

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

**RALOKSİFEN'İN BİYOLOJİK MATERYALDEN VE
FARMASÖTİK PREPARATTAN ANALİZİ İÇİN GAZ
KROMATOĞRAFİSİ-KÜTLE SPEKTROMETRİSİ
YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDE
EDİLMESİ**

Kim. Münevver TANDOĞAN

**Analitik Kimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Ankara
2012**

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

**RALOKSİFEN'İN BİYOLOJİK MATERYALDEN VE
FARMASÖTİK PREPARATTAN ANALİZİ İÇİN GAZ
KROMATOĞRAFİSİ-KÜTLE SPEKTROMETRİSİ
YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDE
EDİLMESİ**

Kim. Münevver TANDOĞAN

**Analitik Kimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Nuran Özaltın**

**Ankara
2012**

Anabilim Dalı: Analitik Kimya

Program: Yüksek Lisans

Tez Başlığı: Raloksifen'in Biyolojik Materyalden ve Farmasötik Preparattan Analizi için Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi Yönteminin Geliştirilmesi ve Valide Edilmesi

Öğrenci Adı-Soyadı: Münevver TANDOĞAN

Savunma Sınavı Tarihi: 05.12.2012

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans/doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Sedef Kır
Hacettepe Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi



Tez danışmanı:

Prof. Dr. Nuran Özaltın
Hacettepe Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi



Üye:

Prof. Dr. Sacide Altınöz
Hacettepe Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi



Üye:

Prof. Dr. Nilgün Göğer
Gazi Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi



Üye:

Doç. Dr. Ceren Yardımcı
Hacettepe Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi



ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Ersin FADILLIOĞLU

Müdür

TEŞEKKÜR

Tez danışmanım olarak bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Nuran Özaltın'a,

Beni yüksek lisans yapmam için yüreklendiren ve bu süre içerisinde her türlü yardımı esirgemeyen sevgili hocam Prof. Dr. Nursabah E. Başçı'ya,

Teorik ve pratik derslerde verdikleri değerli bilgiler için Analitik Kimya Anabilim Dalının saygıdeğer hocalarına,

Çalışmalarım sırasında verdiği destek ve yardımları için Dr. Ebru Uçaktürk'e

Çalışmalarım için etken madde sağlayan Eli Lilly Company'e,

Bu süre içerisinde beni her türlü çeken, destek ve yardımlarını esirgemeyen Dr. Cafer Çakal'a,

Birlikte çalışmaktan çok keyif aldığım takım arkadaşlarım Sinan Önel ve Tuba Kaçar'a,

Her türlü destek ve yardımları için Doping Kontrol Merkezi çalışanlarına,

Hayatımda iyi ki var dediğim dostlarıma,

Bu günlere gelmemi sağladıkları için AİLEME;

Sonsuz Teşekkür...

ÖZET

Tandoğan, M., Raloksifen'in Biyolojik Materyalden ve Farmasötik Preparattan Analizi için Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi Yönteminin Geliştirilmesi ve Valide Edilmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2012.

Raloksifen, kadınlarda postmenopozal osteoporozun tedavisinde, erkeklerde doping amacıyla kullanılan selektif östrojen reseptör modölatörleri (SERM) grubundan bir ilaçtır. Raloksifenin insan idrarından ve farmasötik preparattan analizi için yeni bir gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) yöntemi geliştirilmiştir. Raloksifen GC-MS analizinden önce silillenmiştir. Tepkime koşulları farklı türev reaktifleri, tepkime sıcaklıkları ve süresi gibi parametreler incelenerek optimize edilmiştir. Raloksifen, MSTFA/ β -merkaptotanol/ NH_4I türevlendirme reaktifi kullanılarak 80 °C'de 30 dk'da etkin bir şekilde türevlendirilmiştir. Metilttestosteron iç standart (IS) olarak seçilmiştir. Analiz seçilmiş iyon modunda (SIM) yapılmıştır. Raloksifen için m/z 578, IS için m/z 446 iyonları nicel analiz amacıyla seçilmiştir. Kromatografik yöntemi optimize etmek için kromatografik parametreler (başlangıç ve son fırın sıcaklıkları, gaz akış hızı) incelenmiştir. Raloksifen idrardan karbonat tamponu (pH 9.0) ve metil tersiyer-butil eter kullanılarak ekstre edilmiştir. Geliştirilen yöntemin, sistem uygunluk testleri, özgünlük, duyarlılık, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, geri kazanım, kararlılık, sağlamlık ve tutarlılık parametreleri insan idrarından ve farmasötik preparattan raloksifen analizi için ayrı ayrı valide edilmiştir. İdrardan raloksifen tayini için doğrusallık aralığı 10-200 ng mL⁻¹, alt tayin sınırı (LOQ) 10.0 ng mL⁻¹, gözlenebilme sınırı (LOD) 8.0 ng mL⁻¹ olarak bulunmuştur. Raloksifenin farmasötik preparattan analizi için doğrusallık aralığı 10-400 ng, LOQ 10.0 ng ve LOD 5.0 ng bulunmuştur. Validasyon sonuçları, yöntemin duyarlı, kesin, doğru, özgün, sağlam ve tutarlı olduğunu göstermiştir. Geliştirilen ve valide edilen yöntem Raloksifen HCl içeren farmasötik preparatın analizine başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Sonuçlar kaynaklardaki bir yöntemle karşılaştırılarak aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Anahtar Kelimeler: Raloksifen, Biyolojik Materyal, Farmasötik preparat, Validasyon, GC-MS

ABSTRACT

Tandoğan, M., Development and Validation of Gas Chromatography-Mass Spectrometry method for the Analysis of Raloxifene in Biological Material and pharmaceutical preparation. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Master Thesis in Analytical Chemistry, Ankara, 2012. Raloxifene is selective estrogen modulator (SERM) drug which is used in the treatment of postmenopausal osteoporosis in women and used for doping in men. A new gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method was developed for the determination of Raloxifene in human urine and pharmaceutical preparation. Raloxifene was silylated prior to GC-MS analysis. Derivatization reaction was optimized to investigate parameters such as different derivatization reagents, reaction temperatures and times. It was efficiently derivatized using MSTFA/ β -mercaptoethanol/ NH_4I at 80 °C for 30 min. Methyltestosterone was selected as internal Standard (IS). Analysis was performed in selected ion monitoring (SIM) mode. The ions m/z 578 for raloxifene and m/z 446 for IS were selected for quantitation. Chromatographic variables (initial and final oven temperature, flow rate of gas) were investigated to optimize the chromatographic method. Raloxifene was extracted from urine with carbonate buffer (pH 9.0) and methyl ter-butyl ether. The developed method was validated in terms of system suitability tests, specificity, sensitivity, linearity, accuracy, precision, recovery, stability, robustness and ruggedness for analysis of Raloxifene in each urine and pharmaceutical formulation. Linearity was established in the range of 10-200 ng mL⁻¹, limit of quantification (LOQ) was 10.0 ng mL⁻¹ and limit of detection (LOD) was 8.0 ng mL⁻¹ for urine. Linearity was found 10-400 ng, LOQ was 10.0 ng and LOD was 5.0 ng for pharmaceutical analysis. Developed method was sensitive, precise, accurate, specific, sensitive, rugged and robust due to the validation study results. The developed and validated method was successfully applied to analysis of the pharmaceutical preparation containing raloxifene HCl. The results were compared to the method in literature and no significant difference was found between them.

Keywords: Raloxifene, Biological Material, Pharmaceutical Preparation, Validation, GC-MS

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ONAY SAYFASI	İİİ
TEŞEKKÜR.....	İV
ÖZET	V
ABSTRACT.....	VI
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XIII
TABLolar DİZİNİ	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Selektif Östrojen Reseptör Modölatörleri (SERM)	3
2.2. Raloksifen HCl	4
2.3. Raloksifenin Analiz Yöntemleri	6
2.4. Spektroskopik Yöntemler	9
2.5. Kromatografik Yöntemler	10
2.5.1. Kromatografinin Dayandığı Temel Parametreler.....	12
2.5.2. Kromatografinin Sınıflandırılması	18
2.5.2.1. Ayrılma Mekanizmalarına Göre Sınıflandırma	19
2.5.2.2. Uygulama Biçimine Göre Sınıflandırma	21
2.5.3. Gaz Kromatografisi (GC).....	22
2.5.3.1. Gaz-Katı Kromatografisi (GSC).....	23
2.5.3.2. Gaz-Sıvı Kromatografisi (GLC).....	23
2.6. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (GC-MS)	29
2.6.1. GC-MS Ara Bağlantıları	31

2.6.2. İyon Kaynağı.....	32
2.6.3. Kütle Analizörü	33
2.6.4. Dedektör	35
2.6.5. Vakum Sistemleri.....	36
2.6.6. GC- MS Sisteminin Ayarlanması (Autotune)	37
2.7. Türevlendirme Teknikleri.....	40
2.8. Örnek Hazırlama.....	42
2.8.1. Sıvı-Sıvı ekstraksiyonu	42
2.8.2. Katı-Faz Ekstraksiyonu (SPE)	43
2.9. Analitik Yöntem Validasyonu	43
2.9.1. Yöntem Validasyonunun Değerlendirilmesinde Kullanılan Parametreler	44
2.10. Kemometri	49
2.10.1. Plackett-Burman Tasarımı.....	50
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	51
3.1. Kimyasal Maddeler.....	51
3.2. Cihazlar.....	52
3.3. Cam ve Sarf Malzemeleri	53
3.4. Çözeltiler	53
3.4.1. Sentetik Preparatların Hazırlanması.....	54
3.4.2. Farmasötik Preparat Çözeltisinin Hazırlanması	54
3.4.3. UV-Spektrofotometrik Yöntem İçin Çözeltiler.....	55
3.5. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi.....	55
3.5.1. Türevlendirme Basamağının Optimizasyonu.....	55
3.5.2. Kromatografik Koşulların Optimizasyonu	56
3.5.3. Ekstraksiyon Basamağının Optimizasyonu.....	56

3.5.4. İç standart Seçimi	56
3.5.5. Validasyon Çalışmaları için Örneklerin Hazırlanması.....	56
3.5.6. Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması.....	57
3.6. Analitik Yöntem Validasyonu	57
3.6.1. Sistem Uygunluk Testleri.....	57
3.6.2. Özgünlük	58
3.6.3. Doğrusallık	59
3.6.4. Gözlenebilme ve Alt Tayin Sınırı	59
3.6.5. Doğruluk ve Kesinlik	59
3.6.6. Geri Kazanım	60
3.6.7. Kararlılık	60
3.6.8. Sağlamlık ve Tutarlılık.....	61
3.7. UV/GB Spektrofotometrik Yöntemle (Karşılaştırma Yöntemi) Yapılan Çalışmalar	62
3.8. İstatistiksel Hesaplamalar	62
4. BULGULAR	63
4.1. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi.....	63
4.1.1. Türevlendirme Basamağının Optimizasyonu	63
4.1.2. Kromatografik Yöntem Koşullarının Optimizasyonu.....	70
4.1.3. Ekstraksiyon Basamağının Optimizasyonu.....	72
4.1.4. İç Standart Seçimi	73
4.2. Raloksifenin İdrardan Analizi İçin Yöntem Validasyonu	75
4.2.1. Sistem Uygunluk Testleri.....	75
4.2.2. Özgünlük	76
4.2.3. Kalibrasyon Eğrileri ve Doğrusallık Aralıkları.....	79

4.2.4. Gözlenebilme ve Alt Tayin Sınırı	81
4.2.5. Doğruluk.....	81
4.2.6. Kesinlik	81
4.2.7. Geri Kazanım	82
4.2.8. Kararlılık	83
4.2.9. Sağlamlık ve Tutarlılık.....	84
4.3. Raloksifenin Farmasötik Preparattan Analizi İçin Yöntem Validasyonu	86
4.3.1. Özgünlük	86
4.3.2. Kalibrasyon Eğrileri ve Doğrusallık Aralıkları.....	88
4.3.3. Gözlenebilme ve Alt Tayin Sınırı	90
4.3.4. Doğruluk.....	91
4.3.5. Kesinlik	91
4.3.6. Geri kazanım	92
4.4. UV Spektrofotometrik (Karşılaştırma) Yöntem Bulguları.....	92
4.5. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması.....	93
5. TARTIŞMA.....	95
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	102
KAYNAKLAR	104
EKLER.....	111
ÖZGEÇMİŞ	116

SİMGELER ve KISALTMALAR

BH	Bağıl hata
BMD	Kemik mineral dansitometresi
BSS	Bağıl standart sapma
BSTFA	N,O bis(trimetilsilil) trifluoroasetamid
CEE	Konjuge östrojen
CI	Kimyasal iyonlaştırma
EI	Elektron bombardımanı ile iyonizasyon
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GC	Gaz kromatografisi
H	Kolon tabaka yüksekliği
HMDS	Hekzametildisilan
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
ICH	Uluslararası Harmonizasyon Konferansı
IS	İç standart
K	Dağılım katsayısı
k'	Kapasite faktörü
L	Kolon dolgusunun uzunluğu
LOD	Gözlenebilme sınırı
LOQ	Alt tayin sınırı
MS	Kütle spektrometrisi
MSTFA	N-metil-N-trimetilsilil trifluoroasetamid
N	Teorik tabaka sayısı
PLOT	Poröz yüzeyli açık borusal kolonlar
PSO	Pik simetri oranı
Rs	Ayırıcılık
SCOT	Destek kaplı açık borusal kolonlar
SERM	Selektif östrojen reseptör modülatörleri
SFC	Süperkritik akışkan kromatografisi
SIM	Seçilmiş iyon taraması
SPE	Katı-faz Ekstraksiyonu
TIC	Toplam iyon taraması

t_m	Ölü hacim zamanı
TMCS	Trimetilklorosilan
TMS	Trimetilsilil
TMSDEA	Trimetilsilildietilamin
t_R	Alıkonma zamanı
U	Ortalama doğrusal hızı
USP	Amerikan Farmakopesi
V	Ortalama göç hızı
UV/GB	Ultraviyole/Görünür Bölge
W	Pik taban genişliği
WADA	Dünya Anti-Doping Ajansı
WCOT	Duvarı kaplı açık borusal kolonlar
α	Seçicilik faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Raloksifen HCl'ün kimyasal yapısı	4
Şekil 2.2. Tek bileşenli bir numune için tipik bir kromatogram	13
Şekil 2.3. Van Deemter eğrisi	16
Şekil 2.4. Gaz kromatografi sistemi	23
Şekil 2.5. GC'de kullanılan taşıyıcı gazlara ait Van Deemter grafikleri	24
Şekil 2.6. WCOT, SCOT, PLOT, Dolgulu kolonlar	27
Şekil 2.7. Kuadropol GC-MS sisteminin şematik gösterilişi	30
Şekil 2.8. Elektron bombardımanı ile iyonizasyon (EI).....	32
Şekil 2.9. Kuadropol kütle analizörü.....	34
Şekil 2.10. (a) Dizi dinot, (b) Devamlı dinot elektron çoğaltıcı dedektörlerin şematik gösterilişi	36
Şekil 2.11. Analizde kullanılan GC-MS cihazının autotune çıktısı	39
Şekil 4.1. Raloksifenin MTBSTFA ile silillenmesi sonucu elde edilen raloksifen-bis-O-terbutildimetilsilil'e ait kütle spektrumu	65
Şekil 4.2. Raloksifenin MSTFA ile silillenmesi sonucu elde edilen Raloksifen tris-O-TMS'ye ait kütle spektrumu	67
Şekil 4.3. Sililleme reaktifleri ile farklı sıcaklık ve süreler uygulanarak elde edilen Raloksifen-tris OTMS türevine ait alan ortalama-standart sapma grafikleri ...	69
Şekil 4.4. GC-MS kromatografik koşulların karşılaştırma grafiği.....	72
Şekil 4.5. Raloksifenin farklı pH'larda metil tersiyer-butyl eter ile ekstraksiyonunda mutlak geri kazanım değerleri	73
Şekil 4.6. Metiltestosteron'un (IS) silillenmesi sonucu elde edilen metiltestosteron bis-OTMS ait kütle spektrumu	74
Şekil 4.7. Boş idrar (n=8) ve Raloksifen (10 ng mL ⁻¹) ile IS (10 ng mL ⁻¹) eklenmiş idrara ait kromatogramlar ve Farklı derişimlere ait (10, 80, 160 ng mL ⁻¹) raloksifen pikleri.....	77

Şekil 4.8. Boş idrara ait Raloksifen için (a,b,c) ve IS için (d) için seçilmiş iyon (SIM) kromatogramları	78
Şekil 4.9. İdrardan Raloksifen tayini için GC-MS yöntemi ile elde edilen a) Kalibrasyon eğrisi b) Doğrusallık kontrol grafiği	79
Şekil 4.10. Raloksifenin idrardan ekstraksiyonu sonucu a) mutlak ve b) bağıl geri kazanım değerlerine ait grafikler	83
Şekil 4.11. (Raloksifen alan/IS alan) değeri için standartlaştırılmış etkilerin normal grafiği.....	86
Şekil 4.12. Plasebo çözeltisi (raloksifen = 10 ng) ve IS (50 ng) eklenmiş sentetik preparata ait kromatogramlar.....	87
Şekil 4.13. Raloksifenin GC-MS yöntemiyle tayini için kalibrasyon ve standart ekleme eğrileri	88
Şekil 4.14. Farmasötik preparattan raloksifen tayini için GC-MS yöntemi ile elde edilen a) Kalibrasyon eğrisi b) Doğrusallık kontrol grafiği.....	89
Şekil 4.15. Raloksifenin 0.1 M NaOH çözeltisi içindeki spektrumu	92
Şekil 4.16. Farmasötik preparattan raloksifen tayini için UV-GB spektrofotometrik yöntem ile elde edilen kalibrasyon eğrisi	93

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Kütle spektrometresinin ayarlanmasında kullanılan kütlelerin bağlı çoklukları ve izotop kütle oranları.....	38
Tablo 2.2. Türevlendirme reaktifleri.....	41
Tablo 2.3. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu için yaygın olarak kullanılan çözücüler	43
Tablo 2.4. Validasyon için incelenen parametreler.....	44
Tablo 2.5. 11 faktöre ait Plackett-Burman tasarım matrisi	50
Tablo 3.1. Sistem uygunluk test kriterleri.....	58
Tablo 3.2. Sağlamlık ve tutarlılık için seçilen parametreler ve parametrelere ait seviyeler.....	62
Tablo 4.1. Raloksifen-bis-O-terbutildimetilsilil'e ait parçalanma ürünleri	66
Tablo 4.2. Raloksifen tris-O-TMS'ye ait parçalanma ürünleri	68
Tablo 4.3. Gaz kromatografisi için uygulanan sıcaklık programları	70
Tablo 4.4. Denenen koşullarda sistem uygunluk parametreleri.....	71
Tablo 4.5. Çeşitli organik çözücülerin kullanılmasıyla elde edilen % geri kazanım değerleri (20 ng mL ⁻¹ Raloksifen HCl için).....	72
Tablo 4.6. Metiltestosteron bis-OTMS'ye ait parçalanma ürünleri	75
Tablo 4.7. Geliştirilen GC-MS yöntemi için sistem uygunluk parametreleri.....	76
Tablo 4.8. İdrardan raloksifen tayini için GC-MS yöntemi ile çizilen kalibrasyon eğrisinin özellikleri	80
Tablo 4.9. İdrardan raloksifenin tayini için GC-MS yöntemi ile çizilen kalibrasyon eğrisinin doğrusallıktan ayrılış ve korelasyon katsayısının önem kontrolü	80
Tablo 4.10. Raloksifenin GC-MS yöntemi ile idrardan analizinden elde edilen gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik bulguları	82
Tablo 4.11. Raloksifenin idrardan ekstraksiyonu sonucu hesaplanan mutlak ve bağlı geri kazanım değerleri	83

Tablo 4.12. İdrarda raloksifenin kararlılık sonuçları	84
Tablo 4.13. İdrarda raloksifenin donma-erime döngüsü kararlılığı	84
Tablo 4.14. Sağlamlık ve tutarlılık deneyleri için tasarım matriksi ve Raloksifen ile IS için elde edilen alan değerleri	85
Tablo 4.15. Sağlamlık ve tutarlılık için elde edilen (Raloksifen alan/ IS alan) değerlerine ait ANOVA test sonuçları.....	85
Tablo 4.16. Farmasötik preparattan raloksifen tayini için GC-MS yöntemi ile çizilen kalibrasyon eğrisinin özellikleri	90
Tablo 4.17. Farmasötik preparattan raloksifen tayini için GC-MS yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisinin doğrusallıktan ayrılış ve korelasyon katsayısının önem kontrolü.....	90
Tablo 4.18. Raloksifenin GC-MS yöntemi ile farmasötik preparat analizinde elde edilen gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik bulguları.....	91
Tablo 4.19. Raloksifenin farmasötik preparatlardan GC-MS ve UV/GB spektrofotometrik yöntem ile analiz bulguları.....	94

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Selektif östrojen reseptör modölatörleri (SERM) vücutta bulunan hedefleri uyaran veya tepkisiz hale getiren sentetik non-steroid bir grup bileşikten oluşmaktadır (1). SERM östrojen replasman tedavisinin istenmeyen etkilerini ortadan kaldırmak ya da azaltmak amacı ile kullanıma sunulmuştur. Meme ve endometriumda negatif, kemik, kardiyovasküler sistem ve vajende pozitif etki gösteren ideal hormon replasman tedavisi ilacı olarak SERM kullanılabilir (2).

