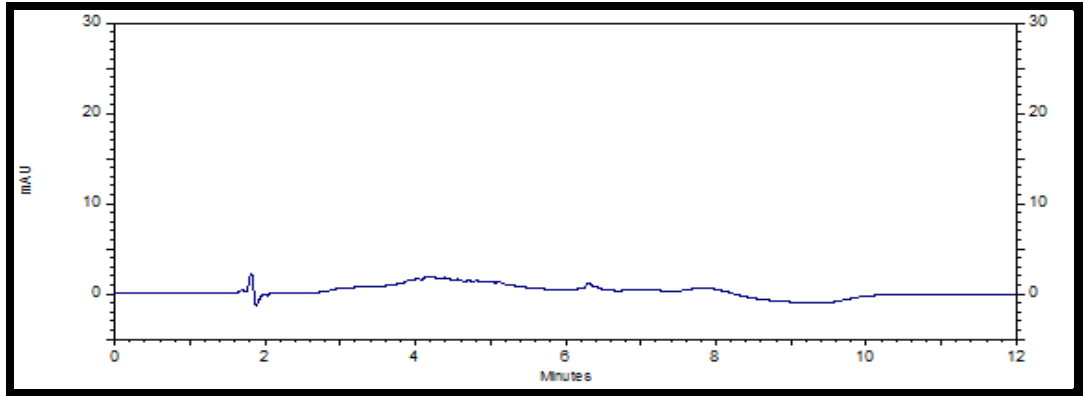
BÖLÜM 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Seçicilik

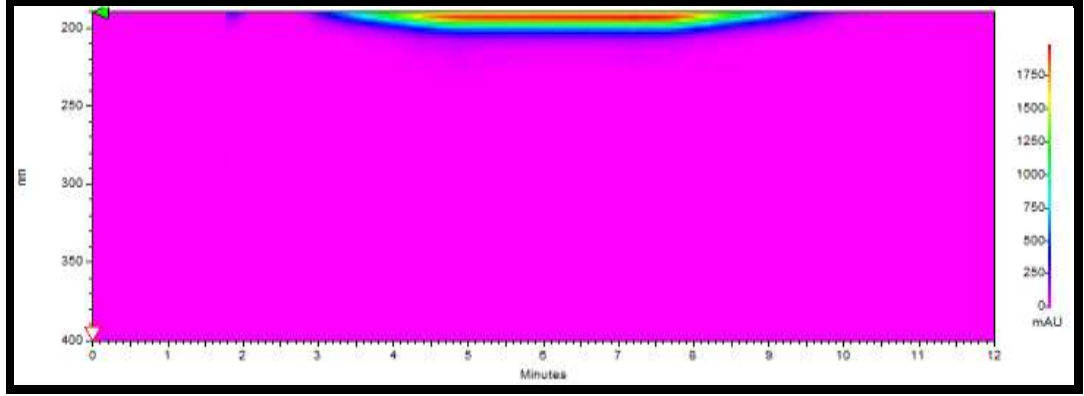
Seçicilik parametresinin doğrulanması için, yardımcı maddeler karışımı ile plasebo hazırlanmış ve bu plasebodan bir tabletin içerdiği miktar ile test çözeltisi hazırlanarak analize alınmıştır. Elde edilen kromatogramda her iki etkene ait piklerin geldiği yerde belirgin bir pik gözlenmemiştir. Çözücü ve plazma ortamında ayrı ayrı uygulama yapılmıştır.

4.1.1. Çözücü ortamındaki kromatogramlar ve üç boyutlu spektrumlar

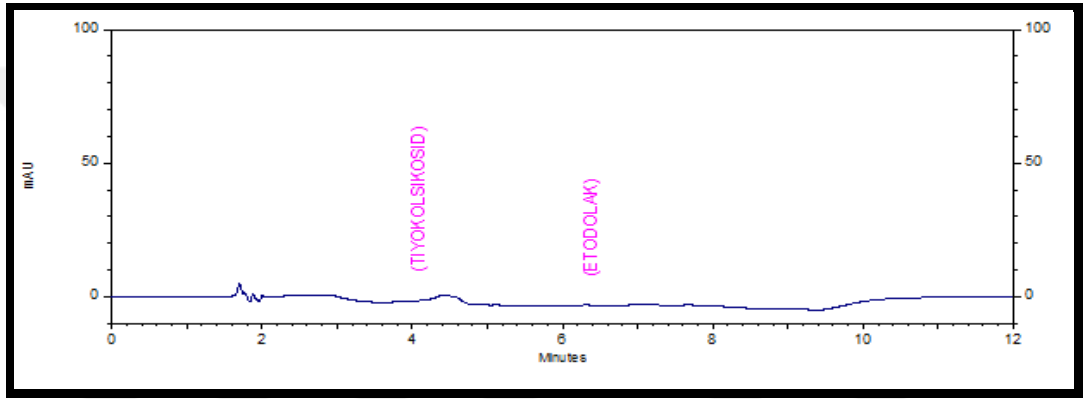
Çözücü ortamında elde edilen kromatogramlar ve üç boyutlu spektrumlar Şekil 4.1.-4.12.'de verilmiştir.



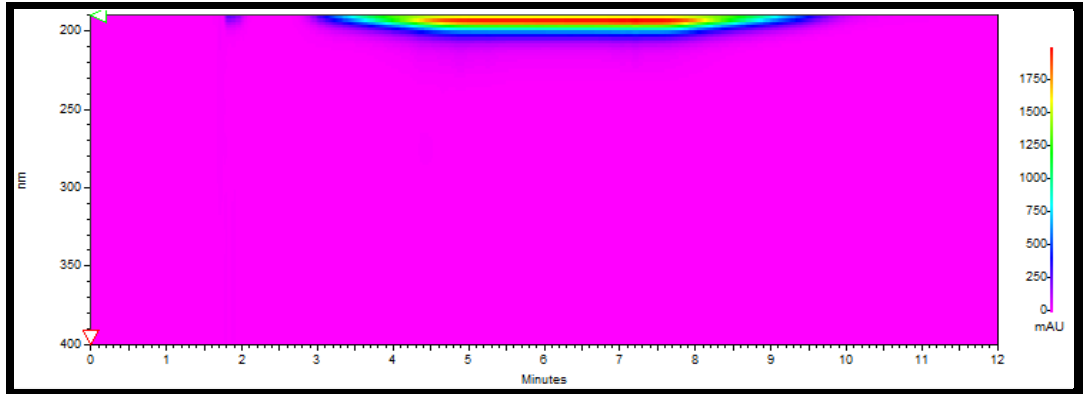
Şekil 4.1. 259 nm’de çözücüye ait kromatogram



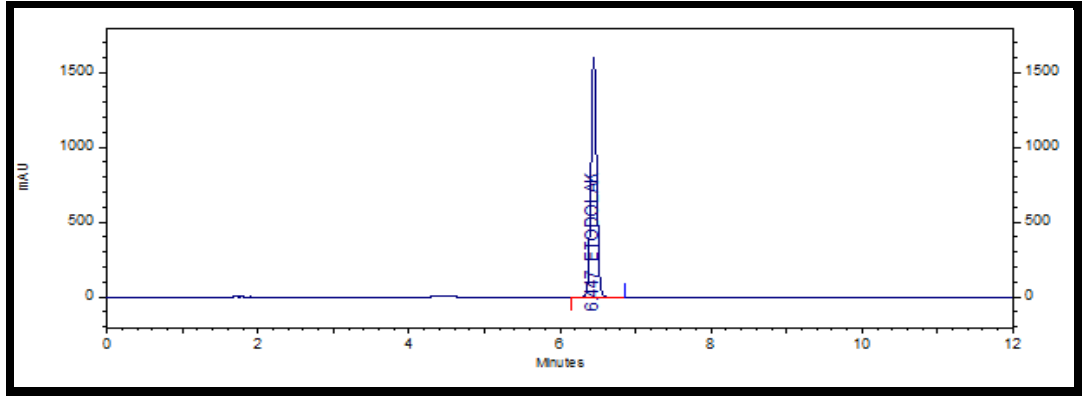
Şekil 4.2. 259 nm’de çözücüye ait üç boyutlu spektrum



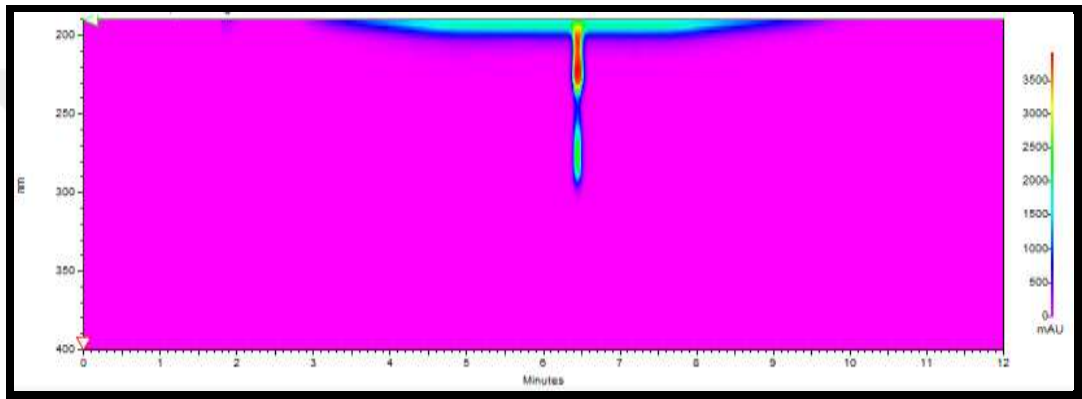
Şekil 4.3. 259 nm’de plaseboya ait kromatogram



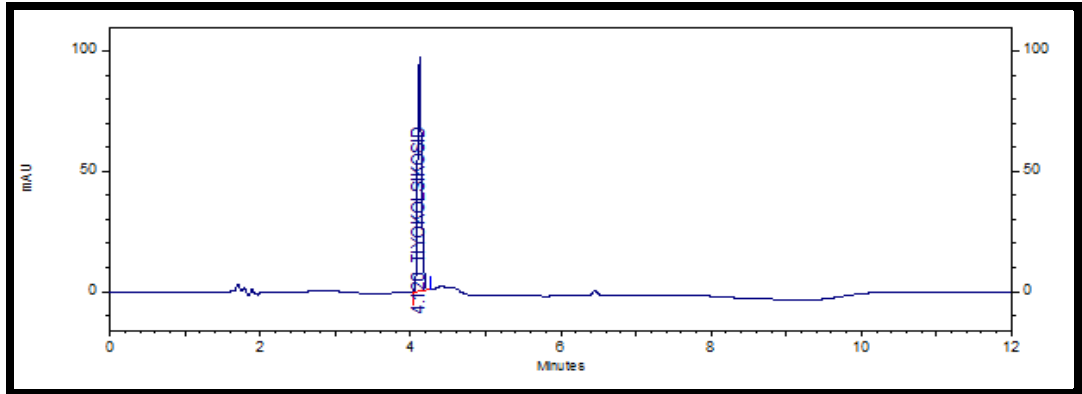
Şekil 4.4. 259 nm’de plaseboya ait üç boyutlu spektrum



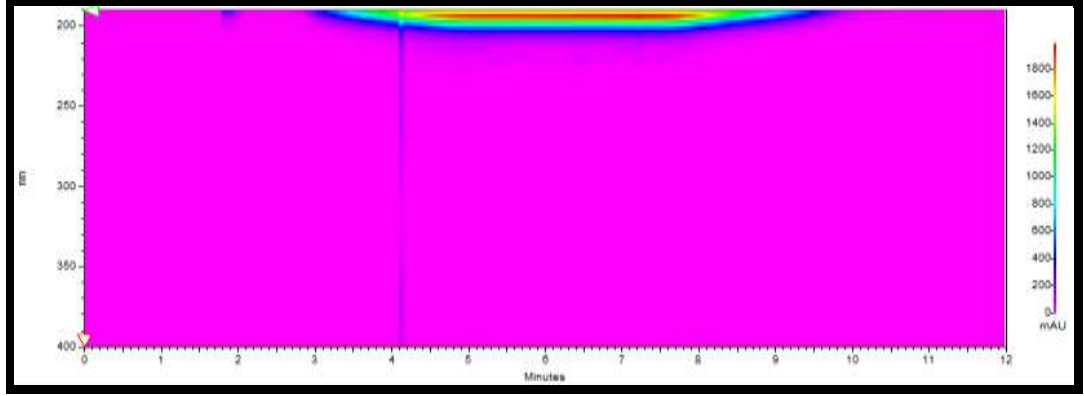
Şekil 4.5. 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik Etodolac'a ait kromatogram



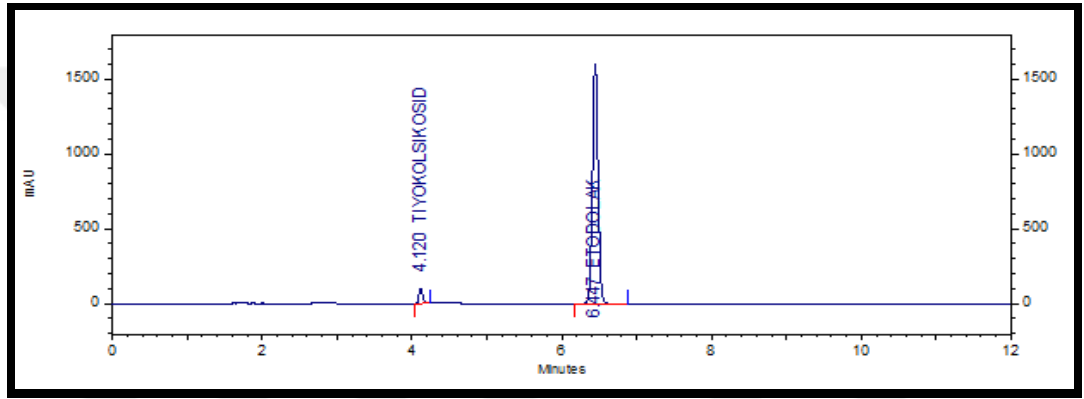
Şekil 4.6. 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik Etodolac'a ait üç boyutlu spektrum



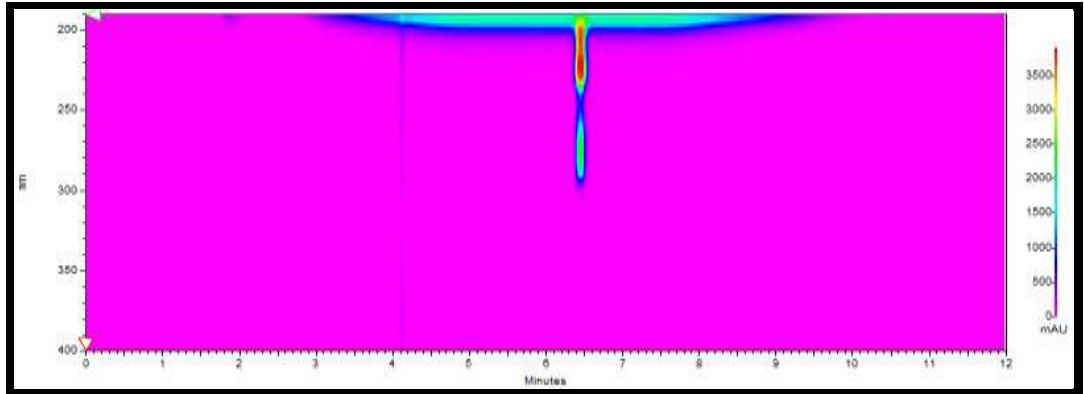
Şekil 4.7. 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik Tiyokolşikosid'e ait kromatogram



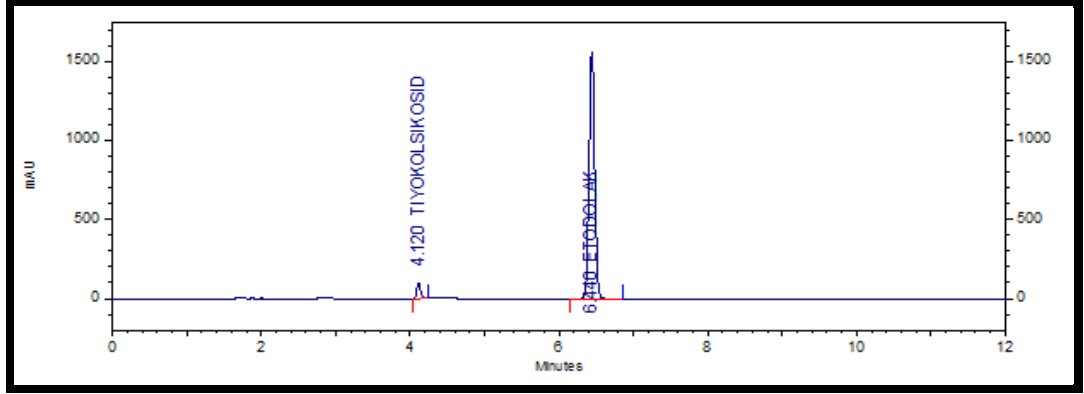
Şekil 4.8. 8 µg mL⁻¹'lik Tiyokolşikosid'e ait üç boyutlu spektrum



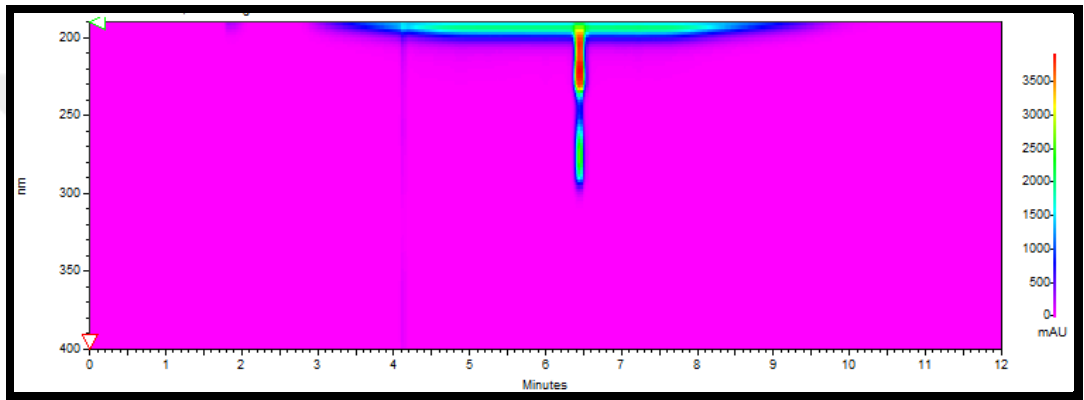
Şekil 4.9. 8 µg mL⁻¹'lik Tiyokolşikosid ve 400 µg mL⁻¹'lik Etodolak'a ait kromatogram



Şekil 4.10. 8 µg mL⁻¹'lik Tiyokolşikosid ve 400 µg mL⁻¹'lik Etodolak'a ait üç boyutlu spektrum



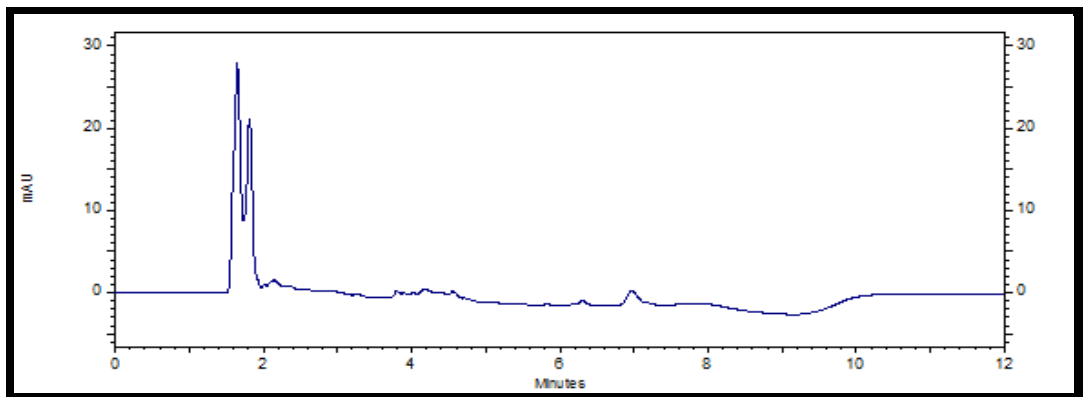
Şekil 4.11. 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik Tiyokolşikosid ve 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik Etodolak içeren Etotio tablete ait kromatogram