Raloksifen 1997 yılında ABD’de postmenopozal osteoporozun engellenmesi ve tedavisi için onaylanmış bir ilaçtır (2). Bu ilacın çalışıldığı diğer alanlar ise postmenopozal kadında meme kanseri ve kardiyovasküler hastalık riskinin azaltılmasıdır. Raloksifen iskelet sistemi, lipid metabolizması ve bazı pıhtılaşma faktörleri üzerinde agonistik etki gösterirken, meme ve uterusu antagonistik etki göstermektedir (3).

Raloksifen postmenopozal kadınlarda kemik kaybını engellemekte ve vertebral kırık oluşumunu da azaltmaktadır (3, 4). Ancak konjuge östrojenlerle (CEE) karşılaştırıldıklarında bu etki daha az belirgindir (5). Raloksifen günlük (60mg) kullanımının kemik mineral yoğunluğu (BMD) üzerine olan etkileri CEE nin % 50-60 'ı kadardır.

Randomize çalışmalarda, kardiyovasküler riskin biyokimyasal işaretleyicileri üzerinde olumlu etkisi olduğu gösterilmiştir (serum total kolesterol ve LDL seviyeleri azalmaktadır). Ancak HDL kolesterolde değişiklik olmamakla birlikte trigliserid seviyeleri de artmamaktadır (6,7).

Raloksifen kullanımı erkeklerde plazmadaki testosteron seviyesini anlamlı bir şekilde arttırır (8). Bu yüzden Dünya Anti-Doping Ajansının (WADA) belirlediği yasaklı maddeler listesinde yer almaktadır (9).

Kaynaklarda raloksifen analizi ile ilgili olarak genellikle yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) (10-20), kapiler elektroforez (CE) (21) ve spektrofotometri (22-25) yöntemlerine rastlanmaktadır. Raloksifenin gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi yöntemiyle analizine ait kaynak bulunmamaktadır. Bu çalışmada kaynaklardaki boşluğu doldurmak amacıyla raloksifenin insan biyolojik materyalinden (idrara) ve farmasötik preparattan (tablet)

analizi için gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Raloksifenin GC-MS’de analizi için türevlenmesi gerektiğine karar verilmiş ve türevlendirmek amacıyla çeşitli türev reaktifleri, tepkime sıcaklığı ve süresi gibi parametrelerin incelenmesi uygun görülmüştür. Raloksifenin idrardan yüksek oranda geri kazanılması için ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu planlanmıştır. Geliştirilen yöntemin validasyon parametreleri (özgünlük, doğruluk, kesinlik, geri kazanım, duyarlılık, kararlılık, sağlamlık, tutarlılık) idrardan ve farmasötik preparattan raloksifen analizi için ayrı ayrı değerlendirilerek geçerliliklerinin kanıtlanması planlanmıştır. Valide edilen yöntemin raloksifen HCl içeren farmasötik preparatların analizine uygulanması ve sonuçların kaynaklarda bulunan bir yöntemle istatistiksel olarak karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Selektif Östrojen Reseptör Modölatörleri (SERM)

Östrojen reseptörü, hedef dokularında (örn., uterus, vajina ve hipofiz bezi) östrojen etkisini başlatan tetikleyicidir (26).

Östrojen eksikliği ateroskleroz, osteoporoz ve santral sinir sistemi dejenerasyonu gibi birçok patolojik olaya öncülük etmektedir. Östrojen Replasman Tedavisi kadınlarda menapoz sonrasında kognitif fonksiyonları sürdürmek, aterosklerozun oluşumunu engellemek, vertebral kırıkları önlemek amacıyla kullanılmaya başlanmıştır (27). Öte yandan östrojenin özellikle meme bezleri ve uterusda tümör oluşumunu ve gelişimini arttırdığı bilinmektedir (27, 28). Östrojenin bu istenmeyen etkilerini önlemek amacıyla çeşitli terapötik alternatifler aranmaya başlanmış ve 1960'lı yıllarda östrojenin yararlı etkilerini beyin, kemik ve arterlerde gösteren ve aynı zamanda östrojen gibi meme ve endometriumda tümör oluşumuna neden olmayan yeni bir ilaç grubu üretilmiştir. Bu bileşiklere dokuya özgü etkilerinden dolayı selektif östrojen reseptör modölatörleri (SERMs) adı verilmiştir (27). 1970'li yıllarda birinci nesil SERM'lerden biri olan tamoksifen metastatik meme kanserinin tedavisinde östrojen antagonisti olarak kullanılmaya başlanmıştır. Tamoksifenin antagonist olarak kullanımının, östrojenin kemiklerdeki mineral yoğunluğunu arttırıcı etkisini de inhibe edeceği düşünülmüştür. Yapılan çalışmalar sonucunda tamoksifenin, östrojenin etkisini taklit ederek omurilikte kemik mineral yoğunluğunu arttırdığı, fakat bunun yanında östrojen gibi endometrium kanserine neden olduğu gözlenmiştir. Buna bağlı olarak tamoksifenin dokuya özgü östrojen agonisti / antagonisti olarak görev yaptığı saptanmıştır (28). Tamoksifenden sonra yine SERM sınıfına dahil olan, yapısında benzotiyofen halkası bulunan kimyasal adı [6-hidroksi-2-(4-hidroksifenil) benzotiyofen-3-il] [4-[2-(1-piperidinil) etoksi] fenil] metanon olan yeni bir ilaç, raloksifen, kemik üzerindeki östrojen agonisti etkisinden dolayı 1997 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onayıyla osteoporoz tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (29-31). Raloksifen endometriumda kanser oluşumunu tetiklemeyen bir bileşik olarak meme kanserinin önlenmesi amacıyla güvenle kullanılan bir ilaçtır. Raloksifenin ayrıca sıçanlarda serum total kolesterol düzeyini, postmenapozal kadınlarda da serum LDL düzeyini düşürdüğü gösterilmiş,

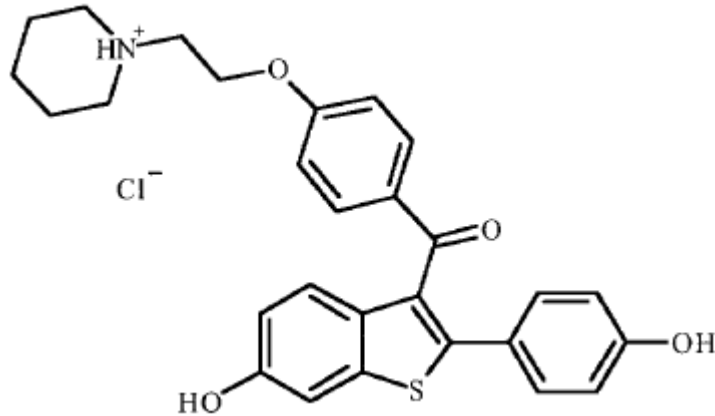
plazma homosistein derişimini azalttığı ancak HDL üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı saptanmıştır (27).

Erkeklerde raloksifen kullanımı ile ilgili yapılan araştırmalar sonucunda kemik yıkım belirteçlerinde azalma, kandaki testosteron ve 17β -estradiol miktarlarında bağıl olarak yüksek artış görülmüştür (32).

2.2. Raloksifen HCl

Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

Raloksifen HCl benzotiyofen sınıfından 2. kuşak bir SERM'dir. Raloksifen [6-hidroksi-2-(4-hidroksifenil) benzo[b]tien-3-il] [4-[2-(1-piperidinil) etoksi] fenil] hidroklorür kimyasal yapısına ve $C_{28}H_{27}NO_4S$ HCl molekül formülüne sahiptir (Şekil 2.1). Kimyasal adı metanon-hidroklorid'dir. Raloksifen (CAS numarası: 84449-90-1) erime derecesi $143-147^\circ C$ olan açık sarı renkli, katı bir maddedir. Suda çok az çözünür.



Şekil 2.1. Raloksifen HCl'ün kimyasal yapısı

Farmakodinamik Özellikleri

Hücre çekirdeğinde yerleşik olan östrojen reseptörlerine bağlanarak bazı dokularda östrojen agonistik etki gösterirken, diğerlerinde östrojen aktivitesini inhibe eder (antagonistik etki). Raloksifen lipid metabolizması ve iskelet sistemi üzerine

östrojen benzeri, meme ve endometrium üzerine ise antiöstrojenik etki göstermektedir (33).

Günümüzde α ve β olarak adlandırılan iki ayrı östrojen reseptörü olduğu bilinmektedir. Östrojenin ve SERM'lerin farklı dokularda farklı reseptörleri uyarak etki gösterdikleri düşünülmektedir. Raloksifen bileşiğindeki antiöstrojenik etkiden sorumlu esas bölge alkilamino-etoksik yan zinciridir. Bu zincirde yer alan nitrojen, spesifik olarak östrojen reseptöründeki aspartat ile etkileşime girmekte ve antiöstrojenik etkinin sergilenmesini başlatmaktadır (34, 35).

Tamoksifenin endometrial neoplazi riskinde yapmış olduğu artış ile raloksifen gündeme gelmiştir. 1994'de raloksifenin yumurtalıkları alınmış dişi sıçanlarda tamoksifenin sebep olduğu endometrial proliferasyonu engellediği gösterilmiştir (36). 1994 ile 1997 yılları arasında raloksifenin kemik kaybını engellediği, serum kolesterol düzeylerini düşürdüğü ve meme dokusunda güçlü bir anti-proliferatif özelliği olduğu ve endometrial proliferasyonu engellediğini tespit eden birçok çalışma yapılmıştır (37, 38)

Farmakinetik Özellikleri

Raloksifen ülkemizde 60 mg tablet halinde piyasadadır, gıda alımından bağımsız olarak günün herhangi bir saatinde alınabilir. Raloksifen oral uygulamadan sonra hızla emilir. Oral dozun yaklaşık % 60'ı emilmektedir. Yaygın presistemik glukuronid konjugasyon söz konusudur. Raloksifenin mutlak biyoyararlanımı % 2.0'dir. Ortalama maksimum plazma derişimine ve biyoyararlanıma ulaşma süresi raloksifenin ve glukuronid metabolitlerinin sistemik ara dönüşümüne ve kendisi ile birlikte glukuronid metabolitlerinin enterohepatik sikluslarına bağlıdır (20, 39).

Raloksifen vücutta geniş dağılım hacmine sahiptir ve dağılım hacmi doza bağımlı değildir. Raloksifen (% 98-99 oranında) plazma proteinlerine güçlü bir şekilde bağlanır (5).

Raloksifen, glukuronid konjugatlarına yaygın ilk geçiş metabolizmasına uğrar: raloksifen-4'glukuronid, raloksifen-6-glukuronid ve raloksifen-6,4'diglukuronid. Başka bir metabolit tespit edilmemiştir. Raloksifen, raloksifen ve glukuronid metabolitlerinin kombine derişimlerinin %1'inden azını kapsamaktadır.

Raloksifen seviyeleri, enterohepatik geri dönüşüm ile 27.7 saatlik plazma yarılanma ömrü vererek sağlanmaktadır (5, 40).

Raloksifen dozunun ve glukoronid metabolitlerinin büyük bölümü 5 gün içerisinde esas olarak feçes ile atılır. İdrarla atılan kısım %6'sı kadardır. % 0.2 kadar kısmı idrardan değişmeden atılır (5).

Yan Etkileri

Klinik deneyimlerde dikkati çeken iki önemli yan etki ateş basması ve bacak adalelerinde kramplardır. Ateş basması sıklıkla tedavinin ilk 6 ayında gözlenmektedir. FDA onayı 60 mg/gün dozu için geçerlidir. 60 mg/gün dozda raloksifen kullananlar ve plasebo alanlar arasında, ateş basması nedeni ile tedaviye son verilme oranları açısından fark bulunmamıştır (41). Delmas ve arkadaşlarının çalışmasında da; raloksifen grubunda ateş basması, memelerde hassasiyet ve vajinal kanama şikayetlerinde plasebo grubuna göre anlamlı farklılık bildirilmemektedir (42). Raloksifenin önemli yan etkisi venöz tromboemboli (Derin Ven Tronbozu, Pulmoner Emboli veya Renal Ven Trombozu) riskinin artışıdır. Vasküler tromboemboli insidansı raloksifen grubunda 3.7/1000, plasebo grubunda ise 1,4/1000 olarak saptanmıştır (43). Tromboemboli riskinin tedavi başlangıcındaki ilk 4 aylık süre içerisinde daha yüksek olduğu dikkati çekmiştir.

2.3. Raloksifenin Analiz Yöntemleri

Reddy ve diğ., (10) Raloksifenin farmasötik dozaj formundan ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile tayini için yöntem geliştirmişlerdir. Bu çalışmada UV dedektörü kullanılmıştır. Bu yöntemde C18 kolon kullanılıp, hareketli faz olarak 1 mL dk⁻¹ akış hızında asetonitril ve fosfat tampon karışımı (30:70) tercih edilmiştir. İlaç için alıkonma zamanı 10.609 dk bulunmuştur. Raloksifen için 0.5-200 µg mL⁻¹ derişim aralığında lineer cevap elde edilmiştir.

Trontelj ve diğ.'nin, (11) yaptığı çalışmada ise, farmasötik preparattan raloksifen hidroklorürün, UV ve kulometrik detektörler kullanarak HPLC yöntemiyle tayini için yöntem geliştirilip valide edilmiş, ilacın kalite kontrol

çalışmaları yapılmıştır. LOQ, kulometrik ve UV dedektörler için sırasıyla 0.336 ve 0.610 mg L⁻¹ olarak saptanmıştır.

Wang ve diğ., (12) HPLC-UV ile raloksifen hidroklorür bileşiminin tayini için yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemle raloksifen hidroklorürün nitel olarak analizi yapılmıştır. Hareketli faz olarak asetonyitril: 0.01M sodyumdodeksilsülfat (55:45, pH:4.0) bileşimi kullanılmıştır.

Nandini ve diğ., (13) raloksifen hidroklorür için HPLC-UV ile tayin ve validasyon çalışmalarında hareketli faz olarak 1 mL dk⁻¹ akış hızında asetonyitril:su (40:60) bileşimi kullanmışlardır. Raloksifen hidroklorür için 250-750 µg ml⁻¹ derişim aralığında doğrusal bir cevap elde edilmiştir.

Pavithra ve diğ., (14) tabletten raloksifen hidroklorür analizi için ters faz HPLC metodu geliştirmişlerdir. Bu yöntemde hareketli faz olarak su:metanol (50:50), akış hızı 1 mL dk⁻¹ olarak belirlemişlerdir. Raloksifen HCl için doğrusal cevap aralığı ise 10-60 mg mL⁻¹'dir.

Basavaiah ve diğ., (15) farmasötik preparattan raloksifen HCl analizi için gradiyent HPLC-UV ile analizi için yöntem geliştirmişlerdir. Doğrusallık aralığı 50–600 µg mL⁻¹ olarak saptanmıştır. LOD değeri 0.04 µg mL⁻¹ olarak verilmiştir.

Yang ve diğ., (16) fare plazmasında raloksifen tayini için geliştirdikleri HPLC-UV yönteminde örnekleri basit protein çöktürmesiyle hazırlamışlardır. Bu ayırma için C18 kolonu ve hareketli faz olarak asetonyitril:amonyum asetat karışımı kullanılmıştır. Doğrusallık aralığı 0.2-75.0 µg mL⁻¹ olarak verilmiştir.

Trontelj ve diğ., (17) insan plazmasından raloksifen ve metabolitleri için sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrisinde (LC-MS-MS) yöntem geliştirme ve validasyonu çalışmasında, insan plazmasından raloksifenin tayini ve validasyonu ile beraber iki metabolitinin raloksifen-6-glukoronid (M1) ve raloksifen -4'-glukoronid (M2) tayini de yapılmıştır. Bu çalışmada 0.5 mL plazmadan katı faz ekstraksiyonu ile ayırma sağlanmıştır. Doğrusallık aralığı M1 için 0.2-340 µg L⁻¹, M2 için 1.60-2.72 µg L⁻¹ ve raloksifen için 0.088-60.00 µg L⁻¹ bulunmuştur. LOD ise M1, M2 ve raloksifen için sırasıyla 8.0, 11.0 ve 6.0 ng L⁻¹ verilmiştir.

Zweigenbaum ve diğ., (18) insan plazmasından selektif östrojen modülatörleri analizi için LC-MS yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirilen metodla aynı anda tamoxifen, raloxifene, 4-hydroxytamoxifen, nafoxidine, and idoxifene analizi

gerçekleştirilmiştir. Raloksifen için kalibrasyon aralığını 7-5100 ng/mL olarak ve LOQ değerini 6ng/mL olarak saptamışlardır.