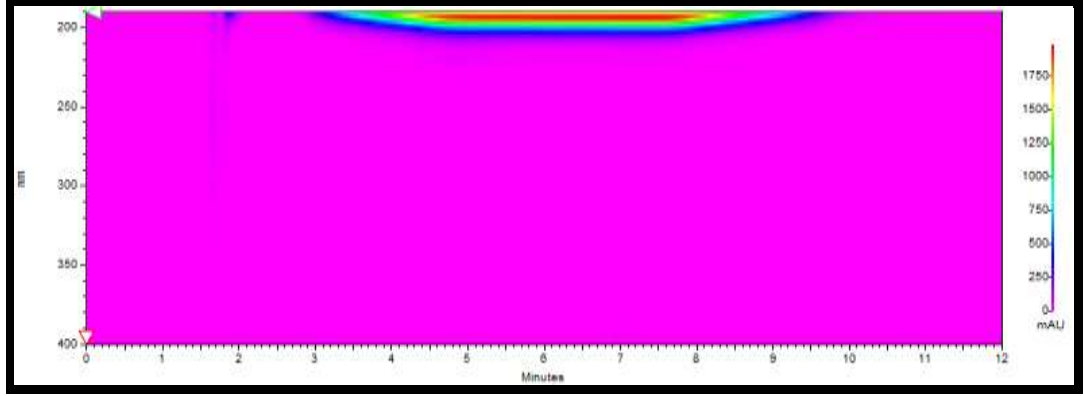
Şekil 4.12. 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik Tiyokolşikosid ve 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik Etodolak içeren Etotio tablete ait üç boyutlu spektrum

4.1.2. Plazma ortamındaki kromatogramlar ve üç boyutlu spektrumlar

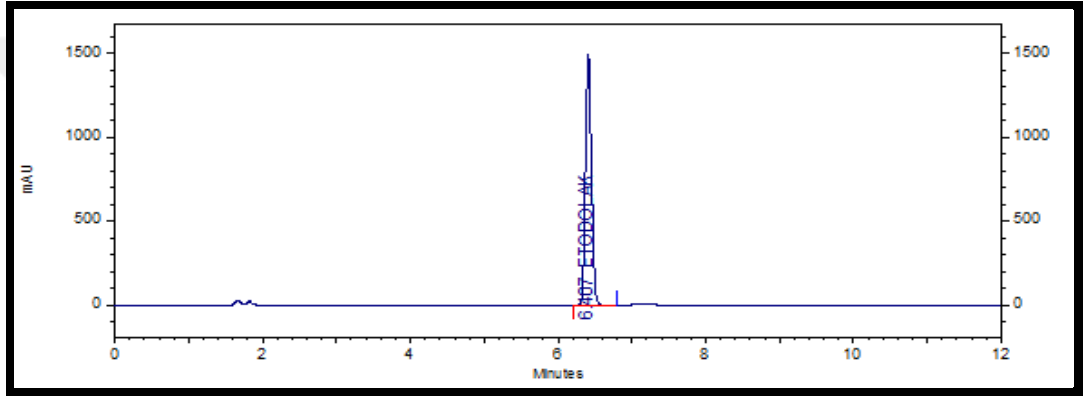
Plazma ortamında elde edilen kromatogramlar ve üç boyutlu spektrumlar Şekil 4.13.-4.22.'de verilmiştir.



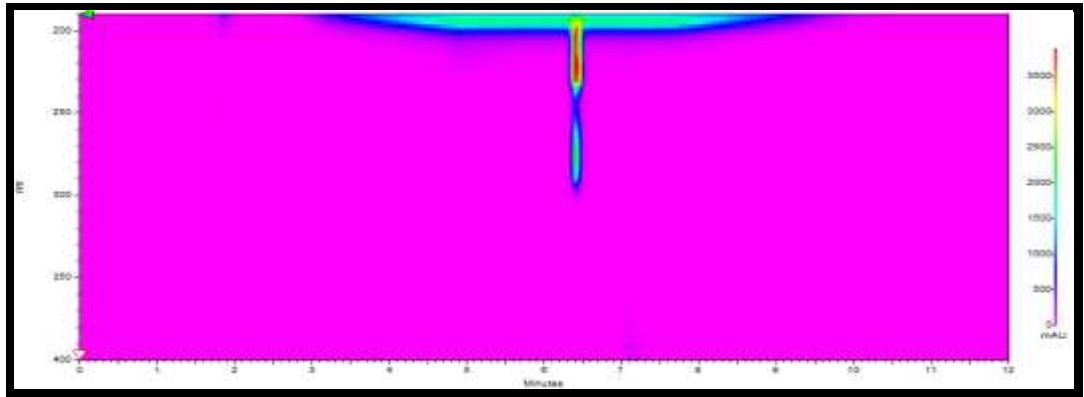
Şekil 4.13. 259 nm'de plazma ortamındaki çözücüye ait kromatogram



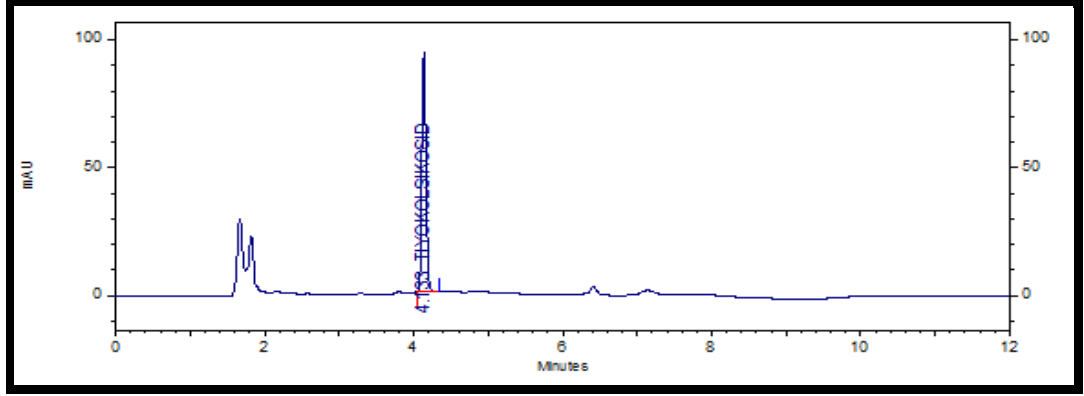
Şekil 4.14. 259 nm’de plazma ortamındaki çözücüye ait üç boyutlu kromatogram



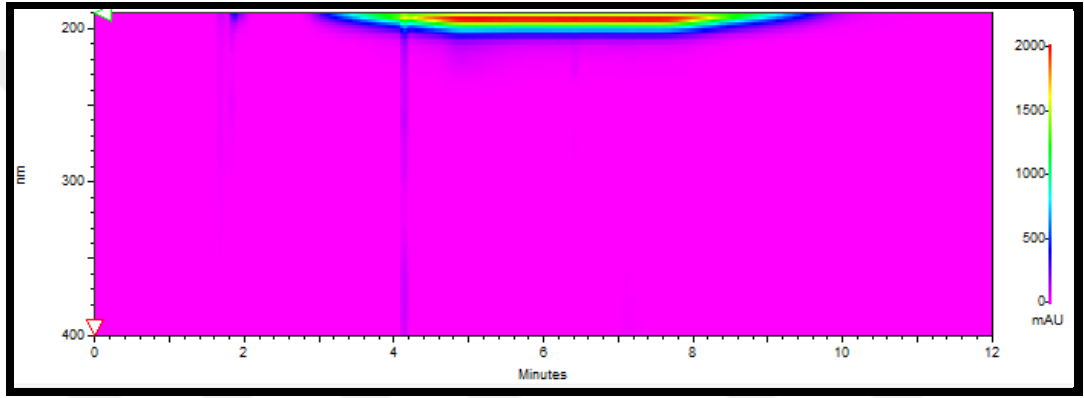
Şekil 4.15. 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ’lik Etodolak’ın plazma ortamındaki kromatogramı



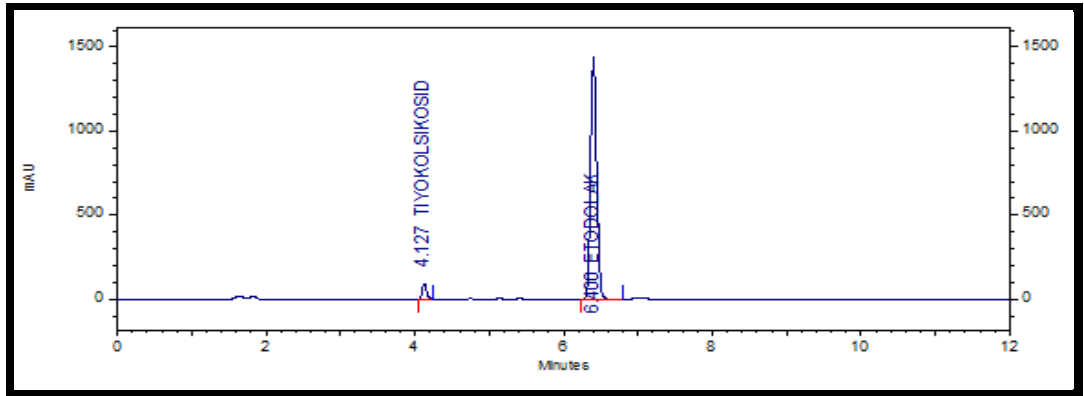
Şekil 4.16. 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ’lik Etodolak’ın plazma ortamındaki üç boyutlu spektrumu



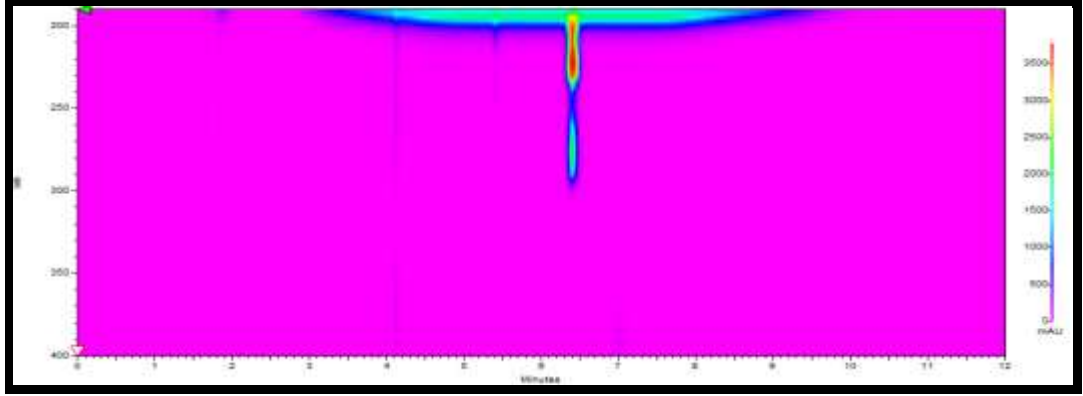
Şekil 4.17. 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik Tiyokolşikosid'in plazma ortamındaki kromatogramı



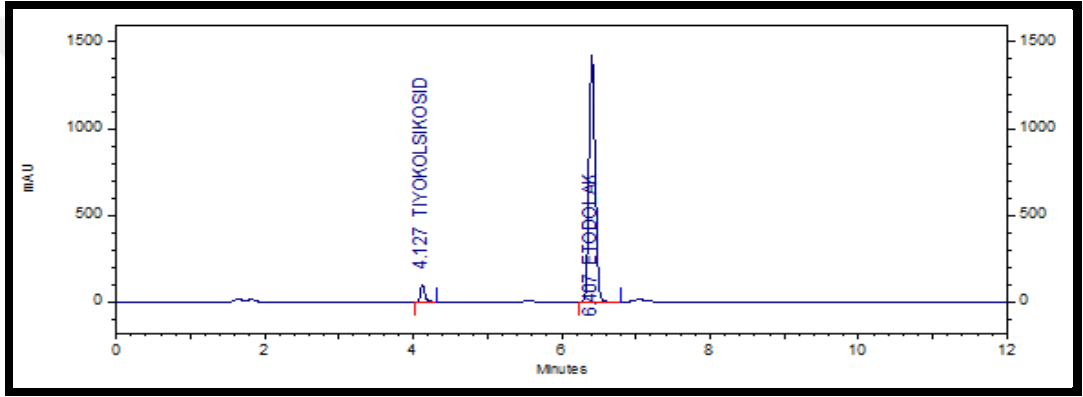
Şekil 4.18. 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik Tiyokolşikosid'in plazma ortamındaki üç boyutlu spektrumu



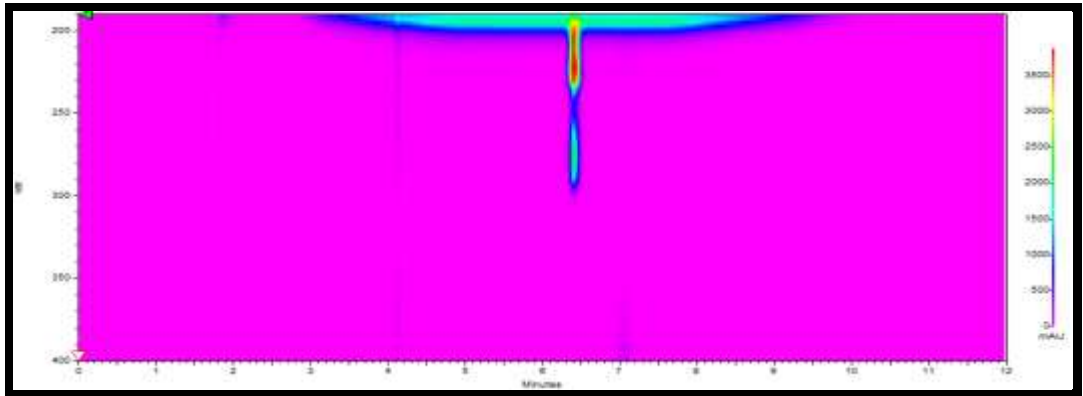
Şekil 4.19. 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik Tiyokolşikosid ve 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik Etodolak'ın plazma ortamındaki kromatogramı



Şekil 4.20. 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik Tiyokolşikosid ve 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik Etodolak'ın plazma ortamındaki üç boyutlu spektrumu



Şekil 4.21. 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik Tiyokolşikosid ve 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik Etodolak içeren Etotio tabletin plazma ortamındaki kromatogramı



Şekil 4.22. 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik Tiyokolşikosid ve 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik Etodolak içeren Etotio tabletin plazma ortamındaki üç boyutlu spektrumu

Bu çalışmaya eş zamanlı olarak test çözeltisi hazırlanmış ve analize alınmıştır. Elde edilen kromatogramda her iki etkene ait piklerin saflıkları ölçülmüştür. Bulunan değerler Tablo 4.1.'de sunulmuştur.

Tablo 4.1. Test çözeltisinden elde edilen pik saflığı değerleri

Bileşen	Alıkonma Süresi	Pik Saflığı
Tiyokolşikosid	4,1	1,000
Etodolak	6,4	0,949

4.2. Çalışma Aralığı

Etodolak ve Tiyokolşikosid içeren tabletler için miktar tayini analizi sırasında test çözeltisi konsantrasyonu aşağıdaki gibidir.

Etodolak : 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$
 Tiyokolşikosid : 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$

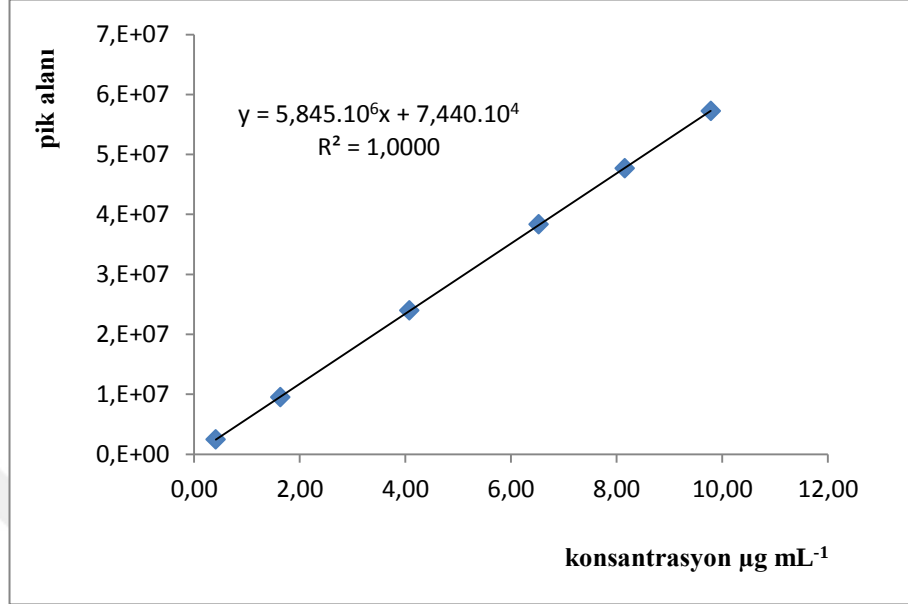
İlgili validasyon çalışmasında Etodolak için çalışma aralığı 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ile 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak tanımlanmıştır. Bu aralık test çözeltisi konsantrasyonunun yaklaşık % 5 - % 125'ine denk gelmektedir.

İlgili validasyon çalışmasında Tiyokolşikosid için çalışma aralığı 0,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ile 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak tanımlanmıştır. Bu aralık test çözeltisi konsantrasyonunun yaklaşık % 5 - % 125'ine denk gelmektedir.

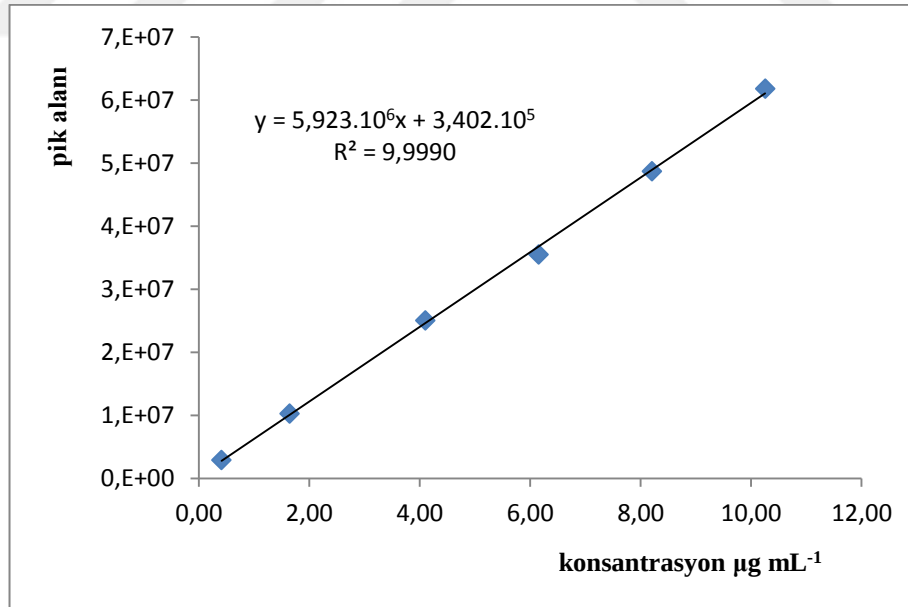
4.3. Doğrusallık

İlgili validasyon çalışmasında doğrusallık parametresinin belirlenebilmesi için her iki etken maddenin standartları kullanılarak test çözeltisi konsantrasyonunun yaklaşık % 5 - % 125'i aralığında altı değişik konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmış ve analiz edilmiştir. Her bileşen için elde edilen alan ortalamaları ve $\mu\text{g mL}^{-1}$ cinsinden konsantrasyon değerleri kullanılarak regresyon doğruları oluşturulmuş ve bu

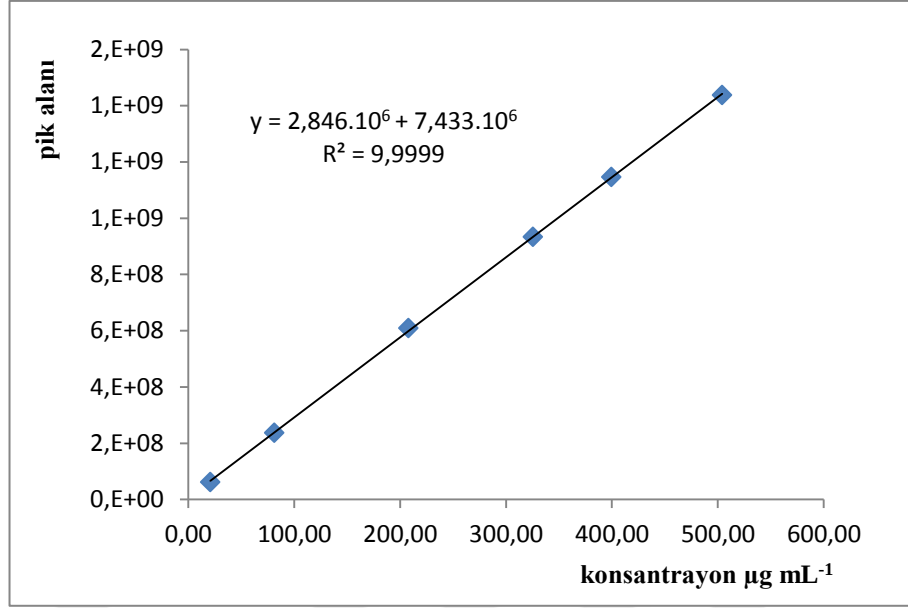
doğruların denklemleri hesaplanmıştır. Kalibrasyon eğrilerine ait regresyon denklemi ve regresyon katsayıları hesaplanmıştır (Şekil 4.13.-4.16.).