Kumar ve diğ., (19) ise insan idrarından raloksifen hidroklorürün LC-MS-MS ile tayinini yapmışlardır. Sağlıklı insan idrarına raloksifen hidroklorür eklenip katı faz ekstraksiyonu sonrasında C18 kolon kullanılarak triple kuadrapol tandem kütle spektrometresi ile tayini yapılmıştır. Hareketli faz olarak amonyum asetat (pH 4.0)-asetonitril (60:40, h/h) karışımı kullanılmıştır. Doğrusallık aralığı 20-1000 ng mL⁻¹ olarak saptanmıştır. LOQ değeri 20 ng mL⁻¹ olarak verilmiştir. Doğruluk üç derişim (50, 500 ve 850 ng mL⁻¹) için hesaplanmış ve yüzde bağıl hata $\pm$ % 0.84 bulunmuştur.

Tina Trdan ve diğ., (20) gerçek insan idrarından raloksifen ve raloksifen-6- β -glukoronid (M1), raloksifen-4'- β -glukoronid (M2), raloksifen-6,4'-diglukoronid (M3) tayinini LC-MS/MS yöntemiyle yapmışlardır. Raloksifenden, raloksifen glukoronidi elde etmek amacıyla *Streptomyces* mikroorganizmalarla biyolojik dönüşümlerden faydalanmışlardır. LC-MS/MS ön işlemleri için katı faz ekstraksiyonu yapmışlardır. Raloksifen için LOQ değeri 1.01, M1 için 1.95, M2 için 2.83 ve M3 için 4.69 nM olarak belirlenmiştir. Yöntemin doğruluğu bağıl hata % 8.8 bulurlarken, kesinliği tüm maddeler için bağıl standart sapma % 12 olarak saptamışlardır.

Perez-Ruiz ve diğ., (21) raloksifenin kapiler elektroforez kullanılarak miktar tayini ve validasyonu çalışmasında farklı parametrelerin (tampon derişimi, pH ve uygulanan voltaj) göç zamanı, pik simetrisi ve etkinlik üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada, raloksifen için doğrusallık aralığı 0.12 - 36 μ g mL⁻¹ olarak bulunmuştur.

Annapurna ve diğ., (22) farmasötik formulasyondan raloksifen HCl' ün spektrofotometrik tayini çalışmasında, raloksifen HCl bulk ve tablet formundan üç yeni spektroskopik yöntem geliştirilmişlerdir. A yöntemi boş çözeltiye karşı cevabı ölçülen maksimum absorbansta 0.1 N NaOH'de sarı renkli kromojen oluşumuna dayanır. B yöntemi, raloksifen ile demir klorür ve 1,10-fenotrolin ile kırmızı renkli kromojen oluşumuna dayanır. C yöntemi ise demir klorür ve 2,2-bipiridil ile kırmızı renkli kromojen oluşumuna dayanır. Kromojenlerin maksimum absorbans verdiği

dalga boyundaki cevapları ölçülmüştür. LOQ değerleri A, B, C yöntemleri için sırasıyla $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ olarak verilmiştir.

Basavaiah ve diğ., (23) spektrofotometrik yöntemle farmasötik preparattan raloksifen hidroklorür saptanması ve validasyonu çalışmasında iki yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde raloksifen dolaylı analizi, oksidimetrik reaktif olan bromat-bromit karışımının kullanılması ile gerçekleştirilmiştir. Fazla bromür metilen mavisi [Yöntem A] ve rodamin B [Yöntem B] boyaları kullanılarak analiz edilmiştir. Optimum koşullarda yöntem A'nın $0.5\text{-}5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ve yöntem B nin $0.1\text{-}2.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ aralığında doğrusal olduğu bulunmuştur. LOQ sırayla 0.18 ve $0.13 \mu\text{g mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Basavaiah ve diğ., (24) farmasötik preperattan raloksifen analizi için iki yeni spektrofotometrik yöntem geliştirip validasyonunu yapmışlardır. İlk metot asidik ortamda raloksifenin permanganat ile reaksiyonu sonucunda kahverengi kromojen gruplarının 430 nm dalga boyunda verdiği absorbans ölçümüne dayanır. İkincisi ise raloksifenin H_2SO_4 ortamında permanganatla 550 nm dalga boyunda verdiği absorbans ölçümüne dayanır. Doğrusallık aralığı ilk yöntem için $0.6\text{-}6.0 \text{ mg mL}^{-1}$, ikinci yöntem için $1.5\text{-}15 \text{ mg mL}^{-1}$ 'dir. LOQ ise ilk yöntem için 0.25 mg mL^{-1} , ikinci yöntem için 1.67 mg mL^{-1} olarak bulunmuştur.

Dharuman ve diğ., (25) Raloksifen HCl'ün farmasötik preparattan ve bulk örneklerden spektrofotometrik yöntemle analizi için iki yöntem geliştirmişlerdir. Metod A ilacın FeCl_3 -demirsiyanad ile oksidasyonuna dayanır. Metod B ise fehling çözeltisi ile indirgenmesine dayanır. Geliştirilen yöntem hem metot A hem de B için tablete uygulanmıştır.

2.4. Spektroskopik Yöntemler

Spektroskopi, çeşitli tipte ışınların madde ile etkileşimini inceleyen bilim dalıdır. Spektrokimyasal yöntemler, organik ve inorganik bileşiklerin nicel ve nitel analizlerinde yaygın kullanımlarının yanı sıra, molekül yapılarının aydınlatılmasında da en sık başvurulanan araçlardır.

Spektroskopi, bir örnekteki atom, molekül veya iyonların, bir enerji düzeyinden diğerine geçişleri sırasında absorplanan ya da yayılan ışının ölçülmesi ve

yorumlanmasıdır. Her atom, molekül veya iyonun ışın ile kendine özgü ilişkisi vardır ve bunların dönme, titreşim ve elektronik enerjilerindeki değişiklikler spektroskopinin temelini oluşturur.

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

Moleküler absorpsiyon spektroskopi b cm ışın yoluna sahip geçirgen bir kapta bulunan bir çözeltinin geçirgenliğinin (T) veya absorbansının (A) ölçümüne dayanır. Absorbans, absorpsiyon yapan analitin derişimi ile eşitlikte belirtildiği gibi doğrusal olarak değişir.

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon b C \quad 2.1$$

Verilen eşitlik Beer yasasının matematiksel gösterimidir. Eşitlikte, ışın gücü (P, P_0), molar absorptivite (ϵ), absorpsiyon yapan numunenin derişimi ($C, \text{mol L}^{-1}$) ile gösterilmiştir.

Bu bağıntıya göre A değeri C 'ye karşı grafiğe geçirilirse, eğimi $\epsilon.b$ olan bir doğru elde edilir. Böylece ışığın absorbe edilen kısmı okunur ve 2.1 eşitliği kullanılarak analitin bilinmeyen derişimi bulunur (44).

2.5. Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, karışımların ayrılmasında kullanılan en önemli tekniklerden biri olup, nitel ve nicel analize olanak sağlamaktadır. Çok geniş ve verimli bir alan olan kromatografinin temeli, Rus bilim adamı botanikçi Michael Tswett tarafından atılmıştır. Tswett yeşil yapraklardan elde ettiği çözeltiyi toz haldeki kalsiyum karbonat doldurulmuş cam bir kolondan geçirerek, çözeltide bulunan klorofil, ksantofil gibi renkli maddeleri kolonda ayırmayı başarmıştır. Sonuçta elde ettiği renkli tabakalardan esinlenerek yaptığı ayırmaya kromatografi adını vermiştir (44).

Genel olarak, ayırma işlemiyle bir madde, bulunduğu ortamdan nicel olarak başka bir ortama alınır. Maddenin nicel olarak alınmasının yanı sıra maddenin saf

olarak da alınması önemlidir. Bu koşulları sağlayan ayırmalara seçici ve spesifik ayırma denir. Kromatografik yöntemler seçici ve spesifik ayırmayı sağlar (45).

Kromatografi işlemi, bir karışımdaki maddelerin biri sabit diğeri hareketli faz arasında dağılması esasına dayanır. Devamlı olarak temasta olan bu iki faz birbirleri ile karışmaz. Sabit faz, ya poröz bir katı madde ya da katı bir destek maddesine emdirilmiş bir sıvı, hareketli faz ise sıvı, gaz veya süperkritik bir akışkan olabilir.

Kromatografi sisteminde maddelerin hareketini sağlayan, bunları sürükleyen hareketli fazdır. Hareketli faz bir kolon içinde, ya normal yerçekimi kuvvetiyle veya basınçla kolondaki sabit faz içinden geçirilir. Bu esnada hareketli fazda çözünmüş halde bulunan maddelerle, sabit faz arasında fiziksel ve kimyasal çekim kuvvetleri devreye girer. Bu çekim kuvvetleri her madde için ayrıdır. Sabit faz tarafından daha fazla adsorbe edilen veya daha fazla çözülen maddeler sistem içerisinde daha yavaş ilerlerken, sabit fazda daha az çözünen maddeler daha hızlı hareket ederler.

Kromatografi işlemi sırasında, madde moleküllerinin, fazlardan biri ile kovalent bağlanma durumu söz konusu değildir. Karışımdaki bileşenler, fazlardan birinde daha uzun süre kalacak şekilde iki faz arasında birçok kez geçiş yaparlar (44, 45).

Kromatografide hareketli sıvı faz olarak, su dahil bütün organik çözücüler ve bu çözücülerin çeşitli oranlardaki karışımları kullanılabilir. Aynı zamanda gaz ve süperkritik çözücüler de hareketli faz olarak kullanılabilir.

Çeşitli kromatografik tekniklerde en çok kullanılan sabit fazlar; silika, alümina, kömür, florisil (magnezyum-silika karışımı), kalsiyum karbonat ve kalsiyum oksit, magnezyum karbonat ve magnezyum oksit, kizelgurlar, diatome toprakları, poliamitler, nişasta, toz şeker ve talkdır (44).

Kromatografi işleminden çeşitli amaçlar için yararlanılmaktadır. Kimya, biyokimya ve biyoloji alanındaki çalışmalarda, organik ve anorganik karışımların ayrılması, maddelerin nitel analizi ile saf olup olmadığının kontrolü veya saflaştırılması, ilaç endüstrisinde hammadde ve imalat safhaları ürünleri ile ilaçların stabilite kontrolü işlemlerinde kromatografi yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (44, 45).

2.5.1. Kromatografinin Dayandığı Temel Parametreler

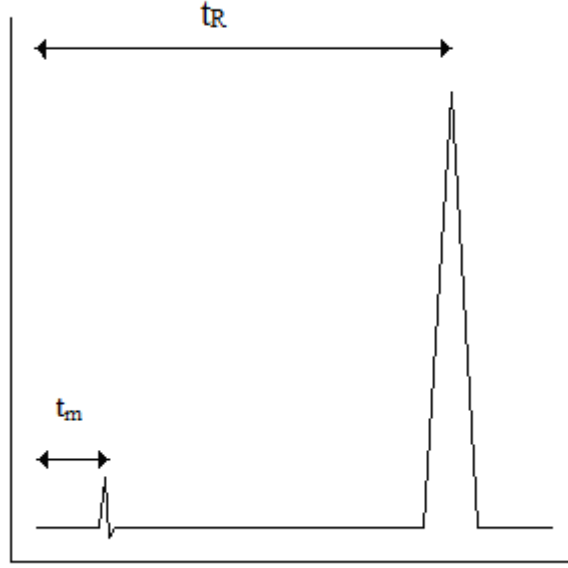
Alıkonma (Retensiyon) Zamanı

Şekil 2.2’de tek bir analit içeren numune için tipik bir kromatogram verilmiştir. Numune enjeksiyonundan sonra gelen ilk pik için, pik süresi ölü zaman olarak adlandırılır ve t_m 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. Şekilde 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. Analitin kolon içerisinde hareketi esnasında ortalama göç hızı V ;

$$V = L / t_R \quad (2.2)$$

olarak verilir; L kolon dolgusunun uzunluğudur. Benzer şekilde hareketli faz moleküllerinin ortalama doğrusal hızı μ , şöyle verilir;

$$\mu = L / t_m \quad (2.3)$$



Şekil 2.2. Tek bileşenli bir numune için tipik bir kromatogram

Analitin Göç Hızı, Kapasite Faktörü

Kapasite faktörü, k' , çözünen maddelerin kolonda göç hızlarını tanımlamakta yaygın olarak kullanılan önemli bir parametredir.

$$k' = (t_R - t_m) / t_m \quad (2.4)$$

t_R ve t_m değerleri kromatogramlardan kolayca bulunur. Bir çözünen 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 fazla uzun olur. İdeal bir ayırma da kapasite faktörü değerinin 1 ile 5 arasında olması gerekmektedir. Kapasite faktörü hareketli faz ve sabit faz bileşimlerinin değiştirilmesiyle ayarlanabilir. Her maddenin kendine özgü bir kapasite faktör değeri vardır.

Seçicilik Faktörü

Bir karışımındaki analitlerin kapasite faktörlerinin oranı seçicilik veya ayırım faktörü olarak adlandırılır. Bir kolondaki analitlerin seçicilik katsayısı; bir kolonun

söz konusu maddeleri ne kadar iyi ayıracağıının bir ölçüsüdür. Bir karışımda bulunan A ve B maddeleri bir kolonda ayrılmaya çalışılsın. Bu sistem için seçicilik faktörü α , şu şekilde tanımlanır;

$$\alpha = K_B / K_A \quad (2.5)$$

K_A = Daha az kuvvetle tutunan veya daha hızlı olarak kolondan elue edilen A maddesi için dağılma katsayısı, K_B = Daha kuvvetli tutunan B maddesi için dağılma katsayısıdır. Bu eşitlik ile α daima 1'den büyüktür. Deneyisel olarak bir kromatogramdan α 'yı belirlemek için aşağıdaki eşitlik kullanılmaktadır.

$$\alpha = [(t_R)_B - t_m] / [(t_R)_A - t_m] \quad (2.6)$$

$(t_R)_B$ = Kolonda daha kuvvetli tutunan bileşiğin alıkonma zamanı

$(t_R)_A$ = Kolonda daha az kuvvetli tutunan bileşiğin alıkonma zamanı

Kolon Etkinliği (Verimliliği)

Başarılı bir kromatografinin amacı verimli bir ayırma ve dar bir kromatografik bant elde etmektir. Kromatografik kolon etkinliğinin nicel ölçümünde birbiriyle bağıntılı iki terim sıkça kullanılır:

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

Bu iki terim arasındaki bağıntı aşağıdaki eşitlikle verilir;

$$N = L / H \quad (2.7)$$

Bir kolonda tabaka yüksekliğinin azalması ve teorik tabaka sayısının artmasıyla kolon etkinliği artar. Hareketli ve sabit fazların bileşimi, kolon dolgu maddesinin tanecik büyüklüğü ve kolon çapına bağlı olarak kolonun tipi kolon verimliliğini etkilemektedir. Kolon dolgu maddesinin tanecik çapı küçüldükçe kolon

tabaka sayısı artmakta bu da kolon verimliliğini artırmaktadır. Martin ve Synge kromatografik bir kolonun birçok ayrı fakat bitişik dar tabakalardan meydana geldiğini düşünerek teorik bir çalışmayla tabaka yüksekliği ve teorik tabaka sayısı terimlerinin ortaya çıkışına öncülük etmişlerdir. Her tabakada maddenin hareketli ve sabit faz arasında kurduğu dengenin, yeniden meydana geldiği kabul edilmiştir. Analitin kolon içerisinde hareketi, dengedeki hareketli fazın bir tabakadan diğerine geçişi olarak kabul edilmiştir. Teorik tabaka sayısı şu şekilde hesaplanır;

$$N = 16 (t_R / W)^2 \quad \text{veya} \quad N = 5.54 (t_R / W_{1/2})^2 \quad (2.8)$$

W : Pik taban genişliği

$W_{1/2}$: Pik taban genişliğinin yarısı

Teorik tabaka sayısı N ve tabaka yüksekliği H, kaynaklarda ve kromatografik cihaz üreticileri tarafından, kolon performansının bir ölçümü olarak kullanılır.

Kromatografik kolon davranışlarına matematiksel yaklaşım 1956 yılında Hollandalı araştırmacı Van Deemter tarafından geliştirilmiştir. Bu eşitlik etkinliği ortalama hareketli faz doğrusal hızının (μ) bir fonksiyonu olarak açıklar (Şekil 2.3).

Klasik Van Deemter eşitliği “Eşitlik 2.9”da tanımlandığı gibidir.

$$H = A + B / \mu + C\mu \quad (2.9)$$

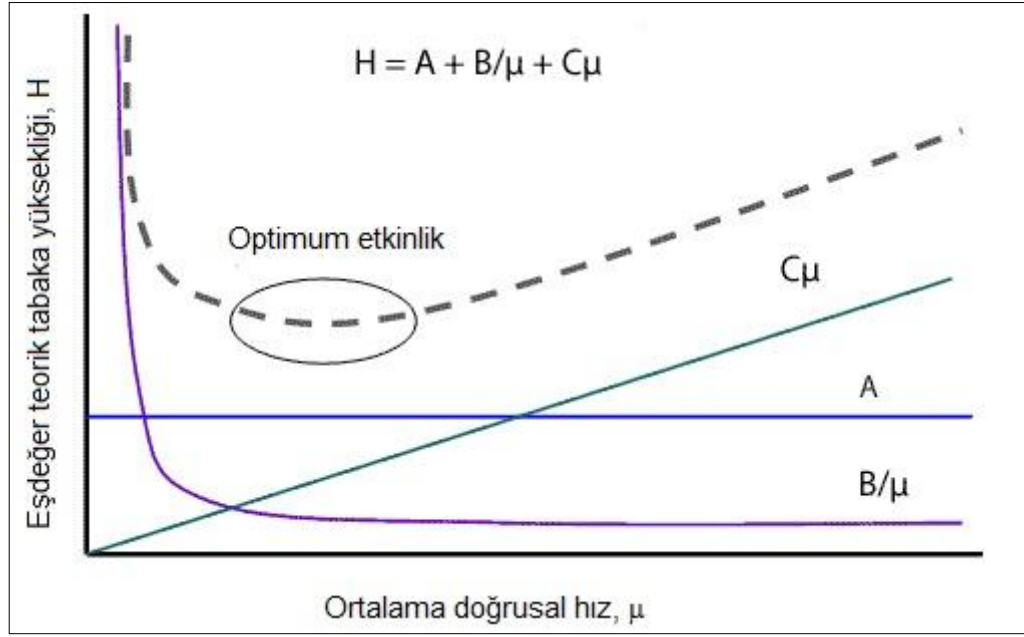
H: Eşdeğer teorik tabaka yüksekliği

A: Eddy difüzyon katsayısı

B: Boyuna difüzyon katsayısı

C: Kütle transfer katsayısı

μ : Taşıyıcı gazın doğrusal akış hızı



Şekil 2.3. Van Deemter eğrisi

A (Eddy difüzyon katsayısı); molekül veya iyonlar dolgu kolonda ilerlerken farklı uzunluktaki yolları izlerler. Bu nedenle, aynı molekülün farklı kolonda kalış süresi farklı olur. Kolon dolgusunun homojen olması, bu etkiyi azaltır. Dolgu kolonlarda bu terim geçerlidir, kılcal kolonlarda etkin değildir.