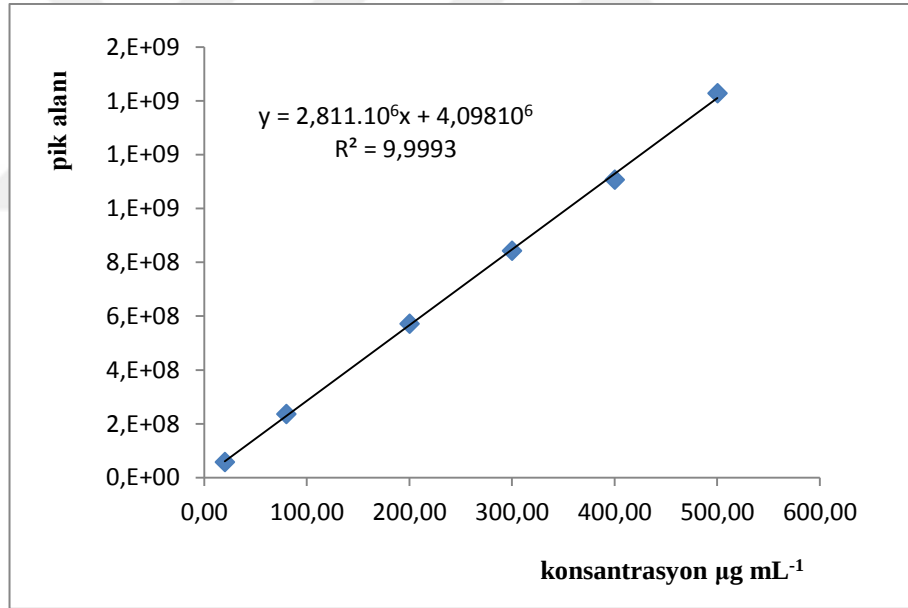
Şekil 4.23. YPSK ile çözücü ortamında, TiyoKolşikosid'in standart çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.24. YPSK ile plazma ortamında, TiyoKolşikosid'in standart çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.25. YPSK ile çözücü ortamında, Etodolak'ın standart çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.26. YPSK ile plazma ortamında, Etodolak'ın standart çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi

Standart Etodolak ve Tiyokolşikosid çözeltileri için elde edilen regresyon denklemleri, regresyon katsayıları, eğimleri ve kaymalarının standart sapmaları Tablo 4.2.-4.5.'te verilmiştir.

Tablo 4.2. YPSK sisteminde, çözücü ortamında Tiyokolşikosid standart çözeltilerinden elde edilmiş istatistiksel analiz sonuçları (259 nm’de) (n=6)

Doğrusal Aralık, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Regresyon Doğru Denklemi	S_b	S_m	Regresyon katsayısı, R^2
0,4-10	$y = 5845000x + 74400$	100704	15043	1,0000

S_b : Regresyon doğrusundaki kaymanın standart sapması, S_m : Regresyon doğrusu eğiminin standart sapması

Tablo 4.3. YPSK sisteminde, çözücü ortamında Etodolak standart çözeltilerinden elde edilmiş istatistiksel analiz sonuçları (259 nm’de) (n=6)

Doğrusal Aralık, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Regresyon Doğru Denklemi	S_b	S_m	Regresyon katsayısı, R^2
20-500	$y = 2846000x + 7433000$	6237430	18484	0,9999

Tablo 4.4. YPSK sisteminde, plazma ortamında Tiyokolşikosid standart çözeltilerinden elde edilmiş istatistiksel analiz sonuçları (259 nm’de) (n=6)

Doğrusal Aralık, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Regresyon Doğru Denklemi	S_b	S_m	Regresyon katsayısı, R^2
0,4-10	$y = 5923000x + 340200$	900757	132836	0,9990

Tablo 4.5. YPSK sisteminde, plazma ortamında Etodolak standart çözeltilerinden elde edilmiş istatistiksel analiz sonuçları (259 nm’de) (n=6)

Doğrusal Aralık, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Regresyon Doğru Denklemi	S_b	S_m	Regresyon katsayısı, R^2
20-500	$y = 2811000x + 4098000$	17625807	53292	0,9993

4.4. Doğruluk

4.4.1. Yöntemin plasebo ve standartlarla uygulanması

İlgili validasyon çalışmasında, yardımcı maddeler karışımı ile plasebo hazırlanmış ve bu karışım üzerine test çözeltisi konsantrasyonunun % 75, % 100 ve % 125’i oranlarında her iki bileşenin standardı eklenerek metotta tanımlanan kromatografik şartlarda analiz edilerek geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Bulunan sonuçlar aşağıdaki Tablo 4.6. ve Tablo 4.7.’de sunulmuştur.

Tablo 4.6. YPSK sisteminde, çözücü ortamında, Tiyokolşikosid ve Etodolak standart çözeltilerinin geri kazanım değerleri

Tiyokolşikosid				Etodolak			
Eklenen ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Bulunan ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Geri Kazanım (%)	Doğruluk BH (%)	Eklenen ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Bulunan ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Geri Kazanım (%)	Doğruluk BH (%)
5,96	5,86	98,32	1,68	300,35	301,55	100,40	-0,40
6,00	5,86	97,60	2,40	299,99	301,07	100,36	-0,36
6,04	5,87	97,12	2,88	300,54	301,87	100,44	-0,44
8,87	8,74	98,58	1,42	399,94	401,54	100,40	-0,40
8,59	8,76	101,91	-1,91	400,57	402,06	100,37	-0,37
8,73	8,75	100,21	-0,21	400,38	401,30	100,23	-0,23
11,03	10,82	98,15	1,85	496,80	495,71	99,78	0,22
10,71	10,83	101,08	-1,08	496,70	495,61	99,78	0,22
10,52	10,81	102,80	-2,80	497,18	495,29	99,62	0,38

Geri Kazanım = Bulunan Miktar/Bilinen Miktar x 100, BH = Bulunan Miktar-Bilinen Miktar/Bilinen Miktar x 100

Tablo 4.7. YPSK sisteminde, plazma ortamında, Tiyokolşikosid ve Etodolak standart çözeltilerinin geri kazanım değerleri

Tiyokolşikosid				Etodolak			
Eklenen ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Bulunan ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Geri Kazanım (%)	Doğruluk BH (%)	Eklenen ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Bulunan ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Geri Kazanım (%)	Doğruluk BH (%)
6,15	5,99	97,27	2,73	297,15	290,14	97,64	2,36
6,15	5,99	97,27	2,73	297,15	289,78	97,52	2,48
6,15	5,98	97,21	2,79	297,15	290,29	97,69	2,31
8,21	8,24	100,41	-0,41	396,20	386,65	97,59	2,41
8,21	8,21	100,10	-0,10	396,20	387,20	97,73	2,27
8,21	8,22	100,22	-0,22	396,20	386,29	97,50	2,50
10,26	10,31	100,55	-0,55	495,25	496,44	100,24	-0,24
10,26	10,33	100,68	-0,68	495,25	489,45	98,83	1,17
10,26	10,30	100,41	-0,41	495,25	494,36	99,82	0,18

4.4.2. Standart ekleme yöntemi ile elde edilen sonuçlar

YPSK ile çözücü ortamında, Bölüm 3.2.7.'de hazırlanan Etodolak ve Tiyokolşikosid standartları ile birlikte eklenen ticari tabletten elde edilen geri kazanım, SD, RSD, BH (doğruluk) değerleri Tablo 4.8.'de görülmektedir.

Tablo 4.8. YPSK sisteminde, çözücü ortamında, standart ekleme yöntemi ile elde edilmiş analiz sonuçları

Etodolak					Tiyokolşikosid				
Eklenen Miktar					Eklenen Miktar				
Tb	Standart Çözelti ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Bulunan Miktar	Geri Kazanım (%)	BH (%)	Tb	Standart Çözelti ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Bulunan Miktar	Geri Kazanım (%)	BH (%)
120	280	404,24	101,06	-1,06	2,4	5,6	8,00	99,94	0,06
160	240	410,24	102,56	-2,56	3,2	4,8	7,91	98,82	1,18
200	200	408,00	102,00	-2,00	4	4	8,04	100,52	-0,52
240	160	410,20	102,55	-2,55	4,8	3,2	8,09	101,18	-1,18
280	120	409,76	102,44	-2,44	5,6	2,4	8,11	101,34	-1,34
Ort. Konst.		408,49			Ort. Konst.		8,03		
SD		2,54			SD		0,08		
% RSD		0,62			% RSD		0,99		

SD: Standart Sapma, % RSD: Bağıl Standart Sapma, Tb: Tablet

YPSK ile plazma ortamında, Bölüm 3.2.11.'de hazırlanan Etodolak ve Tiyokolşikosid çözeltileri için elde edilen geri kazanım değerleri, Tablo 4.9.'da verilmiştir.

Tablo 4.9. YPSK sisteminde, plazma ortamında, standart ekleme yöntemi ile elde edilmiş analiz sonuçları

Etodolak					Tiyokolşikosid				
Eklenen Miktar					Eklenen Miktar				
Tb	Standart Çözelti ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Bulunan Miktar	Geri Kazanım (%)	BH (%)	Tb	Standart Çözelti ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Bulunan Miktar	Geri Kazanım (%)	BH (%)
120	280	373,17	93,29	6,71	2,4	5,6	7,84	98,05	1,95
160	240	371,10	92,77	7,23	3,2	4,8	8,07	100,87	-0,87
200	200	380,81	95,20	4,80	4	4	8,29	103,62	-3,62
240	160	372,09	93,02	6,98	4,8	3,2	8,32	103,99	-3,99
280	120	371,82	92,92	7,05	5,6	2,4	8,27	103,33	-3,33
Ort.Konst.		373,80			Ort.Konst.		8,16		
SD		3,99			SD		0,20		
% RSD		1,07			% RSD		2,49		

4.5. Kesinlik

4.5.1. Sistem kesinliği

İlgili validasyon çalışmasında sistem kesinliği parametresini belirlemek amacıyla, % 100 test çözeltisi konsantrasyonunda her iki bileşenin standartları kullanılarak hazırlanan çözelti 6 kez analiz edilmiş ve elde edilen alanlar arasındaki relatif standart sapma değeri hesaplanmıştır. Bulunan değerler Tablo 4.10. ve Tablo 4.11.'de sunulmuştur.

Tablo 4.10. Tiyyokolşikosid ve Etodolak standart çözeltilerine ait çözücü ortamındaki RSD değerleri (n=6)

Bileşen	% RSD
Tiyyokolşikosid	0,05
Etodolak	0,05

Tablo 4.11. Tiyyokolşikosid ve Etodolak standart çözeltilerine ait plazma ortamındaki RSD değerleri (n=6)

Bileşen	% RSD
Tiyyokolşikosid	0,65
Etodolak	0,81

Hesaplanan rölatif standart sapma değerleri kabul kriteri olan %1,0'den küçük olduğu için analiz sisteminden tekrarlanabilir sonuçlar türetildiği belirlenmiştir.

4.5.2. Metot kesinliği

İlgili validasyon çalışmasında metot kesinliği parametresini belirlemek amacıyla 6 ayrı test çözeltisi hazırlanmış ve bu çözeltilerin analizinden elde edilen sonuçlar arasındaki rölatif standart sapma değeri hesaplanmıştır. Bulunan değerler Tablo 4.12. ve Tablo 4.13.'te sunulmuştur.

Tablo 4.12.Ticari preparat numunelerinin çözücü ortamındaki geri kazanım ve RSD değerleri

Tiyokolşikosid		Etodolak	
Numune	% Sonuç	Numune	% Sonuç
1	97,39	1	100,45
2	97,13	2	100,20
3	97,20	3	100,27
4	97,71	4	100,75
5	97,38	5	100,31
6	97,08	6	100,19
X	97,32	X	100,36
SD	0,23	SD	0,21
% RSD	0,24	% RSD	0,21

X: Ortalama Değer

Tablo 4.13.Ticari preparat numunelerinin plazma ortamındaki geri kazanım ve RSD değerleri

Tiyokolşikosid		Etodolak	
Numune	% Sonuç	Numune	% Sonuç
1	101,97	1	98,24
2	102,94	2	99,38
3	102,29	3	100,28
4	103,16	4	97,49
5	102,91	5	100,61
6	102,75	6	97,57
X	102,67	X	98,93
SD	0,45	SD	1,36
% RSD	0,44	% RSD	1,37

Hesaplanan relatif standart sapma değerleri kabul kriteri olan % 2,0'dan küçük olduğu için analiz sisteminden tekrarlanabilir sonuçlar türetildiği belirlenmiştir.

4.5.3. Gün-İçi ve günler-arası kesinlik

Çözeltilere ait konsantrasyon eğrileri aralığından seçilen 3 farklı konsantrasyon ile (Etodolak için 20, 200 ve 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Tiyokolşikosid için 0,4, 4 ve 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$) tekrarlanabilirlik ve kesinlik parametreleri belirlenmiştir. Tekrarlanabilirlik için gün-İçi olarak belli aralıklarda toplam 6 kez, günler-arası kesinlik için ise 3 gün peşpeşe belli aralıklarla ölçümler alınmıştır. Gün-İçi ve günler-arası kesinlik ve

tekrarlanabilirlik sonuçları, bulunan değerlerin ortalaması, standart sapması ve bağıl standart sapması şeklinde Tablo 4.14.-4.17.'de verilmiştir.

Tablo 4.14. YPSK sisteminde, çözücü ortamında Etodolak standart çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik analiz sonuçları (n=6)

Derişim ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	gün-içi			günler-arası		
	X	SD	% RSD	X	SD	% RSD
20	57631201	325180	0,56	56490289	772369	1,37
200	586454820	1059718	0,18	581158547	3241290	0,56
400	1149094022	1968822	0,17	1140852244	4706551	0,41

Tablo 4.15. YPSK sisteminde, çözücü ortamında Tiyokolşikosid standart çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik analiz sonuçları (n=6)

Derişim ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	gün-içi			günler-arası		
	X	SD	% RSD	X	SD	% RSD
0,4	2510143	39357	1,57	2528353	13395	0,53
4	23377194	33244	0,14	23285634	76659	0,33
8	45987946	37571	0,08	45853663	120552	0,26

Tablo 4.16. YPSK sisteminde, plazma ortamında Etodolak standart çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik analiz sonuçları (n=6)

Derişim ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	gün-içi			günler-arası		
	X	SD	% RSD	X	SD	% RSD
20	59589736	113265	0,19	58868231	608590	1,03
200	570994333	1097104	0,19	566378274	14850452	2,62
400	1116177800	7060274	0,63	1046603176	134707803	12,87

Tablo 4.17. YPSK sisteminde, plazma ortamında Tiyokolşikosid standart çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik analiz sonuçları (n=6)

Derişim ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	gün-içi			günler-arası		
	X	SD	% RSD	X	SD	% RSD
0,4	2616528	12672	0,48	2622952	36588	1,39
4	23499917	50494	0,21	23583017	160856	0,68
8	46686018	138631	0,30	46819422	460679	0,98

4.6. LOD ve LOQ

Nitel ve nicel tayin limitini belirlemek Etodolak ve Tiyokolşikosid standartlarının değişik konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmıştır. Nitel tayin limiti (LOD) ve nicel tayin limiti (LOQ) sinyal/gürültü oranları kullanılarak hesaplanmıştır.

Etodolak için çözücü ortamında $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonunda hazırlanan çözeltisi 3,6 sinyal/gürültü değeri vermiştir ve LOD seviyesi olarak kabul edilmiştir. LOQ'nun LOD'nin yaklaşık 3 katı olduğu varsayıldığından $0,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonunda çözeltisi hazırlanmış ve 13,8 sinyal/gürültü değeri elde edilmiştir ve LOQ seviyesi olarak kabul edilmiştir. Plazma ortamında ise $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonunda 3,1 sinyal/gürültü değeri elde edilmiştir ve LOD seviyesi olarak kabul edilmiştir. $1,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonunda hazırlanan çözeltisi ise 12,7 sinyal/gürültü değeri vermiştir ve LOQ seviyesi olarak kabul edilmiştir.

Tiyokolşikosid için çözücü ortamında ve plazma ortamında $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonunda hazırlanan çözeltiler LOD seviyesi olarak kabul edilmiştir. Sinyal/gürültü oranı çözücü ortamında 3,3 plazma ortamında plazma ortamında 3,1'dir. $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonu ise Tiyokolşikosid için çözücü ve plazma ortamında, LOQ seviyesi olarak kabul edilmiştir. Sinyal/gürültü oranı, çözücü ortamında, 11,8 ve plazma ortamında ise 10,2'dir.

4.7. Sistem Uygunluk Parametreleri

1,0 mL dk⁻¹ akış hızında, Etodolak ve Tiyokolşikosid için kapasite faktörleri sırasıyla k': 2,78 ve k': 1,42, seçicilik katsayısı; α : 1,96, piklerin kuyruklanma faktörleri T: 1,06 ve T: 1,12, kolon verimliliğinin göstergesi olan toplam teorik plaka sayısı; N: 32945 ve N: 28450, kolonun ayırma gücü olan rezolüsyon; R_s: 19,28 olarak tespit edilmiştir.

4.8. İstatiksel Değerlendirmeler

Tablo 4.18. 'de, Etodolak için çözücü ortamında hazırlanan ticari preparatlardan elde edilen geri kazanım değerleri ile plazma ortamındakiler, yine Tiyokolşikosid için çözücü ortamında hazırlanan ticari preparatlardan elde edilen geri kazanım değerleri ile plazma ortamındakiler, ANOVA testi ile karşılaştırılmıştır. F_{tablo} değeri (4,35), F_{hesaplanan} (0,0035) değerinden büyük olduğundan her iki etken maddeyi içeren ticari preparatların çözücü ortamında ve plazma ortamında hazırlanması arasında bir fark olmadığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca P değeri 0,95 olduğundan (P>0,05), grup ortalamaları eşittir ve karşılaştırmaya gerek yoktur.