B (Boyuna difüzyon katsayısı); moleküller derişik bölgelerden, seyreltik bölgelere göç etme eğilimindedirler. Bu göç; hem akış yönünde, hem de zıt yönde olabilir. Pik genişliğine etki eden, hareketli fazdaki difüzyondur. Hareketli faz gaz ise bu etki daha fazladır. Taşıyıcı gaz akış hızı arttırılarak, bu etki en aza indirilebilir.

C (Kütle transfer katsayısı); maddenin sabit ve hareketli faza transfer hızı, kromatografi kolonunun etkinliği üzerinde rol oynar. Kütle transferi terimi, sabit fazda hareketli faz akış hızının artması ile artar (44-46).

Ayırıcılık

Kromatografide asıl amaç, karışım içindeki maddelerin birbirinden ayrılmasıdır. Ayırıcılık (R_s), bu hedefe ne derece yaklaşıldığının bir ölçüsüdür. Temel olarak, kolonun iki analiti birbirinden ayırabilme yeteneğinin nicel ölçüsüdür ve eşitlik 2.10 ile ifade edilir.

$$R_S = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{(W_A + W_B)} \quad (2.10)$$

$(t_R)_B, (t_R)_A$: B ve A'nın alıkonma zamanları
 W_A, W_B : A ve B için zemin pik genişlikleri

$R_S = 1.5$ olması halinde iki pik birbirinden tamamen ayrılmış sayılır. Nicel analizler için pikler arasındaki ayırıcılığın 1.5'den büyük ($R_S \geq 1.5$) olması önerilmektedir. Eşitlik 2.11'a göre ayırıcılığı etkileyen üç faktör; seçicilik (α), tabaka sayısı (N) ve kapasite faktörü (k')'dür.

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \left[\frac{(\alpha-1)}{\alpha} \right] \left[\frac{k'}{(1+k')} \right] \quad (2.11)$$

Eşitlik 2.11'e göre, seçicilik arttıkça ayırıcılığın da artması beklenmektedir. Seçiciliğin 1 olduğu durumda iki madde arasında ayırım gerçekleşmez. Bu nedenle kromatografik bir ayırımın olabilmesi için seçiciliğin 1'den büyük olması gerekmektedir.

Kapasite faktörünün (k') = 0 olduğu durumda ayırım yoktur, ayrıca k' değeri arttıkça $k'/(k'+1) \rightarrow 1$ 'e yaklaşır ve kapasite faktöründeki artışın ayırıcılığa etkisi kalmaz. k' değerini daha fazla arttırmak yalnızca alıkonma zamanını arttırır. Optimum k' değerleri 1-10 arasında olmalıdır.

Kolon Etkinliğinin Optimizasyonu

Kromatografik çalışmalarda deney koşulları, bir karışımın bileşenlerini en kısa sürede net bir şekilde ayıracak biçimde optimize edilerek belirlenir. Optimizasyon deneyleri: 1. Bant genişlemesini azaltmak, 2. Bileşiğin bağıl göç hızını değiştirmek amacıyla yapılır.

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

İstenilen 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 akış hızındaki oynamalar ya da değişik bir kolon dolgusu kullanılarak değiştirilebilir. Herhangi bir çalışmada, teorik tabaka sayısı, kolon boyu, tabaka yüksekliği, hareketli fazın akış hızı, dolgu maddesi tane büyüklüğü, hareketli fazın viskozitesi ve sabit fazı oluşturan absorbe edilmiş sıvı filmin kalınlığı gibi parametreler değiştirilerek iyi bir ayırım gerçekleştirilebilir.

2.5.2. Kromatografinin Sınıflandırılması

1-Ayrılma mekanizmalarına göre

- Adsorpsiyon kromatografisi
- Dağılma (partisyon) kromatografisi
- İyon değiştirme kromatografisi
- Jel Filtrasyon (moleküler eleme) kromatografisi
- İyon çifti kromatografisi
- Afinite kromatografisi

2- Uygulama biçimine göre

- Düzlemsel kromatografi
 - Kağıt kromatografisi
 - İnce tabaka kromatografisi (TLC)
- Kolon kromatografisi
 - Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
 - Süper kritik akışkan kromatografisi
 - Gaz kromatografisi

3-Faz tiplerine göre

- Sıvı kromatografisi
 - Sıvı - katı kromatografisi
 - Sıvı - sıvı kromatografisi
- Gaz kromatografisi
 - Gaz - katı kromatografisi

- Gaz - sıvı kromatografisi

2.5.2.1. Ayrılma Mekanizmalarına Göre Sınıflandırma

Adsorpsiyon Kromatografisi:

Hareketli faz, poröz bir katı veya çok ince bir toz olan sabit fazın üzerinden geçer. Ayrılacak maddelerin yürüme hızı, sabit faza karşı ilgilerine yani adsorbe edilme derecelerine bağlıdır. Madde sabit faz tarafından ne kadar kuvvetli adsorbe ediliyorsa o kadar yavaş ilerler. Adsorpsiyon kromatografisi, kolay olması yanında etkili bir ayırma yöntemidir. Bu yöntemle izomerler, hidrokarbonlar, rasemler, hormonlar ve antibiyotikler kolaylıkla ayrılabilir.

Adsorpsiyon kromatografisi yönteminin dezavantajları da vardır. Bunlar, sabit fazın ayrılması beklenen maddeleri parçalaması ve aranan maddeler yerine başka maddelerin bulunması, sabit fazın ayrılan maddelerle kimyasal reaksiyon vermesi ve uygun sabit faz ve çözücü bulunabilmesi için bazen çok zaman harcanmasıdır (44,45).

Dağılma Kromatografisi:

Sabit faz inert ve katı bir destek maddesi üzerine kaplanmış bir sıvıdır. Sıvı veya gaz olabilen hareketli faz, sabit faz ile kaplı destek maddesinin üzerinden geçer. Maddelerin, bu sistemdeki yürüme hızları, iki sıvı faz arasındaki bağli çözünürlüklerine yani dağılma katsayılarına bağlıdır. Sabit fazda daha çok çözünenler daha yavaş ilerlerken, hareketli fazda daha çok çözünenler daha hızlı ilerler.

İyon Değiştirme Kromatografisi:

Bu yöntem, katı bir maddenin, yapısında bulunan iyonları, temasta bulunduğu çözelti içindeki başka iyonlarla bir dengeye göre değiştirmesi özelliğine dayanır. Bu amaçla kullanılan katı maddeler, çözelti ortamında hiç çözünmeyen büyük molekülü doğal ve yapma maddelerdir. Bunlar inorganik ve organik diye ikiye ayrılır. İnorganik olanlar yaklaşık bir asırdır kullanılan killer ve zeolitlerdir. Organik olanlar 1937'den beri kullanılmaktadır. Hem inorganik hem de organik iyon değıştiricilerde

temasta bulundukları çözeltideki iyonlarla değiştirilebilecek pek çok sayıda iyon bulunur.

Sulu çözeltide, yüklü iyonlar ile iyon değiştirici reçine temas ettiklerinde, iyon değiştiricinin fonksiyonel gruplarının yükleri ile iyonların yükleri arasında bir etkileşme oluşur. Sulu çözeltideki iyonlar, sabit fazdaki aynı yüklü iyonlarla yer değiştirerek, kolona bağlanırlar. Bağlanmayan iyonlar ise kolondan en önce çıkarlar. Bu yöntemde reçine tanecikleri sabit fazı, geçirilen çözücü ise hareketli fazı oluşturmaktadır (44,45).

Jel Filtrasyon (Moleküler Eleme) Kromatografisi:

Bu yöntemde, maddeler molekül büyüklüklerindeki farklılığa göre ayrılırlar. Ağsı yapılı polimer materyalde, maddeler molekül büyüklüklerine bağlı olarak, ağsı yapıya girme derecelerine göre birbirinden ayrılırlar. Küçük moleküller tanecikler arasındaki boşluklara girebildiklerinden ilerlemeleri gecikirken, büyük moleküller bu boşluklara giremez ve kolayca ilerlerler.

İyon Çifti Kromatografisi

Bu yöntem, özellikle iyonlaşabilen asidik veya bazik maddelerin ayrılmasında kullanılır. Hareketli faza ilave edilen iyon çifti reaktifi sabit faz tarafından adsorplanır ve iyonize olmuş maddeler bu iyon çiftleri ile iyonik etkileşime girerek birbirinden ayrılır (44, 45).

Afinite Kromatografisi:

Enzim, hormon vb. spesifik proteinlerin saflaştırılmasında kullanılır. Kolonunun dolgu maddesine, (dekstran, poliakrilamid, selüloz vb) spesifik protein ile kompleks yapabilen bir ligand bağlanır. Ligand ile kompleks yapan spesifik protein, katı desteğe bağlanarak kolonda tutulurken; serbest proteinler kolonu terk ederler. Daha sonra, bağlı protein pH değişikliği veya ligand ilavesiyle kolondan elüe edilir.

2.5.2.2. Uygulama Biçimine Göre Sınıflandırma

Düzlemsel Kromatografi

Kağıt Kromatografisi:

Bu yöntemde özel üretilmiş kağıt (selüloz) destek ve gözeneklerine yerleşen su ise sabit “sıvı fazı” oluşturur. Hareketli faz, bir yürütme tankı içerisine yerleştirilmiş uygun çözücüdür. Kağıt üzerine uygulanan karışım, bir yürütme tankı içerisinde, su içeren hareketli faz, kağıdın örnek uygulanan kenarından karşı kenarına ulaşana kadar beklenerek ayrılır. Çözücü, kağıt üzerinde kapiler etki ile ilerlerken karışımdaki maddeler özelliklerine göre ayrılma gösterir (44).

İnce Tabaka Kromatografisi:

Bu yöntemde, kromatografi işlemi cam, alüminyum veya plastik bir yüzey üzerine kaplanmış bir adsorban tabakasında gerçekleşir. Yürütme tankındaki hareketli faz, adsorban tabakası üzerinde aşağıdan yukarıya doğru ilerler (45). Adsorblayıcı tabaka seçiminde ayrılması beklenen maddelerin asidik veya bazik karakterli olması dikkate alınır. Genellikle asidik karakterli maddeler için asidik adsorblayıcılar (silikajel), bazik karakterli maddeler için de, bazik adsorblayıcılar (alüminyum oksit, talk gibi) tercih edilir (44).

İyi bir adsorblayıcıda aranan başlıca özellikler şöyle sıralanabilir;

- Oldukça çok miktarda madde adsorplayabilmeli,
- Üzerinde adsorbe olmuş madde başka çözücüler kullanılarak kolaylıkla geriye alınabilmeli,
- Ayrılacak maddelerle ve çözücülerle kimyasal reaksiyona girmemeli,
- Renklendirme ayıraçlarıyla reaksiyona girmemeli,
- Yapısı çözücünün rahatlıkla geçmesine elverişli olmalı.

Kolon Kromatografisi

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi:

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, sıcaklığa hassas olan maddelere de uygulanabilmesi nedeniyle yaygın olarak kullanılan yöntemlerdendir. Ayrılacak karışım, sisteme bir enjektör yardımıyla verilir ve sıvı hareketli faz ile kolondan basınç altında geçirilir. Numune bileşenleri sabit veya hareketli faza olan ilgilerine göre ayrı ayrı bandlara ayrılır. Bu bandlar kolon boyunca ilerler ve dedektörden geçer. Dedektör bir kaydediciye bağlıdır ve kolondan çıkan her bileşen, pikler halinde kaydedilir. Piklerin çıkış zamanı alıkonma zamanı olarak tanımlanır.

Yöntemin uygulanabildiği başlıca bileşikler ise nükleik asitler, terpenoitler, pestisitler, antibiyotikler, steroidler, proteinler, aminoasitler, ilaçlar, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, metal organik bileşikler vb. dir.

Süperkritik Akışkan Kromatografisi:

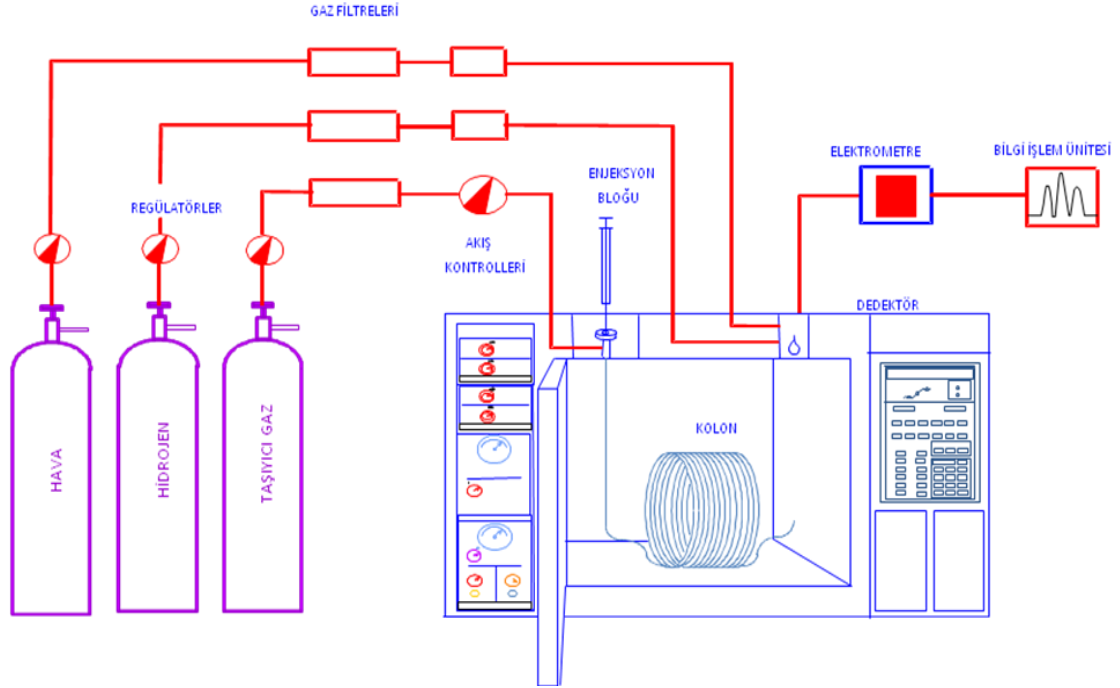
Süperkritik akışkan kromatografi (SFC), gaz ve sıvı kromatografilerinin bir hibridi sayılır ve her iki yöntemin üstünlüklerini birleştirmektedir. SFC, geleneksel sıvı ve gaz kromatografi yöntemleri ile tayini mümkün olmayan bir grup bileşiğin tayinini mümkün kıldığı için önemlidir. Bu bileşikler arasında uçucu olmayan veya gaz kromatografisi şartlarında termal bozunmaya uğrayan bileşikler ve sıvı kromatografide kullanılan spektroskopik veya elektrokimyasal dedektörlerle belirlenmelerini mümkün kılacak fonksiyonel gruplara sahip olmayan bileşikler sayılabilir.

2.5.3. Gaz Kromatografisi (GC)

Gaz kromatografisinde, numune buharlaştırılarak kolonun girişine enjekte edilir. İnert bir hareketli gaz faz ile elüsyon yapılır. Diğer kromatografik yöntemlerin aksine gaz faz analitin molekülleri ile etkileşmez; gazın tek işlevi, analiti kolon boyunca taşımaktır (44-46) (Şekil 2.4).

Gaz kromatografisi iki şekilde uygulanmaktadır;

- Gaz-katı kromatografisi (GSC)
- Gaz-sıvı kromatografisi (GLC)



Şekil 2.4. Gaz kromatografi sistemi

2.5.3.1. Gaz-Katı Kromatografisi (GSC)

Katı sabit faz üzerinde fiziksel adsorpsiyon sonucu analitlerin alıkonmasını temel alır. Gaz-katı kromatografisi iki nedenle sınırlı uygulama alanı bulur bunlar; polar moleküllerin kalıcı denebilecek ölçüde alıkonma problemi ve adsorpsiyon olayının doğrusal olmayışı nedeniyle kuyruklanmanın aşırı oranda meydana gelmesidir. Bu nedenlerle yöntem küçük mol kütleli moleküllerin ayrılmasının dışında fazla bir uygulama alanı bulamamıştır.

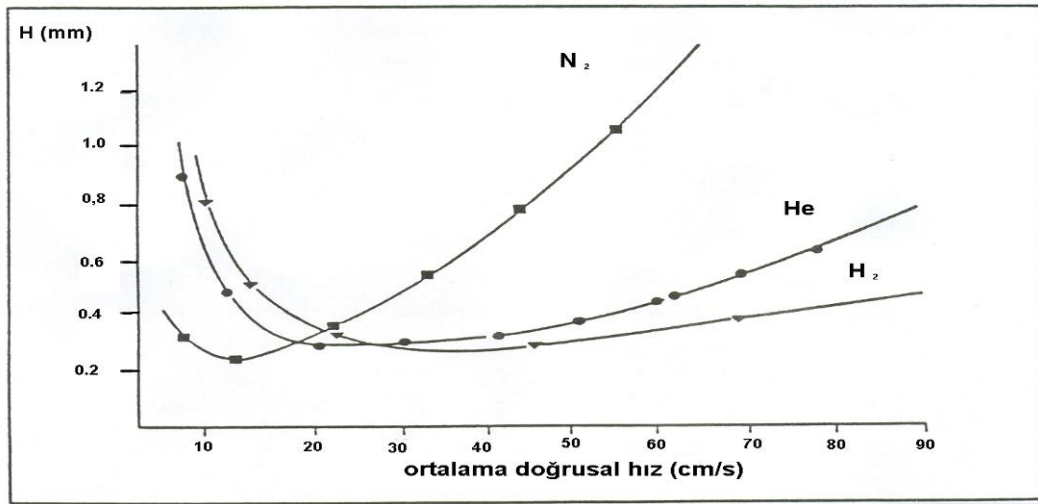
2.5.3.2. Gaz-Sıvı Kromatografisi (GLC)

Analitin gaz halindeki hareketli faz ile bir katının yüzeyine tutturulmuş sabit sıvı faz arasında dağılımı üzerine kurulmuştur (44).

Gaz Kromatografisi Sisteminin Kısımları:

Taşıyıcı Gaz:

İnert olması gereken taşıyıcı gaz; genelde helyum, hidrojen ya da azottur. Şekil 2.5 incelendiğinde, minimum teorik tabaka yüksekliğinde, en yüksek verimliliği N_2 gazının verdiği; fakat N_2 gazının doğrusal hızının artmasıyla verimin düştüğü görülmektedir (46). H_2 gazı geniş doğrusal hız aralığına sahip olmakla birlikte patlayıcı özelliğe sahip olması nedeniyle pek kullanılmaz. N_2 'ye göre daha iyi hız aralığına sahip olan He gazının kullanımı daha fazladır.



Şekil 2.5. GC’de kullanılan taşıyıcı gazlara ait Van Deemter grafikleri

Gaz seçimi genelde kullanılan dedektör tipine bağlıdır. Taşıyıcı tüpüne bağlı elektronik basınç kontrol (EPC) sistemleri, göstergeler ve akış sayaçları bulunur. Bunlara ek olarak, su ya da diğer safsızlıkları gidermek için gaz sisteminde çoğu zaman moleküler elek bulunur.

Akış hızı kontrolü, normal olarak gaz silindirine bağlı iki basamaklı basınç regülatörleri ve kromatografiye bağlı akış regülatörleri ile yapılır. Genel olarak giriş basıncının sabit kalması halinde akış hızının değişmeyeceği varsayılır. Modern ticari kromatografiler akış hızını istenilen değerlere ayarlayabilen ve kontrol eden elektronik cihazlarla donatılmıştır.

Numune Enjeksiyon Sistemi:

Kolon verimi, numunenin uygun miktarda ve buhar halinde “bir defada” verilmesini gerektirir. Yavaş enjeksiyon veya daha fazla miktarda numune verilmesi, pik genişlemesine ve düşük ayırma gücüne neden olur. Sıvı veya gaz numune enjeksiyonunda, yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri sızdırmaz enjektörle manuel enjeksiyondur. Enjeksiyon bir silikon lastik diyaframdan ya da bir septumdan yapılır. Septumun hemen arkasında kolon giriş ucunda hızlı buharlaştırıcı bir bölme bulunur. Normal analitik amaçlar için enjeksiyon hacmi 0,1-20 μL arasında olabilir. Kılcal kolonlarda daha küçük hacimlerde (10^{-3} μL) enjeksiyon yapılır. Bunun için kolon girişine bir bölücü yerleştirilir. Bölücü, enjekte edilen numunenin bir kısmını kolona verirken, kalan kısmı da dışarı atar. Nicel analizlerde daha tekrarlanabilir miktarlarda gaz veya sıvı numunelerinin cihaza verilebilmesi için döner numune vanaları kullanılır. Bu vanalarla, numune enjeksiyonundan kaynaklanan bağlı hatalar %0.5-%2 civarına düşürülebilir. Ancak günümüzde otomatik enjeksiyon sistemleri kullanılarak, enjeksiyondan kaynaklanan hatalar en aza indirilmiştir. Numune istenilen hacimde ve çok hızlı verilir (44).

Kolonlar:

Enjeksiyonla verdiğimiz bileşenlerin birbirinden ayrıldığı, nicel ve nitel analizin yapıldığı bölümdür. Dolgulu ve kılcal kolon olmak üzere iki tip gaz kromatografisi kolonu bulunmaktadır (Şekil 2.6). Dolgulu kolonlar cam veya metalden yapılmış, iç çapları 2-4 mm, uzunlukları 2-3 m olan kolonlardır. Bu kolonlar ince bir sabit sıvı faz ile kaplanmış, homojen ve ince taneli bir katı ile iyice doldurulur. Teorik tabaka sayısı kılcal kolonlardan azdır. Kılcal kolonlarda ise dolgu materyali yerine sıvı fazın kendisi veya destek maddesi ile birlikte kolon iç çeperlerine bağlanmıştır. İç çapları 0.1-0.5 mm, uzunlukları 10-100 m'dir. Kılcal kolonların kullanılması ile dolgulu kolonların önemi azalmıştır.

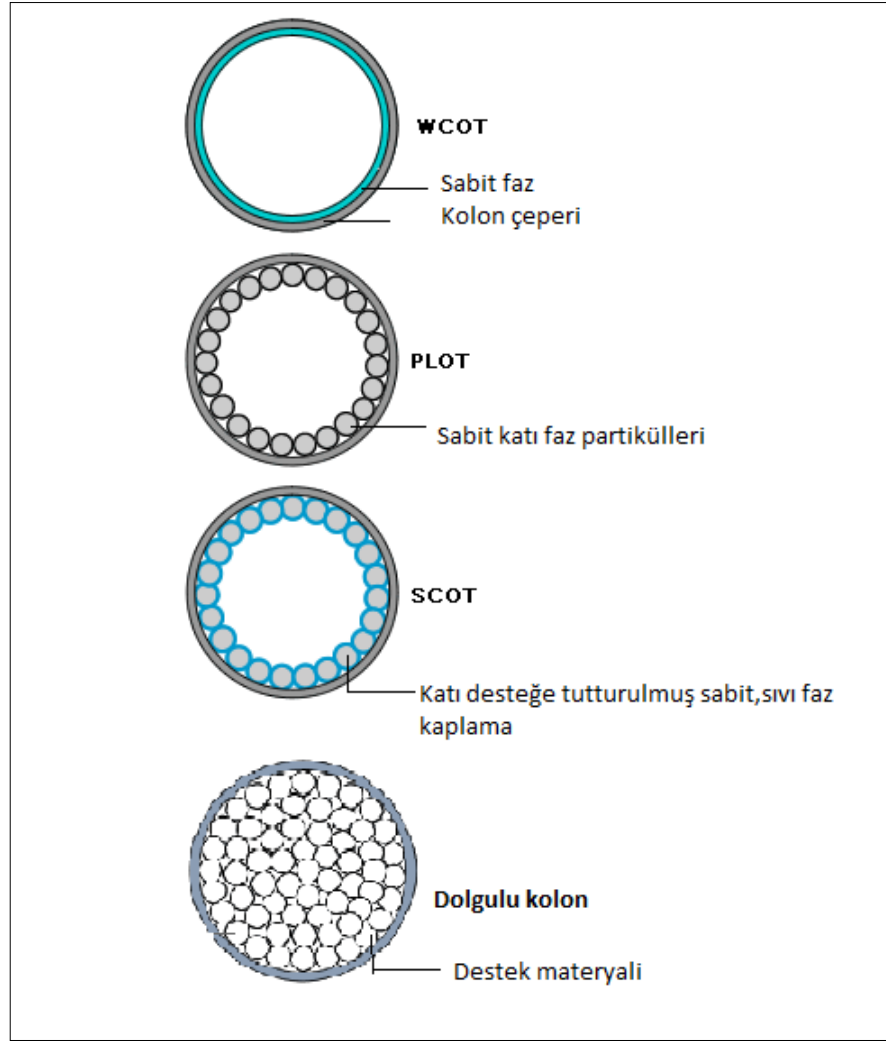
Eritilmiş silika kılcal kolonların geliştirilmesi ve çok çeşitli materyallerle iç çeperlerinin kaplanabilmesi nedeniyle kılcal kolonların kullanımları hızla artmaktadır. Bu kolonlarda sabit faz kolon duvarına mikrometrenin onda biri kadar ince kalınlıkta kaplanmış sıvı filminden oluşmaktadır (46, 47).

Kılcal kolonlar, üç türdür (Şekil 2.6): Bunlar;

a) Duvarı kaplı açık borsal kolonlar (Wall-Coated Open Tubuler Columns, WCOT): Sabit faz katı, viskoz sıvı veya zamlık formunda polimerlerdir. Kılcal kolon çeperine kaplanır. İç çapı 0.005-0.53 mm, film kalınlığı 0.1-3 μm 'dir . 1979'da WCOT kolonları **eritilmiş silis açık borsal kolonlar (FSOT)** olarak adlandırılmıştır. Bu kolonlar kuvars materyalinden yapılmıştır. Daha esnektir ve istenen şekil daha kolay verilebilir.

b). Poröz yüzeyli açık borsal kolonlar (Porous Layer Open Tubuler Columns, PLOT): İç tabakası adsorban materyalle ile kaplıdır. Dezavantajı düşük etkinliğe sahip olması, tekrarlanabilir ve kararlı olmamasıdır.

c) Destek kaplı açık borsal kolonlar (Support-Coated Open Tubuler Columns, SCOT): Destek materyalle sıvı faz kaplanmış şekilde kılcal duvarına yapıştırılmıştır. En önemli avantajı sabit faz kalınlığının daha geniş aralıkta tutulabilmesidir.



Şekil 2.6. WCOT, SCOT, PLOT, Dolgulu kolonlar

Gaz kromatografisi kolonlarında 3 önemli özelliğın bulunması gerekmektedir:

1. Sabit faz, olabildiğince inert bir destek yüzeyini tamamen kaplayan tekdüze kalınlıktaki film tabakası ile oluşturulmalıdır.

2. Kolon film tabakasının, yüksek sıcaklıklarda bozunma ve buharlaşmaya karşı ısısıl kararlılığı olmalıdır. Bu sabit faz moleküllerini destek materyaline kimyasal veya fiziksel olarak bağlayarak polimere benzeyen bir film tabakası oluşturarak gerçekleştirilir.

3. Geri dönüşümsüz olarak numune bileşenlerinin adsorpsiyonuna neden olan ve metalik elementleri, özgün bileşenlerin bozunması için katalitik kısımlar olarak rol oynayan aktif bölgelerin olmaması gerekmektedir.

Eğer kolon, sıcaklık sınırlarının üzerinde uzun süre kalırsa ve WCOT kolonlarda kolon duvarlarında yumuşak, tekdüze bir sıvı kaplaması başılamazsa aktif bölgeler ortaya çıkacaktır. Polar ve apolar sabit faza sahip olan WCOT kolonlar yüksek verimliliğe sahiptir.

Kolonlar saklanırken sıvı faza difüze olabilecek oksijen veya diğer kirlilikleri engellemek için uçları uygun bir şekilde kapatılmalıdır.

Dedektörler :

Gaz kromatografide kullanılan ideal dedektörler aşağıdaki özelliklerde olmalıdır:

- Yeterli duyarlılık nicel olarak tanımlanamaz. Genel olarak bugünün dedektörlerinin duyarlılıkları 10^{-8} - 10^{-15} g madde s^{-1} arasında değişmektedir.
- İyi bir kararlılık ve tekrarlanabilirlik, geniş bir doğrusal çalışma aralığı, $400^{\circ}C$ ' ye kadar varan sıcaklık aralığı olması istenir.
- Numuneyi parçalamamalıdır.
- Her türden analite benzer cevap alınmalı veya belirli sınıf maddelere karşı tahmini kolay ve seçici cevap verme özelliği olmalıdır.

Gaz Kromatografisinde kullanılan başlıca dedektörler şunlardır:

- Termal iletkenlik dedektörü
- Elektron yakalama dedektörü
- Alev iyonlaşma dedektörü
- Alev fotometri dedektörü
- Azot fosfor dedektörü
- Fotoiyonizasyon dedektörü
- Kütle seçici detektör

Geliştirilen yöntemde gaz kromatografisi sisteminde dedektör olarak kütle seçici dedektör kullanılmıştır.

Kütle Seçici Dedektör (MSD):

Kütle spektrometrisi gibi özel olarak üretilen sistemler, gaz kromatografisiyle birlikte dedektör olarak kullanılmaktadır. Kütle dedektörü, gaz kromatografisinden gelen örnekleri gaz halinde yüklü ve hareketli iyonlarına dönüştürerek, bunları kütle/yük oranlarına göre ayırır ve elde edilen spektrum maddenin teşhis ve tayinini sağlar. Burada yüklü bir parçacığın kütlesi m , yükü de z 'dir. Bir maddeden m/z oranları birbirinden farklı birçok parçacık meydana gelebilir. Cihaz, m/z değerleri aynı olan tanecik demetleri için birer pik çizer. Oluşan iyonlar parçalanarak "parçalanma ürünlerini" oluştururlar. Parçalanma ürünleri kütle seçici analizörden geçerken m/z oranlarına göre ayrılır, çoğaltılır, sayılırlar ve böylece ilgili maddeye ait kütle spektrumu oluşturulur. Kütle spektrumları, bağıl çokluk ve m/z değerleri arasında çizilen grafiklerdir. Kısmen basit bileşiklerin spektrumlarında bile, farklı yükseklikte çok sayıda pik görülür. Piklerin sayısı; bileşiğin yapısına, iyonlaşma potansiyeline ve kullanılan cihazın yapısına bağlıdır (46).

2.6. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (GC-MS)

Gaz kromatografisi çoğu zaman seçici spektroskopik ve elektrokimyasal tekniklerle bağlantılı olarak kullanılır. Böylece kombine yöntemler adı verilen bu sistemler, kompleks karışımların analizinde güçlü bir araç olarak tercih edilir (46).

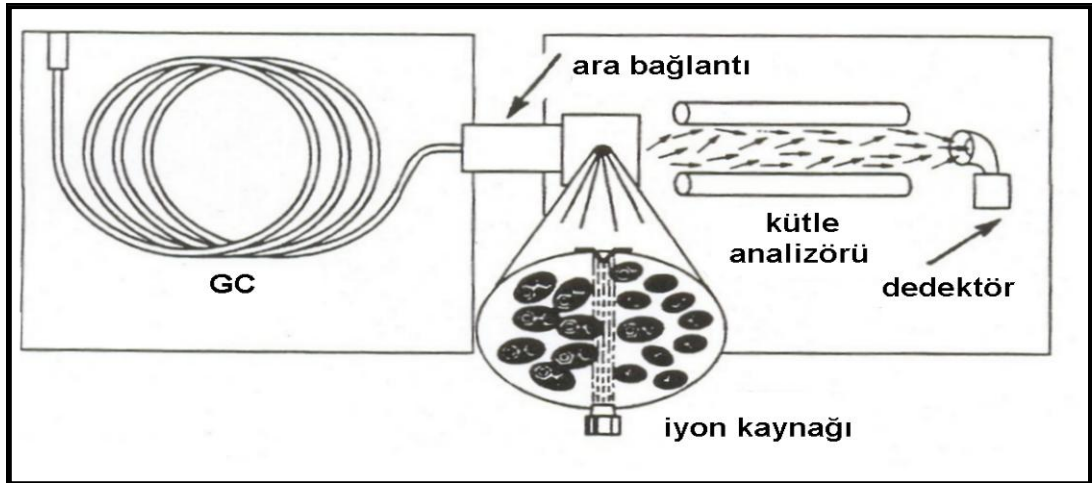
Kütle spektrometresi uzun yıllardan beri kullanılmakta olup kütle spektrumu ilk kez 1898'de Wien tarafından elde edilmiştir. 1905'de ise Thompson kararlı izotopların bulunduğunu göstermek için yapmış olduğu deneyde farklı pozitif iyonların kütle/yük (m/z) oranına göre farklı parabolik yörünge kat ettiğini göstermiştir. Kütle spektrometresi, 1957 yılında Holmes ve Morrel tarafından, gaz kromatografisi ile birleştirilmiştir. Kütle spektrometresinin gaz kromatografisi dedektörü olarak kullanılmasının nedeni toplanacak bilgilerin çokluğudur. Bütün organik bileşik sınıflarına ve tüm organik bileşiklerde ortak bir fiziksel özellik olan kütleye cevap verebilmesi en büyük özelliğidir.

Kütle spektrometrisinde gaz fazındaki numune, yüksek enerjili elektronlarla çarpıştıktan sonra elektronlarını kaybederek pozitif veya negatif yüklü çeşitli iyonlar haline dönüşmektedir. Hızlandırılan bu iyonlar manyetik ve/veya elektrik alanında sapdırılmaktadır. İyonların sapması; kütlelerine, yüklerine ve hızlarına bağlıdır. Eğer yük, hız ve sapdırıcı güç sabit ise, sapma ağır parçacıklarda az ve hafif parçacıklarda çok olacaktır.

Kütle spektrometresi, evrensel, kütle bağımlı ve yıkıcı (parçalayan) bir dedektördür. Kütle spektrometresi, tek bir cihaz olarak kullanıldığı gibi, gaz ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazlarına bağlı olarak da kullanılmaktadır. Her numune için sinyal verir. Numunenin derişiminden bağımsızdır (46).

Kütle spektrometresi şu kısımlardan oluşur (Şekil 2.7);

1. Ara bağılantı
2. İyon kaynağı
3. Kütle analizörü
4. Dedektör
5. Vakum Sistemleri



Şekil 2.7. Kuadropol GC-MS sisteminin şematik gösterilişi

2.6.1. GC-MS Ara Bağlantıları

Gaz kromatografisi ile kütle spektrometresi arasındaki basınç farkından dolayı ara bağlantıya gerek vardır. Gaz kromatografisi atmosfer basıncında, kütle spektrometresi ise çok düşük basınçta (10^{-5} - 10^{-9} torr) çalışmaktadır. Kütle spektrometresindeki vakum koşullarının bozulmasını engellemek için gaz kromatografisinden gelen eluattan taşıyıcı gazın uzaklaştırılmasını ve bileşenlerin kütle spektrometresi iyon kaynağına iletilmesini sağlamak için ara bağlantı kullanılır.

Kullanılan ara bağlantılar şunlardır;

a) Effusif ara bağlantı: Bu bağlantının çalışma prensibi taşıyıcı gaz ile numunenin kütle farklılığından dolayı ayrılmasına dayanır. Gaz kromatografisi akıntısı vakum içine yerleştirilmiş poröz cam tüpün içine doğru olur. Daha çok dolgulu kolonlarda kullanılır.

b) Jet ayırıcılıklı ara bağlantı: Temeli numune ve taşıyıcı gazın gaz kromatografisinden çıkıp küçük jet açıklığına doğru geçmesine dayanır. Geçişte molekülün hızı artar ve iki açıklıktan geçerek iyon kaynağına gelir. Hafif taşıyıcı gazlar vakum alanında dışarı pompalanır. Numunelerin inertliği için jet ara bağlantı camdan yapılmıştır ve geniş aralıktaki numune tiplerine uygundur. Hem dolgulu hem de WCOT kolon ile kullanılabilir.

c) Geçirgen zarlı ara bağlantı: Taşıyıcı gaz ve numunenin silikon zar yüzeyinden, zarın diğer tarafında bulunan iyon kaynağı vakum odasına doğru geçişini sağlar. Organik moleküller zar yüzeyinde çözünür ve kütle spektrometresinin vakum kısmına girer. Organik olmayan taşıyıcı gaz molekülü çözülemez ve dışarı atılır. Dalgulu kolon kullanılan gaz kromatografisi cihazı genelde organik madde analizlerinde tercih edilir.

d) Doğrudan bölmeli ara bağlantı: Akış, ara bağlantıda bölünerek kütle spektrometresinin pompalama kapasitesine uygun olması sağlanır. Kolon sonunda bölünen kısım atmosfere atılır. Nicel analiz için uygun değildir.