Tablo 4.18. YPSK yönteminde, çözücü içerisinde ve plazma ortamında hazırlanmış ticari preparatlar için (400 µg mL⁻¹ Etodolak, 8 µg mL⁻¹ Tiyokolşikosid) elde edilen ANOVA testi verileri ($\alpha=0,05$, % 95 güvenle) (n=12)

ANOVA TEK ETKEN						
Gruplar	Say	Toplam	Ortalama	Varyans		
Sütun 1	11	6,017.10 ⁹	546978933	3,29.10 ¹⁷		
Sütun 2	11	5,858.10 ⁹	532532879	3,11.10 ¹⁷		
ANOVA						
Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	1,15.10 ¹⁵	1	1,15.10 ¹⁵	0,0035	0,95	4,35
Gruplar İçinde	6,40.10 ¹⁵	20	3,20.10 ¹⁷			
Toplam	6,40.10 ¹⁸	21				

BÖLÜM 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

İlaçlarda, tıbbi ve biyolojik numunelerde bulunan eser düzeydeki maddelerin tayin edilebilmeleri ve bununla birlikte yeni tayin yöntemlerinin geliştirilmesi, analitik kimyadaki son araştırma konuları arasında yer almaktadır. Günümüzde kombine ilaç formülasyonları giderek daha yaygın kullanım alanı bulmakta ve bu nedenle bu tür formülasyonlarda ve biyolojik materyallerde eş zamanlı analitik ilaç analiz yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu formülasyonlardaki etken maddelerin rutin analizlerinde kullanılabilecek hızlı, kolay, etkili, kesinliği yüksek, tayin edilebilirlik sınırı düşük analiz yöntemleri geliştirmek bu açıdan önemlidir. Bu amaçla, son zamanlarda karışım içerisindeki etken maddelerin özellikle hiçbir ayırma işlemine gerek duyulmadan kolaylıkla miktar tayinlerinin yapılabilmesi için bu türden yöntemlerin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu yöntemlerin genel amacı, önerilen ilacı alan bir hastanın gerçekten önerilen ilacı, önerilen dozda ve önerilen sınırlar içerisinde aldığından emin olmaktır. İlaçların kendine özgü birtakım özelliklerinden dolayı, emilimi kişiler arasında farklılıklar göstermektedir. Bu sebeplerle hastaların kan seviyelerinin doğru analiz yöntemleri ile belirlenmeleri gerekmektedir. Aktif bileşenlerin vücutta eriştiği gerçek konsantrasyonun ve aktif ilaç bileşenlerinin vücut sıvılarındaki konsantrasyonunu ölçmede kullanılan analitik yöntemin doğruluğunun, uygun kesinliğe sahip olarak deneysel olarak gösterilmesi gerekmektedir.

Rutin ilaç imalatında seriler arasındaki kalite kontrol çalışmalarında, in-vitro tayin yöntemleri kullanılarak seriler arasında farklılıklar olup olmadığı araştırılmaktadır. Bu kalite kontrol testlerinin özenle ve dikkatli yapılması gerekmektedir. Aksi halde iyi hazırlanmayan formülasyonlar ortaya çıkabilir. İn-vitro testler, in-vivo (canlıda) testlere model oluşturmak için yapılmaktadır. İlaç formüllerinde bir değişiklik

yapılmadığı sürece, in-vitro bulgular kalite kontrolü çalışmaları için yeterlidir. Formülasyon değişikliklerinde ise, yeni ilacın etkin ve güvenilir olduğunun ispatlanması gerekmektedir. Bir ticari preparatın içindeki etken maddelerin özelliklerinin tam olarak belirtilmesi, preparatların uniform olmalarını sağlar. Bu ilaçların düzgün yapılması, farklı firmaların aynı ürünleri arasındaki farklılıkları ve bir firmanın ürününde bulunan kutular arasındaki farklılıkları da en aza indirir. İlaç ürünlerindeki küçük değişiklikler istatistikî açıdan önemlidir ve iyileştirici cevapta küçük farklılıklar doğurabilirler. İlacın içindeki bir boya ya da katkı maddesi değiştirilmiş de olabilir. Bunun için de bir in-vitro testi yeterli olacaktır. Bazı ilaçlarda da yeni veriliş yolları geliştirildiğinde, yeni formülasyonun klinik etkinliğinin gösterilmesi gerekmektedir. Aynı zamanda ilaçlarda ruhsatlandırma yapılırken, etkinlik ve güvenirliliğin kanıtlanabilmesi için klinik öncesi ve klinik çalışmaların da tamamlanmış olması istenir. Böylelikle bu klinik çalışmalar ile hastane ve poliklinik gibi topluma sağlık hizmeti veren yerlerde, hizmet kalitesi ve hastaların tedavi şansı artarak, sonuçta yan etkilerin sıklığı da minimuma indirilmiş olur.

Bu sebeplerden dolayı gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada, Etodolak ve Tiyokolşikosid etken maddelerinin, hem çözücü ortamında farmasötik preparattan hem de in-vitro olarak biyolojik materyalden aynı anda miktar analizlerinin yapılabilmesi için, son zamanlarda büyük gelişme kaydeden yüksek etkinlik, yüksek ayırıcılık, hızlı ve kolay uygulanabilir olma gibi özellikleri nedeniyle ilaç analizlerinde sıklıkla kullanılmakta olan DAD dedektörlü Ters Faz-Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (TF-YPSK) ile bir yöntem geliştirilmiştir.

Yapılan literatür araştırmaları sonucunda, iki etken etken maddenin aynı anda miktar analizlerinin yapıldığı metotlara rastlanmıştır. Fakat bizim çalışmamızda, tüm bu çalışmalardan daha büyük resolüsyon değeri elde edilmiştir. Resolüsyon değeri 19,28 olduğu için daha güvenilirdir. Ayrıca kullanılan metanol oranı düşürülerek, daha ekonomik ve çevre dostu bir miktar analiz yöntemi geliştirilmiştir. Bütün bu çalışmalarda ise insan plazması içerisinde Etodolak ve Tiyokolşikosid'in eş zamanlı

belirlenmesi için herhangi bir sıvı kromatografisi analiz yöntemi literatürde henüz mevcut değildir.

Bu yöntem, Türkiye ilaç piyasasında satılan Etotio tablet preparatına uygulanmış ve hiçbir ayırma işlemine gerek kalmaksızın preparatın içerisinde bulunan Etodolak ve Tiyokolşikosid'in aynı anda miktar tayini çözücü ve plazma ortamında başarıyla gerçekleştirilmiştir.

Sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemine gerek kalmaksızın kısa zaman içerisinde oldukça yüksek geri kazanımlar elde edilerek gerçekleştirilen, insan plazmasında Etodolak ve Tiyokolşikosid'in in vitro olarak YPSK-DAD yöntemiyle eş zamanlı miktar tayinine yönelik yapılan bu ilk çalışmanın; yüksek geri kazanımı, tekrarlanabilirliği, basit ve ekonomik olması nedeniyle rutin bir laboratuvar için yararlı olacağı düşünülmektedir.

YPSK'de, ters fazlı kolon (Tosoh Bioscience TSKgel ODS-80TM 4,6x150mm 5 μ) üzerinde, di-potasyum hidrojen fosfat tamponu (pH 3,5) ve metanol kombinasyonundan oluşan bir mobil faz ile ikili etken madde karışımı yürütülerek, 1,0 mL dk⁻¹ akış hızıyla doğrusal gradient elüsyon kullanılmıştır. DAD dedektör ile 259 nm'de elde edilen kromatogramlardaki pik alanlarının, konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmesi ile hazırlanan kalibrasyon eğrileri yardımıyla, karışımdaki Etodolak ve Tiyokolşikosid'in aynı anda miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Çözücü olarak, metanol ve tampon çözelti 70:30 (h/h) karışımı kullanılmıştır. Bu koşullarda Etodolak ve Tiyokolşikosid için alıkonma zamanları sırasıyla 4,1 dk ve 6,4 dk olarak belirlenmiştir. Optimize edilen tüm çalışma koşullarında, doğrusal konsantrasyon aralığı Etodolak için 20-500 μ g mL⁻¹ ve Tiyokolşikosid için 0,4-10 μ g mL⁻¹ olarak tespit edilmiştir. Geliştirilen yönteminin validasyon çalışmalarında, tekrarlanabilirliğini (kesinlik) belirlemek için; aynı gün içerisinde tüm standartlar 6 kez ölçülerek ve 3 farklı günde ise düşük, orta ve yüksek olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda yine 6 kez ölçümler alınarak analizler gerçekleştirilmiştir. Yöntemin doğruluğunu belirlemek amacıyla da yapılan çalışmalar sonucunda, çözücü ortamından geri kazanım ortalama değerleri Etodolak için % 100,15 ve Tiyokolşikosid için % 99,53 olarak bulunmuştur. Plazma çalışmalarında ise sıvı-sıvı

ekstraksiyon işlemine gerek kalmaksızın kısa zaman içerisinde, oldukça yüksek geri kazanımlar elde edilmiştir. Geri kazanım ortalama değerleri de, Etodolak için % 98,28 ve Tiyokolşikosid için % 99,35 olarak bulunmuştur.

Elde edilen sonuçların istatistiksel açıdan değerlendirilmesi için ANOVA testi kullanılmıştır. Geliştirilen YPSK yönteminde, Etodolak için çözücü ortamında hazırlanan ticari preparatlardan elde edilen geri kazanım değerleri ile plazma ortamındakiler, yine Tiyokolşikosid için çözücü ortamında hazırlanan ticari preparatlardan elde edilen geri kazanım değerleri ile plazma ortamındakiler, ANOVA testi ile karşılaştırılmıştır. Her iki etken maddeyi içeren ticari preparatların çözücü ortamında ve plazma ortamında hazırlanması arasında bir fark olmadığı sonucuna varılmıştır.

Uygulanan analitik yöntemlerle ilaçların, yeterli duyarlılık, özgünlük, doğrusallık, geri kazanım, doğruluk ve kesinlik bakımlarından tam olarak valide edilmiş uygun bir yöntem kullanılarak validasyonunun (geçerliliğinin veya güvenilirliğinin ortaya konulması) yapılması gerekliliğinden yola çıkılarak, geliştirilen YPSK yönteminde tüm validasyon parametreleri değerlendirilmiş ve biyoistatistik yönünden de geçerlilikleri kanıtlanmıştır. Her iki etken maddenin bir aradaki rutin analizlerinde güvenle kullanılabilir olması, bu tarz karışımların analizleri için diğer çalışmalara ışık tutması ve bu konuda yeni yöntemlerin geliştirilmesi açısından da önemlidir.

KAYNAKLAR

- [1] <https://tr.wikipedia.org/wiki/İlaç>, Erişim Tarihi: 19.04.2016.
- [2] Cingi, M. İ., Erol, K., Farmakoloji, T.C. Anadolu Üniversitesi Yayınları No:494, Açıköğretim Fakültesi Yayınları, No:223, Eskişehir, Şubat, 1993.
- [3] <http://www.acilveilk Yardım.com/acilbakim/ilacbilgisi.htm>, Erişim Tarihi: 19.04.2016.
- [4] Devlet Planlama Teşkilatı (DPT): 8. Yıllık Kalkınma Planı, İlaç Sanayii Özel İhtisas Komisyonu Raporu, DPT Yayını, Yayın No:DPT 2540-ÖİK 556, Ankara, 2001.
- [5] T.C. MİLLÎ EĞİTİM BAKANLIĞI, Acil Sağlık Hizmetleri, Santral Sinir Sistemi İlaçları, Ankara, 2011.
- [6] <https://en.wikipedia.org/wiki/Thiocolchicoside>, Erişim Tarihi:19.04.2016
- [7] Ünal, D., Tiyokolşikosid, 3-Demetiltiyokolşisin ve Deksketoprofen Ttometamol'un analiz Yöntemlerinin araştırılması. Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Anabilim Dalı, Bitirme Ödevi, 2012.
- [8] https://tr.wikipedia.org/wiki/Non_steroidal_antienflamatuar_ilaçlar, Erişim Tarihi: 19.04.2016.
- [9] <http://ichastaliklariromatoloji.medicine.ankara.edu.tr/files/2014/02/Non-Steroid-Anti-İnflamatuar-İlaçlar-NSAİİ.pdf>, Erişim Tarihi: 19.04.2016.
- [10] Stovitz SD, Johnson RJ. NSAIDs and Musculoskeletal Treatment. What Is the Clinical Evidence? The Physician Sportsmedicine, 31(1), 35-52, 2003.
- [11] Kawai, S., Kojima, F., Kusunoki, N. Recent Advances in Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. Allergology International, 54(2), 209-215, 2005.
- [12] <https://tr.wikipedia.org/wiki/Etodolak>, Erişim Tarihi: 19.04.2016.

- [13] Silva, C.M., Racha, A., Tozatto, E., Silva, L.M., Donadi, E.A., Lanchate, V.L., Enantioselective analysis of etodolac in human plasma by LC-MS/MS: Application to clinical pharmacokinetics. *Journal of Pharmaceultural and Biomedical Analysis*, 120, 120-126, 2016.
- [14] Adıgüzel, C. Etodolak'ın stabilite göstergeli sıvı kromatografisi ile ilaç dozaj şekillerinden tayini. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2009.
- [15] <http://www.mn.com.tr/tr/products/pdf/Etotio.pdf>, Erişim Tarihi: 20.03.2016.
- [16] Kayaalp O. Klinik Farmakolojinin Esasları ve Temel Düzenlemeler, Pelikan Yayını, Ankara, 377-455, 2008.
- [17] Gündüz İ. Biyoeşdeğerlik Çalışmalarında İstatistiksel Yöntemler. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 4-12, 2015.
- [18] Abacıoğlu, N. İlaçta Jenerik isim. IV. Türkiye Eczacılık Kongresi 10-11-İstanbul, 12 Mayıs, 1991.
- [19] Geçgil, Ş. Farmasötik teknolojiye başlangıç, Cihan Matbaacılık, İstanbul, 1991.
- [20] Biyolarlanım ve biyoeşdeğerlik yasal yönü, II Ulusal Biyoyarlanım ve Biyoeşdeğerlik Sempozyumu, Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Şafak Matbaacılık, Fatum, Ankara, 17-18 Nisan, 1995.
- [21] Skoog, D., Holler, F.J., Nieman, T.A. Enstrümental Analiz İlkeleri, Çeviri Editörleri: Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H., BilimYayınclılık, Ankara, 299-347, 674-766, 1998.
- [22] Sewell, P.A., Clarke, B., Kealey, D. Chromatographic Separations, John Wiley& Sons, Great Britain, 1987.
- [23] Hamilton, R.J., Sewell, P.A. Introduction to high performance liquid chromatography, Second Edition, Chapman and Hall, USA, 1982.
- [24] Bidlingmeyer, B.A., Practical HPLC Methodology and Applications, John Wiley& Sons, USA, 1992.
- [25] Skoog, D., West, D., Holler, F.J. Analitik Kimya Temelleri, BilimYayınclılık, 7. Baskı, 2. Cilt, Ankara 299-351, 675-777, 1999.
- [26] Meyer, V.R., Practical high performance liquid chromatography, John Wiley & Sons, USA, 1988.

- [27] Snyder, L.R., Glajch, J.L., Kirkland J.J. Practical HPLC Method Development, John Wiley & Sons, USA, 1988.
- [28] Krstulovic, A.M., Brown, P.R. Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography: Theory, Practice and Biomedical Applications, John Wiley & Sons, USA, 1982.
- [30] Christian, G.D. Analytical Chemistry. 6th Edition. John Wiley & Sons Inc., New Jersey, 2004.
- [31] Skoog, D.A., Leary, J.J. Principles of Instrumental Analysis, 4th Edition, Harcourt Brace College Publishers, New York, 116, 134-139, 1992.
- [32] Gündüz, T. İstrümental Analiz, Gazi Kitapevi, Altıncı Baskı, Ankara, 101-229, 1116-1357, 2002.
- [33] Parasetamol, kafein ve propifenazon içeren tabletlerin HPLC yöntemi ile analizinin faktöriyel tasarım ile optimize edilmesi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programı, 2007.
- [34] Schauwechr, P., Frei, R.W. Chromatography LC Magazine, 14, 1977.
- [35] Huber, L. Validation of Analytical Methods Review And Strategy, Advanstar Communication for Publication in LC/GC International, 2001.
- [36] Snyder, L.R., Kirkland, J.J. Introduction to Modern LC, 91, 334, 1979.
- [37] Hansen, H.A., Emborg, C. Experimental desing in the development and characteriation of a HPLC method for aminoacids. Journal of Chromatography A, 2, 171-180, 626, 1992.
- [38] Shah, V.P., Midha, K., Dighe, S. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivance and pharmacokinetic studies. J. Pharm Sci., 81(3), 309-312, 1992.
- [39] Söğüt Ertaş, Ö., Kayalı, A. Analitik yöntem geçerliliğine bir bakış. Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilimdalı, Doktora Tezi, 2005.
- [40] Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods, Centre for Drug Evaluation and Research (CDER), Food and Drug Administration, November, 1994.

- [41] Demirkaya, F. Karbamazepinin UV-Visible spektrofotometri ve HPLC yöntemleriyle miktar analizi. Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans tezi, Erzurum, 2003.
- [42] Amer, S.M., El-Saharty, Y.S., Metwally, F.H., Younes, K.M. Spectrophotometric study of etodolac complexes with copper (II) and iron (III). *Journal of AOAC International*, 88 (6), 1637-1643, 2005.
- [43] Dongre, V.G., Shah, S.B., Bayes, G.S., Phadke, M., Jadhav, V.K. Simultaneous Determination of Etodolac and Acetaminophen in Tablet Dosage Form by RP-LC. *Chromatographia*, 69(9), 1019-1023, 2009.
- [44] Etman, M.A., Salama, R.O., Shams El-Deen, M.A. A new HPLC method for the determination of etodolac in plasma and its application in bioavailability and pharmacokinetic studies. *Acta Pharmaceutica*, 51(4), 297-303, 2001.
- [45] Desai, C. H., Chorawala, H., Dedania, Z. R., Vijendraswamy, S. M. Development and validation of Normal Phase HPLC method for estimation of Thiocolchicoside in capsule dosage formulation. *Research Article*, 32(1), 274-278, 2015.
- [46] Sandouk, P., Chappey, O., Bouvier d'Yvoire, M., Schermann, J.M. Pharmacokinetics of thiocolchicoside in humans using a specific radioimmunoassay. *Therapeutic Drug Monitoring*, 17(5), 544-548, 1995.
- [47] Rajmane, V.S., Gandhi, S.V., Patil, U.P., Sengar, M.R. High-performance thinlayer chromatographic determination of etoricoxib and thiocolchicoside in combined tablet dosage form. *Journal of AOAC International*, 93(3), 783-786, 2010.
- [48] Dhaneshwar, S. R., Jagtap, V. N. Development and validation of RP-HPLC-PDA method for simultaneous determination of dexketoprofen and thiocolchicoside in pharmaceutical dosage form. *Journal of pharmacy research*, 6, 604-608, 2013.
- [49] Pnadey, R., Patil, P.O., Bari, S. B., Dhumal, D. M. Simultaneous estimation of Etodolac and Thiocolchicoside in bulk and tablet formulation by UV-Spectrophotometry. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 20(1), 9-17, 2014.
- [50] Rathod, K., Patel, J. Simultaneous Estimation of Etodolac and Thiocolchicoside in their combined marketed formulation by RP-HPLC. *International Journal of PharmTech Research*, Vol 4, 1513-1519, 2012.

- [51] Abhijit, Dhiwarw, D., ,Santosh, Gandhi, V., Padmanabh, Deshpande, B., Vandana, Bhavnani, S. A simple and sensitive RP-HPLC method for simutaneous estimation of Etodolac and Thiocolchicoside in combined tablet dosage form. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 4(4), 975-214-216, 2016.
- [52] Sujatha, K., Seshagiri Rao, J.V.L.N. A new RP-HPLC method for the simultaneous estimation of Etodolac and Thiocolchicoside in tablet dosage forms. *World Journal of Pharmaceutical Research*, Vol 3, 3994-4002, 2014.
- [53] Pandey, R., Patil, P. O., Sanjay, B. B. Validated RP- HPLC method for Simultaneous estimation of Thiocolchicoside and Etodolac in bulk drug and in pharmaceutical dosage form. *Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research*, Vol 2, 381-390, 2012.
- [54] Patel, A., Shah, B. RP-HPLC method development and validation using factorial design for simultaneous estimation of thiocolchicoside and etodolac with forced degradation studies. *Journal of Pharmaceutical science and Bioscientific Research*, 4(6), 374-382, 2014.
- [55] Alagar Raja, M., Priyadarshini, C., Banji David Rao, K. N. V., Selvakumar, D. Validated RP-HPLC method for simultaneous estimation of Etodolac and Thiocolchicoside in pharmaceutical tablet dosage form. *Journal of Pharmacy Research*, 5(8), 4577, 2012.

ÖZGEÇMİŞ

Neşe ŞİRİN, 30.06.1985’de İstanbul’da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Pendik’te tamamladı. 2008 yılında Sakarya Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü’nden mezun oldu. 2009 yılında Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisansa başladı. 2011-2014 yılları arasında Mefar İlaç Sanayii A.Ş.’de Kalite Kontrol biriminde Analist olarak çalıştı. 2014’ten itibaren Mustafa Nevzat İlaç Sanayii A.Ş.’de Analitik Geliştirme Biriminde Uzman Analist olarak çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizce’dir.