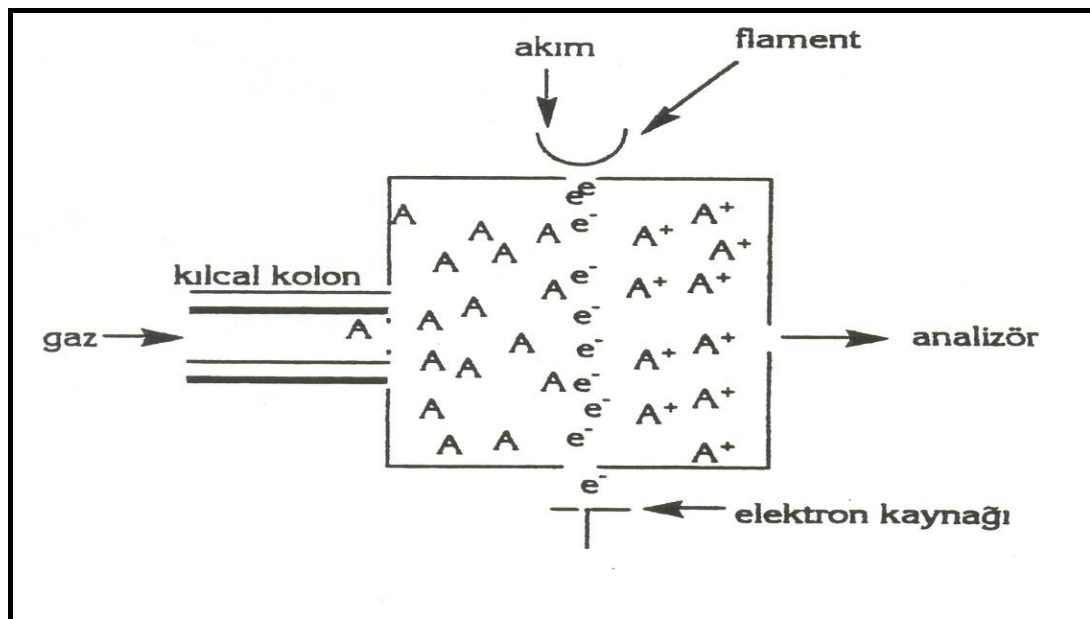
e) Açık bölmeli ara bağlantı: Kolon ucu kütle spektrometresine gaz ayarlayıcısı ile bağlanır. Gaz ayarlayıcı ile istenen akış sağlanarak gazın fazlası dışarı atılır. Kılcal kolonlarla kullanılır.

f) Doğrudan kılcal kolon bağlantıları: 1-3 mL dak⁻¹ gibi düşük taşıyıcı gaz akış hızları söz konusu olduğunda gerekli basınç düşmesi, kütle spektrometresinin vakum sistemi ile sağlanabilir. Bu nedenle de doğrudan bir ara bağlantı kullanılabilir. Bu durumda hem taşıyıcı gaz hem de numune, taşıyıcı gazın numune moleküllerinden daha büyük hızda pompalandığı kütle spektrometresinin iyon kaynağına girerler. Yüksek taşıyıcı gaz akışlarından dolayı dolgu kolona uygulanmaz. Çalışmalarımızda bu sistem kullanılmıştır.

2.6.2. İyon Kaynağı

Moleküllerin iyonlaştığı bölümdür. Bir molekül, atom veya iyondan bir elektron uzaklaşması olayına iyonlaşma denir. İyonlaştırma teknikleri; gaz, sıvı ve katı gibi maddenin farklı fiziksel durumuna ve maddenin ısısal kararlılığına bağlı olarak seçilir. Gazlar ve sıvılar için elektron ve foton bombardımanlı iyonlaştırma; katılar için ise termal, lazer desorpsiyon, atom bombardımanı, elektrik boşalım ve alan desorpsiyon iyonlaşma uygundur. Günümüzde en çok kullanılan iyonlaştırma teknikleri elektron bombardımanı ile iyonizasyon ve kimyasal iyonizasyondur.

a) Elektron bombardımanı ile iyonizasyon (EI): EI kısaca analit molekülünün enerjili elektronlarla bombardıman edildiği iyonlaşmadır (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Elektron bombardımanı ile iyonizasyon (EI)

Sıcak bir flamandan çıkan elektronlar bölme boyunca odaklanır ve 70 eV'luk bir potansiyele sahip bir elektrot tarafından çekilir. Böylece her bir elektron 70 eV'luk bir enerji kazanır ve ortama giren numune ile çarpışarak bir dizi parçalanma tepkimeleri oluşur. Moleküldeki bağların kırılması pozitif ve negatif iyonların oluşmasını sağlar. Çoğu organik molekül için pozitif iyon oluşumu enerji açısından daha çok tercih edilir. Elektronun sahip olduğu enerji bağları kırmak için yeterli enerjidir. 70 eV'luk enerjinin kullanılması kararlı, tekrarlanabilir ve moleküle özgü kütle spektrum oluşmasını sağlar. Elektron bombardımanı ile oluşan iyonların bağlı büyüklükleri, iyonize edici elektronların enerjileri ve iyonizasyonun oluştuğu sıcaklığa bağlıdır. Çalışmamızda EI tekniği kullanılmıştır.

b) Kimyasal iyonlaştırma (CI): Genellikle düz zincirli alkan, alken veya alkoller gibi homolog bileşikler EI ile kararlı moleküler iyonlara sahip pozitif tanımlama yapılamayacak kadar küçük bağlı bolluğa sahiptirler. CI'nın esas iyon-molekül tepkimelerine dayanır. Yüksek enerjili iyonlar çarpıştıkları moleküle ya proton aktarırlar ya da ondan hidrür ve elektron koparırlar. Kimyasal iyonlaşmalı kütle spektrometresinde (CI-MS), iyon kaynağına reaktif gaz verilerek yüksek basınç elde edilmektedir. Reaktif gaz numune molekülleri ile iç etkileşime girecek reaktif iyonlarını oluşturmak üzere elektron demeti tarafından iyonize edilmektedir. Ortamdaki yüksek basıncın etkisiyle reaktif iyon ile numune iç etkileşime girer. EI'ya göre enerji daha düşüktür.

2.6.3. Kütle Analizörü

İyon kaynağından çıkan iyonlaşma ürünleri analizöre yönlendirilir. Analizör, m/z oranlarına göre maddelerin ayırımının sağlandığı bölümdür.

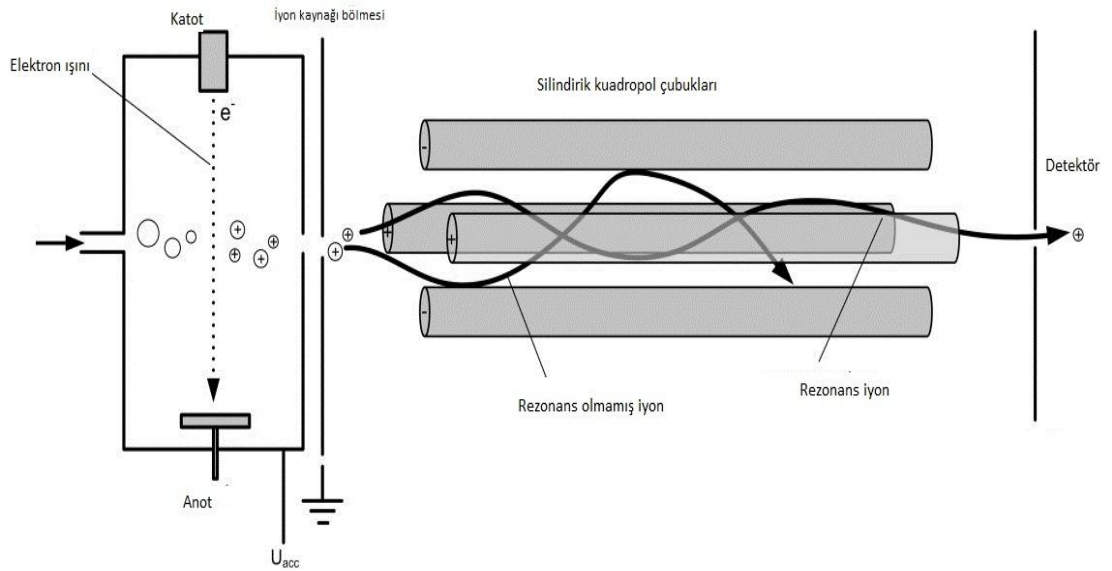
En çok kullanılan kütle analizörleri şunlardır;

a) Manyetik sektörlü kütle analizörü: Manyetik sektör analizörlerinde kalıcı mıknatıslar veya elektromıknatıslar kullanılır; bu mıknatıslar iyon kaynağından gelen demete iyonların m/z oranlarına bağlı olarak 180, 90 veya 60 derecelik açılarla dairesel hareket yaptırırlar. Bu bölgede iç basınç 10^{-7} torr civarındadır.

b) Uçuş zamanlı kütle analizörü: İyonlar uçuş tüpü adı verilen tüpün içinden geçerler ve bu sırada hızlandırıcının etkisiyle eşit momentuma sahip olurlar. Böylece kütleleri birbirinden farklı olan iyonların hızları da farklı olarak belirlenir.

c) Kuadropol kütle analizörü: Kuadropol, eksenlere simetrik olarak yerleştirilmiş, 4 adet zenginleştirilmiş altın çubuktan oluşmaktadır. Kuadropol kütle analizörünün belirli bir kütle aralığında tarama yapması ve ayırım için radyo frekansı (RF) ve doğru akım (DC) voltajı uygulanır. X eksenindeki çubuklara pozitif, y eksenindeki çubuklara negatif gerilim uygulanarak iyonlaşan örnek moleküllerinin çubuklar arasında rezonansa gelmesi sağlanır. RF voltajının büyüklüğü iyonların kütlesini belirtir. DC voltajının RF voltajına oranı, ayırımı belirtir.

Kuadropol kütle analizörü, yüksek duyarlılığa ve milisaniye aralıklar ile hızlı tarama özelliğine sahiptirler. Bu özellikler dar piklere sahip WCOT kolon takılmış gaz kromatografisi cihazlarına bağlamak için çok uygundur ve çalıştığımız cihazda kuadropol kütle analizörü kullanılmıştır. Kuadropol kütle analizörü şematik olarak Şekil 2.9'da gösterilmiştir.



Şekil 2.9. Kuadropol kütle analizörü

Kuadropol analizörün en önemli özelliği, tarama hızının büyük olması ve taranan kütle aralığının magnetik sektörlü kütle spektrometrelerine göre sınırlı

olmasıdır. Kuadropol analizöründe, yüksek kütlelerde bağlı çokluk fazla değildir. Filtre edilen kütlelerin farklı olabilmesi için RF/DC oranı sabit tutularak DC potansiyeli değiştirilir. Kütle taraması ya DC ve RF voltajı değiştirilip oranlar sabit tutularak ya da RF ve DC voltajı sabit tutulup frekans değiştirilerek yapılmaktadır.

2.6.4. Dedektör

Kütle analizörlerinden geçen iyonlar elektron çoğaltıcı dedektöre ulaşır. Elektron çoğaltıcıda çarpışmadan dolayı oluşan akım, önce analog voltaja, sonra da dijital sinyale dönüşür.

En çok kullanılan dedektörler dizi dinot elektron çoğaltıcı (Şekil 2.10.a) ve devamlı dinot elektron çoğaltıcılardır (Şekil 2.10.b). Bunlar sinyali 10^7 düzeyine kadar artırabilirler. Bu da femtoamper gibi çok düşük iyon akımlarının kaydedilmesini sağlar.

Kütle spektrometresinden milisaniye aralıklarla gelen verilerin hızla kaydedilmesi ve depolanması gereklidir ki, bu bir bilgisayarla kolayca sağlanabilmektedir. GC-MS sistemi, ara bağlantı ve veri toplama basamaklarındaki problemlerin çözülmesinden sonra, daha yaygın kullanılmaya başlanmıştır. Bunlardan başka aletin kalibrasyonun otomatik yapılıp, sonuçlarının alınabilmesi, analiz koşullarının kolayca girilmesi, aletin kontrolünün yapılıp verilerin alınabilmesi, analiz sonrası veri değerlendirmelerinin yapılabilmesini bilgisayar sağlamaktadır.

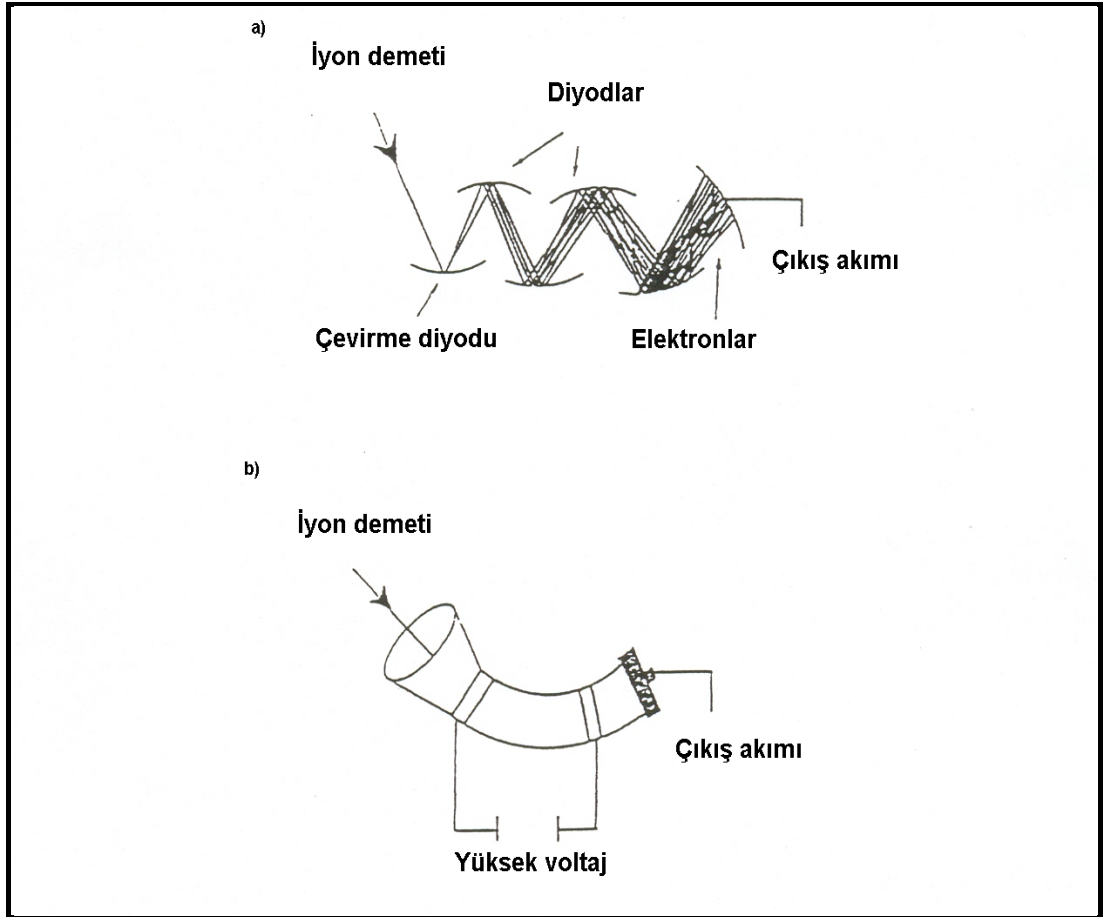
Kütle spektrometresi ile analizlerde 3 tip iyon tarama şekli vardır;

1. Toplam iyon taraması (TIC): Bir analiz sırasında ayırım yapmadan tüm iyonların istenilen atomik kütle birimlik (akb) aralığında taratılması ile gerçekleştirilir.

2. Seçilmiş iyon taraması (SIM): Aranılan bileşik için en karakteristik olan, kararlı ve bolluğu fazla olan m/z değerleri seçilip, taratılır. Seçici iyon taramasında seçilen iyonların tarama süresi (dwell time) analizci tarafından seçilir.

3. Tek iyon taraması: Tek iyon taratılır. Çok hassastır, ancak kesin tanımlama yapılamaz.

Çalışmamızda TIC çalışma konumunda çokluğu en fazla olan m/z değerleri belirlenmiş ve bunlardan 3 tane iyon seçilerek SIM taraması ile analizler gerçekleştirilmiştir. En yüksek cevabı veren iyon üzerinden ise nicel tayin yapılmıştır.



Şekil 2.10. (a) Dizi dinot, (b) Devamlı dinot elektron çoğaltıcı dedektörlerin şematik gösterilişi

2.6.5. Vakum Sistemleri

Kütle spektrometresi cihazı 10^{-5} - 10^{-9} torr düşük basınç altında çalışmaktadır. Kütle spektrometresinde vakum sisteminin olmasını gerektiren nedenler şöyle sıralanabilir;

1. Flaman yüksek basınçtaki oksijen altında ısıtılırsa yükseltgenip yanabilir.

2. Basınç arttıkça kütledeki çoğaltıcı, kaynak ve analizörde yüksek voltaj kırılmaları olabilir.
3. Kütle spektrometresinin iyon kaynağında bulunan gaz, spektral geri zemine katılabilir (örn; su, azot ve oksijenden gelebilecek m/z: 18, 28 ve 32).
4. Kütle spektrometresinde düşük basınç sağlamanın en önemli nedeni, analiz edilen iyonlar arasındaki çarpışmayı en aza indirmektir. Çünkü, iyon sürekli diğer moleküller ve yüzeyler ile çarpışıyorsa, iyonları belli bir yolda yönlendirmek için kullanılan güçler yararsız olacaktır.
5. Yüksek basınç ile analizörün, iyon kaynağının ve odakların kirlenmesi artmaktadır.
6. Yüksek basınç ile spektrum almak ve yorumlamak zordur.
7. Basınç artarken iyon kaynağına doğru olan elektron akımı düzeltmeleri zorlaşır.
8. Vakum sistemi analizörün işlemini gerçekleştirmesi için gereken moleküler ortalama yolu sağlar.

Bu nedenlerden dolayı kütle spektrometresi için vakum sistemleri çok önemlidir. Kütle spektrometresinde cihaz içindeki basıncı 10^{-5} torr civarında tutmak için değişik pompalar kullanılır. Bunlardan en çok kullanılan kaba, turbo moleküler ve difüzyon pompalarıdır. Çalışmamızda difüzyon ve kaba pompalı MSD kullanılmıştır.

2.6.6. GC- MS Sisteminin Ayarlanması (Autotune)

Analize başlamadan önce ve periyodik aralıklarla kütle spektrometresindeki iyonlaştırıcı, kütle analizörü ve dedektör kısımlarının, uçuculuğu yüksek ve kararlı organik bileşikler kullanılarak ayarlanması gerekmektedir. Sistemde bu işlem "autotune" denilen donanım kullanılarak yapılır. Ayarlama için iyon kaynağının basıncı 10^{-5} torr civarında olmalıdır. Standart olarak kullanılan bileşik çalışılan kütle aralığını kapsamalı ve pik şiddeti yüksek olmalıdır. Uçuculuğu fazla ve kararlı organik maddelerden olmalıdır. Kullanılan ayarlama maddesi iyon kaynağına verilerek kütleler ve izotopları gözlenir.

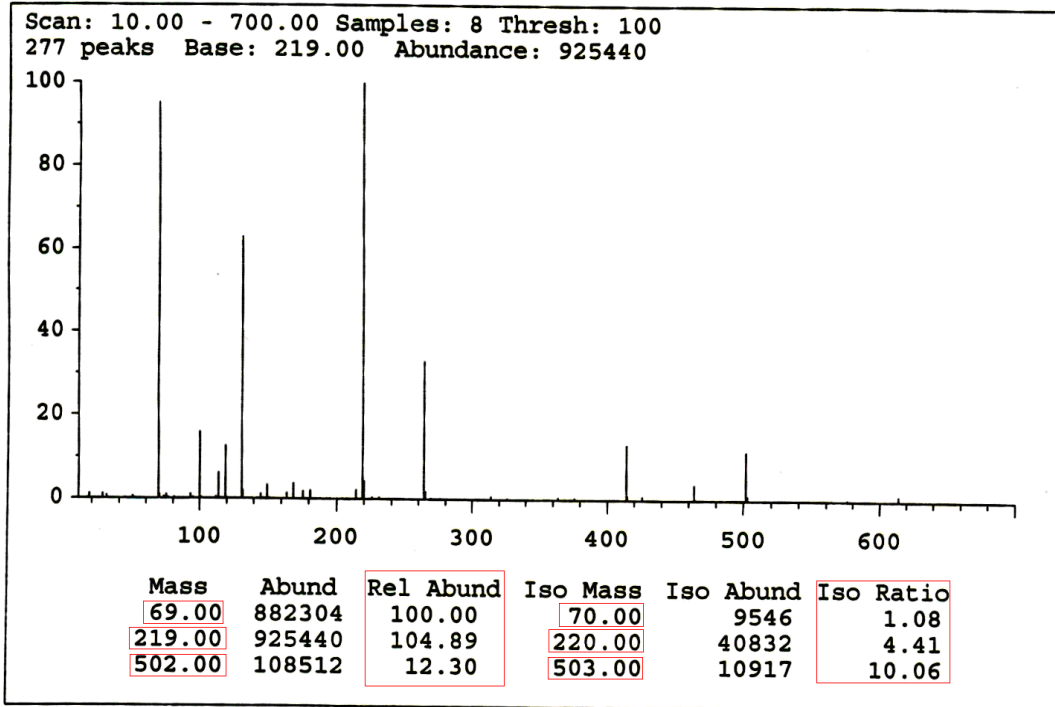
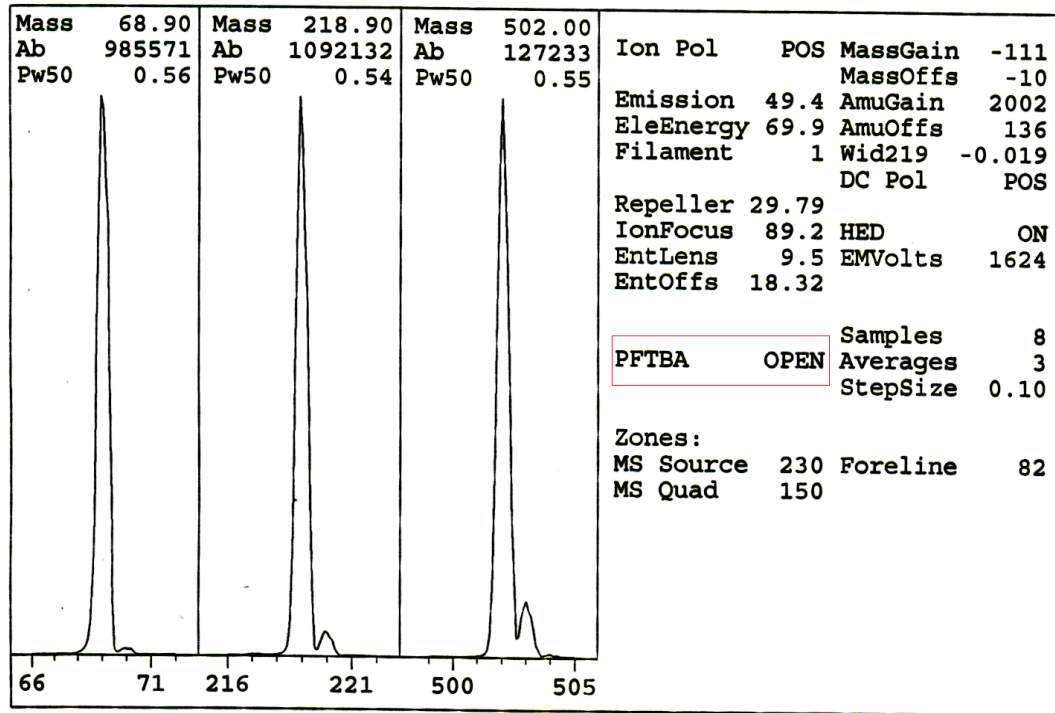
Ayarlama bileşiği olarak çalışmamızda kuadropol sistemlerinde standart olarak en çok tercih edilen perflorotributilamin (PFTBA) kullanılmış ve bu maddeye

özgü 69, 219, 502 m/z pikleri temel alınmıştır. Autotune sonucu Tablo 2.1’de tanımlanan kabul kriterlerine göre değerlendirilmiştir. Kabul kriterleri sağlanmadan analize başlanmamıştır. Şekil 2.11’de cihazın kabul edilebilir bir “autotune” çıktısı görülmektedir. (48)

Ayrıca m/z=18 (su) ve 28 (hava) pikleri, m/z=69 pikinin %10'undan az olmalıdır. Fazla olduğunda sistemde kaçak olması olasılığı vardır. m/z=502 pikinin bağıl çokluğu azaldığında ise, iyon kaynağının kirlendiği söylenebilir.

Tablo 2.1. Kütle spektrometresinin ayarlanmasında kullanılan kütlelerin bağıl çoklukları ve izotop kütle oranları

<i>Kütle</i>	<i>Bağıl Çokluk (%)</i>	<i>İzotop Kütlesi</i>	<i>İzotop Oranı (%)</i>
69.0	100	70.0	0.5 – 1.6
219.0	> 35	220.0	3.2 – 5.4
502.0	> 1	503.0	7.9 – 12.3



Şekil 2.11. Analizde kullanılan GC-MS cihazının autotune çıktısı

2.7. Türevlendirme Teknikleri

Ayrılacak karışımın, sabit fazla etkileşmesinden dolayı, piklerde kuyruklanma görülebileceği gibi, alıkonma zamanlarının uzamasına, örneğin kolonda ısıyla parçalanmasına neden olabilir. En büyük güçlükler, karboksi, hidroksi, amino ve imino grupları içeren bileşiklerin analizinde yaşanmaktadır. İstenmeyen bu gibi durumlar, analitin, daha uçucu ve daha az polar türevlerine dönüştürülmesiyle giderilir. Bu türevler piklerin tanınmasında da yararlıdır. En yaygın kullanılan türevlendirme şekilleri, alkilleme, asetilleme ve silillemedir (49-51).

Alkilleme: Analiz edilecek moleküldeki aktif hidrojenin, bir alkil veya bir aril grubu ile yer değiştirmesi ile tanımlanabilir. Metilleme, bir alkilleme tekniğidir. Metilleme tepkimesinde, bir metil grubu aktif hidrojenler ile yer değiştirir. Metillemenin dezavantajı, tepkimenin tamamlanması için gerekli olan sürenin uzun olmasından kaynaklanmaktadır. Bu süre 2-24 saat arasında değişebilmektedir. Son yıllarda mikrodalga tekniği kullanılarak tepkime süresi kısaltılabilmektedir.

Asetilleme: Alkol ve fenol hidroksil grubu içeren maddelere ya da primer veya sekonder amin grubu içeren maddelere tatbik edilebilir. Bu yöntemde genel olarak, asetik anhidrid veya asetil klorür türevlendirme reaktifi olarak kullanılır.

Sililleme: Alkoller, fenoller, steroidler, karbonhidratlar, aminoalkoller, aminoasitlerin trimetilsilil türevleri yapılır ve böylece uçucu hale getirilerek GC ile ayrılırlar. Bunun için trimetilklorosilan (TMCS), hekzametildisilan (HMDS), trimetilsilildietilamin (TMSDEA), N,O bis(trimetilsilil) trifluoroasetamid (BSTFA) ve N-metil-N-trimetilsilil trifluoroasetamid (MSTFA) kullanılır.

Silil türevlerinin avantajları; tekrarlanabilirliğinin yüksek olması, yan tepkime vermemesi, türevlendirme tepkimesinin kolay olması ve pik şekillerinde iyileştirme sağlamasıdır. Sililleme tepkimesinin gerçekleşmesi için nemsiz bir ortam gerekmektedir.

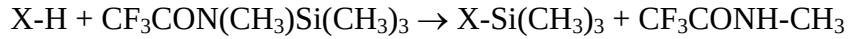
En çok kullanılan türevlendirme reaktifleri Tablo 2.2’de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. Türevlendirme reaktifleri

Sistemik İsmi	Kısaltması	Formülü
Trimetilklorosilan	TMCS	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \quad \text{Cl} \\ \quad \diagdown \quad \diagup \\ \quad \text{Si} \\ \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \end{array}$
Hekzametildisilan	HMDS	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C}-\text{Si}-\text{Si}-\text{CH}_3 \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \end{array}$
N,O,bis(trimetilsilil) trifloroasetamid	BSTFA	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{CF}_3 \quad \text{CH}_3 \\ \quad \diagup \quad \\ \text{H}_3\text{C}-\text{Si}-\text{N}=\text{C} \quad \text{O}-\text{Si}-\text{CH}_3 \\ \quad \quad \quad \\ \text{CH}_3 \quad \quad \quad \text{CH}_3 \end{array}$
Trimetilsilildietilamin	TMSDEA	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3-\text{Si}-\text{N} \begin{array}{l} \diagup \text{CH}_2\text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}_2\text{CH}_3 \end{array} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
N-metil-N-trimetilsilil trifloroasetamid	MSTFA	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{F}_3\text{C}-\text{C}-\text{N}-\text{Si}-\text{CH}_3 \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \end{array}$
N-metil-N(tert-butildimetilsilil) trifloroasetamid	MTBSTFA	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{F}_3\text{C}-\text{C}-\text{N}-\text{Si}-t\text{Bu} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \end{array}$
Metil iyodür	CH ₃ I	I-CH ₃
Etilkloroformat	ECL	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{Cl}-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_3 \end{array}$

Trimetilsililleme (TMS) gaz kromatografisi tekniği için en uygun türevlendirme şeklidir. Kuvvetli TMS donörü olması, tepkime hızının diğer ajanlara göre daha fazla olması ve uçucu olmasından dolayı MSTFA diğer sililleme ajanlarına göre daha fazla tercih edilmektedir (52).

Silil türevleri, TMS'nin genellikle aktif hidrojen içeren (-NH, -OH, -SH, -NH₂, -NHR) gruplardaki hidrojen ile yer değiştirmesi sonucu oluşur. Bu türev kolay hazırlanır ve ısısal kararlılığı yüksektir. Sililleme tepkimesi bir yer değiştirme tepkimesidir. MSTFA ile gerçekleştirilen sililleme aşağıdaki tepkime gereği olmaktadır (51).



2.8. Örnek Hazırlama

Örnek hazırlama, özellikle yüksek basınçlı sıvı kromatografi ve gaz kromatografi gibi teknikler ile gerçekleştirilecek analizler öncesinde tamamlanması gereken önemli bir basamaktır. Analitlerin deriştirilmesi ve kirli matrislerde, örneğin saflaştırılması amacı ile yapılan bu işlem, ekstraksiyon ve gereğinde türevlendirme gibi aşamalardan oluşur. Ekstraksiyon, bir karışımdan bir bileşiği uygun bir çözücü ile ayırma işlemidir. İlaçların biyolojik materyalden analizi için kullanılan sıvı-sıvı ekstraksiyon ve katı faz ekstraksiyon yöntemleri aşağıda kısaca açıklanmıştır (53).

2.8.1. Sıvı-Sıvı ekstraksiyonu

Günümüzde de, en temel ekstraksiyon yöntemi olan sıvı-sıvı ekstraksiyon “benzer benzeri çözer” ilkesine dayanmaktadır. Bu yöntemde madde, organik ve sulu özellikteki sıvı çözücü fazlar arasındaki dağılımı kullanılarak, içinde bulunduğu ortamdan ayrılır. Bu yöntemin en büyük avantajı, değişik çözücü kombinasyonları ile neredeyse her tür ayırma işleminin gerçekleştirilebilmesidir. İyi bir ekstraksiyon için çözücünün bazı özelliklere sahip olması istenir. Bu özellikler kısaca aşağıda verilmiştir.

- Suda çözünmemelidir.
- Sudan farklı yoğunlukta olmalıdır.
- İyi bir kararlılık ve uçuculuğa sahip olmalıdır.
- Molekülü kolay bir şekilde çözmelidir.
- Toksik ve yanıcı olmamalıdır.

Ekstraksiyon için kullanılan çözücüler, yoğunluğu sudan az olanlar (dietileter, etil asetat, hekzan, toluen) ve yoğunluğu sudan fazla olanlar (diklorometan, kloroform) olmak üzere iki gruba ayırmak mümkündür. Ekstraksiyon için yaygın olarak kullanılan çözücüler Tablo 2.3’ te verilmiştir.

Tablo 2.3. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu için yaygın olarak kullanılan çözücüler

Çözücü	Dielektrik sabiti	Kaynama noktası ($^{\circ}\text{C}$)	Yoğunluk (g mL^{-1})	Yanıcı	Toksitite
Hekzan	1,9	68,7	0,65	+++**	+*
Benzen	2,3	80,1	0,87	+++	+++
Eter	4,3	34,6	0,71	+++	+
Kloroform	4,8	61,7	1,48	- ***	+++
Etil asetat	6,0	77,1	0,89	+++	+
Diklorometan	8,9	39,7	1,31	-	++
Butanol	17,5	117,7	0,81	++	+

*etkisi az; **etkisi en çok; ***etkisi yok

2.8.2. Katı-Faz Ekstraksiyonu (SPE)

Katı faz ekstraksiyon (SPE: Solid Phase Extraction) yönteminde örnek, küçük, tek kullanımlık ekstraksiyon kolonlarından geçirilir. Kolonda bulunan özel dolgu maddesi, analiz edilecek bileşenlerin matriksten ayrılmasını sağlar. Kolona tutunan ilgili bileşikler dolgu maddesinden uygun çözücü ile elue edilir. Bugün piyasada çok değişik özellikte dolgu maddeleri ile hazırlanmış SPE kolonları mevcuttur (53).

2.9. Analitik Yöntem Validasyonu

Analitik yöntemin validasyonunun amacı, bilimsel bütünlük ve uygunluğun sağlanması, amaçlanan kullanım için yeterli güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçların alınmasıdır. Bir analitik yöntemin, rutin kullanıma uygulanmadan önce, valide

edilmiş yöntemin koşullarında (farklı özelliklere sahip cihaz kullanılması veya farklı matriksten gelen örnekler vs.) herhangi bir değişiklik olduğunda, yöntem değiştirildiği zaman ve değişiklik yöntemin orijinal kullanımı dışında ise valide edilmeye veya tekrar validasyona ihtiyacı vardır (54).

2.9.1. Yöntem Validasyonunun Değerlendirilmesinde Kullanılan Parametreler

Validasyon için incelenecek parametreler ve yer aldığı klavuzlar tarafından hangi parametrelerin istendiği Tablo 2.4.' te gösterilmektedir (55,56).

Tablo 2.4. Validasyon için incelenen parametreler

Sistem Uygunluk	FDA, USP
Özgünlük (Specificity) / Seçicilik (Selectivity)	USP, ICH, FDA
Doğruluk (Accuracy)	USP, ICH, FDA
Kesinlik (Precision) Tekrarlanabilirlik (Repeatability) Ara Kesinlik (Intermediate Precision) Yeniden üretilebilirlik (Reproducibility)	USP, ICH, FDA ICH ICH ICH*
Gözlenebilme sınırı (LOD)	USP, ICH, FDA
Alt tayin sınırı (LOQ)	USP, ICH, FDA
Doğrusallık (Linearity)	USP, ICH, FDA
Derişim Aralığı (Range)	USP, ICH, FDA
Tutarlılık (Ruggedness)	USP
Sağlamlık (Robustness)	USP, FDA, ICH*
Kararlılık (Stability)	FDA
Geri kazanım	FDA

(*): Gerekli değildir.

Sistem uygunluğu

Analitik uygulamaları yapmadan önce referans standardı ile cihazın performansını belirlemek için yapılır. Bu amaçla kromatografik sistemlerde ayırıcılık (R_s), teorik tabaka sayısı (N), enjeksiyon tekrarlanabilirliği, ve pik simetri oranı (PSO) parametreleri incelenir (57).

Özgünlük (Seçicilik)

Yöntemin özgünlüğü; analiti, örnekte varlığı tespit edilmiş analit ile girişim yapabilen diğer bileşenlerden farklı olarak ölçme yeteneğidir. Seçicilik için, uygun biyolojik matriksin (plazma, idrar veya diğer matriksler) kör çözeltilerinin analizinin en az 6 farklı kaynaktan kontrollü koşullarda elde edilmesi gerekir. Her kör çözeltisi önerilen ekstraksiyon prosedürü ve kromatografik veya spektroskopik şartlar ile girişim açısından test edilmelidir.

Bir biyolojik matrikste potansiyel girişim maddeleri; endojen matriks bileşenleri, metabolitler, ayrışma ürünleri ve gerçek çalışmada ilaçların birlikte uygulanmasından kaynaklanmaktadır. Eğer bir yöntem birden fazla analiti tespit etmek üzere belirlendiyse, her bir analitin birbirinden etkilenen girişim problemi olmadığı da gösterilmelidir (57).

Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık

Kalibrasyon (standart) eğrisi aletsel cevap ile analitin bilinen derişimi arasındaki ilişkidir. Kalibrasyon eğrisi numunedeki her analit için oluşturulmalıdır. Derişim-cevap ilişkisini tam olarak tanımlamak için yeterli sayıda standart kullanılmalıdır. Kalibrasyon eğrisinde kullanılan standartlar, analitin bilinen derişimlerinde ekleme yapılarak ve analizlenecek numuneler ile aynı biyolojik matrikste hazırlanmalıdır. Kalibrasyon eğrisi, kör numune (iç standart içermeyen matriks numunesi), zero olarak adlandırılan iç standart içeren matriks numunesi ve beklenen derişim aralığında LOQ'yu da içeren 6-8 adet, sıfır dışında değerden oluşmalıdır. Kör ve iç standart içeren matriks numunesi kalibrasyon fonksiyonunda kullanılmaz, sadece girişimi değerlendirmek için kullanılır. Kalibrasyon eğrisinde

LOQ' nun % 20' den büyük, LOQ dışındaki standartların ise % 15' den büyük sapma göstermemesi gerekmektedir. Kalibrasyon eğrisinde en az 5 değer olmalıdır (57).

Doğrusallık, yöntemin test sonuçlarından doğrudan elde edilerek ya da çok iyi tanımlanmış matematiksel derişimleri belli, belirli bir sırada verilen örnekler içinde analitin değişik derişimdeki örneklerinden elde edilir. Bir analitik yöntemin sınırları; bir yöntemin doğruluğu, doğrusallığı ve kesinliği kullanılarak kararlaştırılmış en düşük ve en yüksek değerler arasındaki süreçtir. Sınırlar, normalde test sonuçları ile aynı birimlerde ifade edilir (58).

Gözlenebilme Sınırı (LOD)

Gözlenebilme sınırı, analitin analitik bir işlemle gözlenebilen en düşük derişimidir. LOD'nin belirlenmesi aletli ve aletsiz olmak üzere yöneme göre değişir. Kromatografik ölçümlerde pratik bir kural olarak sinyal/gürültü (S/G) oranından faydalanılır. S/G oranının 3 olduğu değer LOD değeridir. Ancak aletlere, lambaya, matrikse (idrar, plazma v.s.) göre değişir. ICH' de bu kuralın yanı sıra gürültünün ölçülemediği miktar tayini yöntemlerinde (örneğin titrasyon) alınan cevabın standart sapmasının (SD), kalibrasyon eğrisinin eğimine (S) oranının 3.3 katını LOD değeri olarak kabul etmektedir (54, 58).

Alt Tayin Sınırı (LOQ)

Analitik bir yöntemde analitin, uygun doğruluk ve kesinlikle tayin edilebilecek en düşük derişimdir. LOD değerinde olduğu gibi LOQ da derişim cinsinden ifade edilir ve S/G oranından faydalanılır. Pratik bir kural olarak S/G oranı kullanılıyor ise de LOQ derişimi doğruluk ve kesinlik sınırlarına uygunluk göstermelidir (LOQ derişim değeri düşerse kesinlik de düşecektir; yüksek kesinlik değerinin istendiği yöntemlerde belirtilen LOQ değeri de yükselecektir). S/G oranının 10 olduğu değer LOQ değeridir. Ayrıca gürültünün ölçülemediği miktar tayini yöntemlerinde alınan cevabın standart sapmasının (SD), kalibrasyon eğrisinin eğimine (S) oranının 10 katını LOQ değeri olarak kabul etmektedir (54).

Doğruluk

Bir analitik yöntemin doğruluğu yöntem ile elde edilen ortalama test sonuçlarının analitin gerçek değerine yakınlığı ile tanımlanır. Doğruluk, bilinen derişimde analit içeren numunenin tekrarlanan analizleri ile tespit edilir. Belirlenen aralıkta en az üç derişimde beş ölçüm gereklidir. Doğruluk bağıl hata hesaplanarak değerlendirilir. Doğruluk, LOQ için % 20'den fazla sapma göstermemelidir. Ortalama değer gerçek değer $\pm$ % 15 sınırı içinde olmalıdır. Ortalama değer gerçek değerden sapma oranı da doğruluk ölçütü olarak kabul edilir (57).

Kesinlik

Kesinlik, tekrarlanan uygulamalarda analitin ayrı ölçümlerinin birbirine yakınlığını tanımlar. Kesinlik normal işlem altında bir analitik yöntemin tekrarlanabilirlik derecesinin bir ölçüsüdür (59). Belirlenen aralıkta en az üç derişimde beş ölçüm gereklidir. Her derişim için saptanan kesinlik bağıl standart sapma (BSS) değerinin % 15'ini, LOQ için hesaplanan kesinlik ise BSS değerinin % 20'sini geçmemelidir. (57).

Geri Kazanım

Analitin geri kazanımı, biyolojik matrikse eklenen ve ekstre edilen bir miktar analitin teşhis cevabı ile gerçek derişimdeki saf standarttan elde edilen cevabın karşılaştırılmasıdır. Geri kazanım, çeşitlilik sınırları dahilinde analitik yöntemin ekstraksiyon etkinliğine bağlıdır. Analitin geri kazanımının % 100 olması istenmemekle birlikte, analitin ve iç standardın geri kazanımı kesin, doğru ve verimli olmalıdır. Geri kazanım deneyleri üç farklı derişimde (düşük, orta, yüksek) analitik cevapların, ekstre edilmemiş standartlar (% 100 geri kazanımı temsil eden) ile karşılaştırılması ile yapılmaktadır (57).

Mutlak geri kazanım, matriksten (biyolojik sıvı) geri kazanılan ilaç miktarının ekstre edilmemiş standarda karşı yüzde oranıdır. Bağıl geri kazanım ise matriksten geri kazanılan ilaç miktarının yine aynı matrikse eklenerek ekstre edilen standarda karşı yüzde oranıdır.

Kararlılık

İlacın biyolojik bir sıvıdaki kararlılığı ilacın kimyasal özelliklerinin, saklama koşullarının ve matriksin bir fonksiyonudur. Bir analitin belirli bir matrikste ve ambalaj sisteminde kararlılığı sadece o ambalaj sistemi ve o matriks için geçerlidir; diğer matriksler ve ambalaj sistemleri için tahmin yürütülemez. Kararlılık prosedürleri numune toplama ve ambalajlama, uzun süreli (belirlenen saklama sıcaklığında dondurulan) ve kısa süreli (banko, oda sıcaklığında) saklanması ve sonrasında dondurma-çözme döngüsü ve analitik proses süresince analitin kararlılığını ölçer. Prosedür ayrıca analitin stok çözeltideki kararlılığının değerlendirilmesini de içermektedir.

Tüm kararlılık çalışmalarında taze stok çözeltisinden, analit içermeyen, girişim yapmayan uygun biyolojik matriks kullanılarak hazırlanan bir takım standart numune kullanılır. Kararlılık değerlendirmesinde kullanılan analitin stok çözeltisi uygun çözücüde bilinen derişimde hazırlanmalıdır.

Dondurma-çözme kararlılığı, analitin 3 dondurma-çözme döngüsü sonunda tespit edilmelidir. En az üçer düşük ve yüksek derişimde analit -20 °C’de veya belirlenen saklama sıcaklığında 24 saat boyunca tutulmalıdır ve oda sıcaklığında müdahalesiz çözünmelidir. Örnekler tamamen çözündüğünde tekrar aynı koşullarda 12-24 saat süresince dondurulmalıdır. Dondurma çözme döngüsü 2 kez daha tekrarlanmalı, üçüncü günde analiz edilmelidir. Eğer analit -20 °C’de kararlı değilse, kararlılık numunesi 3 dondurma-çözme süresince -70 °C’ de dondurulmalıdır ve tekrar kararlılık için analizi yapılmalıdır (54).

Kısa süreli kararlılık deneyi için düşük ve yüksek derişimli üçer analit oda sıcaklığında çözüldükten sonra bu sıcaklıkta 4-24 saat (çalışmada numunelerin oda sıcaklığında bekletilen tahmini süresine bağlı olarak) tutulmalı ve analiz edilmelidir.

Uzun süreli kararlılık değerlendirilmesi, ilk numunenin alınması ile son numunenin analizi arasında geçen saklama süresini aşmalıdır. Uzun süreli kararlılık en az üçer düşük ve yüksek derişimli analitin çalışma örnekleri ile aynı koşullar altında saklanması ile saptanmalıdır. Örneklerin hacmi üç ayrı analize yetecek miktarda olmalıdır.

Stok çözelti kararlılığı için standartların stok çözeltilerinin oda sıcaklığında en az altı saat takip edilmesi gerekir. Eğer stok çözeltileri belirli bir süre

buzdolabında bekletiliyor ya da donduruluyorsa bu süre kaydedilmelidir. İstenen saklama süresinin tamamlanmasının ardından, taze hazırlanmış çözeltinin aletsel cevabı ile karşılaştırılarak kararlılık test edilmelidir.

Oto örnekleyici kararlılığı, işlenmiş örneklerin oto örnekleyicide geçirdiği süre de göz önüne alınarak tanımlanmalıdır. İlaç ve iç standardın kararlılığı, validasyon numunelerinde beklenen çalışma süresince aynı koşullar altında orijinal kalibrasyon standardındaki derişimler baz alınarak değerlendirilmelidir (54).

Tutarlılık

USP'ye göre tutarlılık değişken koşullar altında elde edilen sonuçların bağıl standart sapmalarının yinelenebilirlik derecesidir. Bu koşullar analizci, alet, reaktif ve deney periyotlarıdır.

Sağlamlık

Sağlamlık değerlendirilmesi, daha çok yöntem geliştirme safhasında göz önünde bulundurulur ve çalışmada kullanılan prosedüre bağlıdır. Bu durum yöntem parametrelerindeki bilinen varyasyonlara göre analizin güvenilirliğini gösterir. Analitik koşullardaki ölçümler varyasyonlara duyarlı ise, analitik koşullar uygun şekilde kontrol edilmeli veya işlemlerde önlemler yer almalıdır. Sağlamlığın değerlendirilmesinin amacı sistem uygunluk parametrelerinin analitik yöntemin her uygulamasında valide olduğunun kanıtlanmasıdır. Tipik varyasyon örnekleri, çözelti kararlılığı ve ekstraksiyon süresi, hareketli faz bileşimi, pH etkisidir (57).

2.10. Kemometri

Kemometri kimyasal analizlerde, kimyasal verilerden gerçek bilginin ekstraksiyonu veya saklı bilgilerin açığa çıkarılmasına olanak tanıyan güçlü bir araçtır. Kemometrinin temel uygulama alanlarında biri analitik kimyadır.

Tanımlayıcı ve açıklayıcı istatistik, sinyal işleme, deneysel tasarım, kalibrasyon, optimizasyon, yapı tanıma, sınıflandırma, yapay akıl yöntemleri, resim işleme, bilgi ve sistem kuramı gibi kavram ve uygulamaları kemometrinin konularını oluşturmaktadır.

Kemometri disipliniinde temel, üzerinde vurgu yapılan istatistik-matematik yöntemler üzerine kurulmuştur. Rastgele (düzensiz) veriler, sırayla istatistiğin tanımlayıcı ve açıklayıcı yöntemleriyle karakterize ve test edilirler. Analitik verilerin işlenmesinde, istatistik ve uygulamalı matematik kemometrinin temel araçlarıdır (60-62).

2.10.1. Plackett-Burman Tasarımı

Geliştirilen yöntemin validasyon aşamasında sağlamlık-tutarlılık parametresi incelenirken Plackett-Burman tasarım tekniği kullanılmıştır.

İki seviyeli bir full faktöriyel tasarım tekniği olan Plackett-Burman tasarımında deney sayısı faktör sayısına göre şekillenir. Bu tasarım tekniğinde faktörler arası etkileşimler önemli değildir. Çok fazla miktarda ana etki olduğunda ve etkiler arasında etkileşimler ihmal edildiğinde çok ekonomik bir tasarım tekniğidir. Tablo 2.5 ‘te 11 faktöre ait Plackett-Burman tasarım matrisi gösterilmiştir (63).

Tablo 2.5. 11 faktöre ait Plackett-Burman tasarım matrisi

[illegible]

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Kimyasal Maddeler

• Azot gazı	Boss
• Asetonitril	Merck
• Amonyum iyodür	Sigma
• Diklorometan	Merck
• 17- α -etinil-4-androsten-17 β -ol-3on (Danzol Metaboliti)	Köln Doping Kontrol Merkezi
• Etil asetat	Riedel
• Epioksandrolon	Köln Doping Kontrol Merkezi
• Etilkloroformat	Merck
• Evista [®] Tablet	Daiichi-Sankyo
• Hekzan	Merck
• İmidazol	Sigma
• Kloroform	Sigma-Aldrich
• Metanol	Sigma-Aldrich
• Metil tersiyer-butil eter	Merck, Lab
• Metil iyodür	Sigma
• Metil Testosteron	Sigma
• N-metil-N-trimetilsilil trifluoroasetamit (MSTFA)	Sigma, Chemfabrik
• N-pentan	Fluka

• N-ter-butildimetilsilil-N-metiltrifluoroasetamit	Sigma
• β -Merkaptoetanol	Fluka
• Oksandrolon	Steraloids
• Piridin	Sigma-Aldrich
• Potasyum karbonat	Sigma-Aldrich
• Potasyum bikarbonat	Sigma-Aldrich
• Raloksifen HCl	Daiichi-Sankyo
• Sodyum Hidroksit	Sigma
• Trimetilklorosilan (TMCS)	Sigma
• Trimetilsililimidazol (TMSI)	Sigma
• Yüksek saflıkta Helyum gazı (% 99,9)	Boss

3.2. Cihazlar

• Gaz kromatografisi	6890N Agilent
• Kütle spektrometresi	5973 Agilent
• UV/GB spektrofotometre	8453 Agilent
• Hassas Terazî	Sartorius
• Isı bloğu	Techne
• Milli -Q su cihazı	Millipore
• Otomatik mikropipet (5-50, 50-200, 100-1000 μ L)	Rainin prizma
• pH metre	Beckman

- Santrifüj Eppendorf
- Vortex Heidolph

3.3. Cam ve Sarf Malzemeleri

- Balon joje (5-100 mL) İldam
- Deney tüpü İldam
- GC Kolon % 5 Fenilpolisiloksan – %95 metilpolisiloksan (10 m x 0,2 mm, 0,33 μ m) Agilent
- İnsert Machery-Nagel
- Küvet (1×1×3 cm, kuvarz) Agilent
- Vial Machery-Nagel
- Vial kapağı Machery-Nagel

3.4. Çözeltiler

MSTFA/ β -merkaptotanol/ NH_4I stok çözeltisi: 100 mg NH_4I tartılıp, üzerine 5 mL MSTFA eklenmiş ve bu karıştırılarak amonyum iyodür'ün çözülmesi sağlanmıştır. Çözünme sağlanamazsa karışım 80°C ısı bloğunda amonyum iyodür çözünene kadar bekletilmiştir. Daha sonra karışım üzerine 300 μL β -merkaptotanol eklenmiştir.

MSTFA/ β -merkaptotanol/ NH_4I çalışma çözeltisi: 556 μL MSTFA/ β -merkaptotanol/ NH_4I stok çözeltisinden alınarak 5 mL MSTFA ile seyreltilmiştir.

MSTFA/İmidazol çalışma çözeltisi: 0.2 gr imidazol tartılarak üzerine 5 mL MSTFA eklenmiş ve karıştırılarak çözülmesi sağlanmıştır.

pH 9.0 tampon çözeltisi: 5 gr potasyum karbonat ve 5 gr potasyum bikarbonat tartılarak 50 mL balon jojeye alınmış bir miktar deiyonize su ile karışımın

çözülmesi sağlanmış ve 50 mL'ye tamamlanmıştır. Tamponun pH'sı sodyum hidroksit ile ayarlanmıştır (64,65).

pH 5.0 asetat tampon çözeltisi: 10 g susuz sodyum asetatın 250 mL'lik balon joje içerisinde bir miktar deiyonize su ile çözünmesi sağlanmış, üzerine 5.5 mL glasiyel asetik asit eklenerek karıştırılmıştır ve deiyonize su ile tamamlanmıştır. Tamponun pH'sı glasiyel asetik asit ile ayarlanmıştır (64,65).

Raloksifen HCl stok çözeltisi (1000 µg mL⁻¹): 10.77 mg Raloksifen HCl tartılarak 10 mL balon jojeye alınmış bir miktar metanol ile ultrasonik banyoda bekletilmiş, çözülme tamamlandıktan sonra metanol ile gerekli hacme tamamlanmıştır. Raloksifen HCl çalışma çözeltileri bu stok çözeltilerden metanol ile seyreltme yapılarak hazırlanmıştır.

Metil testosteron (IS) stok çözeltisi (1000 µg mL⁻¹): 10 mg metiltestosteron tartılarak 10 mL balon joje ye alınmış bir miktar metanol ile ultrasonik banyoda bekletilmiş, çözülme tamamlandıktan sonra metanol ile gerekli hacme tamamlanmıştır. Metiltestosteron çalışma çözeltileri bu stok çözeltilerden metanol ile seyreltme yapılarak hazırlanmıştır.

3.4.1. Sentetik Preparatların Hazırlanması

Bir tablete eşdeğer miktarda; 60 mg raloksifen HCl, 185 mg laktoz, 9 mg titanyum dioksit, 1 mg indigo karmin tartılarak 100 mL'lik balon jojeye alınmış ve bir miktar metanolde ultrasonik banyoda çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra metanol ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Plasebo çözeltisi ise raloksifen HCl dışındaki eksipiyanların tartılarak 100 mL'lik balon jojede bir miktar metanol eklenip ultrasonik banyoda çözüldükten sonra metanol ile 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlanmıştır (66).

3.4.2. Farmasötik Preparat Çözeltisinin Hazırlanması

Daiichi-Sankyo ilaç firmasının ürünü olan Evista® tablet kullanılmıştır. Her bir tablet 60 mg raloksifen HCl içermektedir. Analiz için 10 tane Evista® tablet tartılıp havanda toz haline getirildikten sonra bir tablete eşdeğer miktarda toz tartılıp

100 mL'lik balon jojeye alınmıştır. Bir miktar metanol eklenerek ultrasonik banyoda 15 dk bekletilerek etken maddenin çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra çözünmeyen yardımcı maddeleri uzaklaştırmak için 0.45 µm nylon membran filtresinden süzülerek metanol ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Bu çözeltilerinden bir miktarı santrifüj tüpüne alınarak 3500 devir/dk'da 20 dak. santrifüj edilmiştir. Santrifüj edildikten sonra berrak çözeltiden otomatik pipetle istenilen miktarda çözelti alınıp uygun seyreltmeler yapılarak analiz edilmiştir.

3.4.3. UV-Spektrofotometrik Yöntem İçin Çözeltiler

Hazırlanan metanolik raloksifen HCl stok çözeltisinden 10 ml'lik balon jojelere 15-150 mg L⁻¹ arasında olacak şekilde uygun miktarlarda alınarak 0.1M NaOH ile tamamlanmıştır (22).

3.5. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi

3.5.1. Türevlendirme Basamağının Optimizasyonu

Deney tüpünün içerisine 30 µg mL⁻¹ düzeyinde raloksifen HCl eklendikten sonra çözücü azot gazı atmosferinde uçurulup, 50 µL türev reaktifi (MTBSTFA, MSTFA, MSTFA/β-merkaptetanol/NH₄I karışımı veya MSTFA/imidazol karışımı) eklenip, maddenin farklı sıcaklıklarda (60, 80°C) ve farklı zaman aralıklarında (20, 30, 60, 120 dk) türevlenmesi sağlanmıştır. Metilleme tepkimesi için; 30 µg mL⁻¹ metanolik raloksifen HCl standardının çözücüsü azot ortamında uçurulup, üzerine susuz potasyum karbonat eklenmiştir. Daha sonra 40 µL metil iyodür eklenip 5 sn vortekslendikten sonra 15 dk 80 W'da mikrodalga fırında bekletilmiştir. Etil kloroformat ile türevlendirmek için ise, 100 µL piridin ve 100 µL etilkloroformat eklenerek karışım 30 sn vortekslenmiştir. Ortamda oluşacak farklı bir türevlendirme ürününü incelemek amacıyla türevlendirme tepkimesinde, türevlendirilmiş standartla beraber türevlendirme reaktifinin enjeksiyonu da yapılmıştır.

3.5.2. Kromatografik Koşulların Optimizasyonu

Raloksifenin GC-MS ile analizinde en uygun kromatografik koşulların belirlenmesi için farklı sıcaklık programları ve akış hızları denenmiştir. Her seferinde bir değişken değiştirilip diğerleri sabit tutulmuştur. Raloksifene ait m/z 578 (temel iyon) iyonunun alanının en yüksek olduğu koşul seçilmiştir.

3.5.3. Ekstraksiyon Basamağının Optimizasyonu

20 ng mL⁻¹ olacak şekilde raloksifen HCl eklenmiş idrar örneklerinin ekstraksiyonu için sıvı-sıvı ekstraksiyon örnek hazırlama işlemleri denenmiştir. Bunun için, 5 mL etil asetat, metil tersiyer-butil eter, pentan ve kloroform çözücüler, raloksifen HCl içeren idrar örneklerinin (5 mL) üzerine eklenmiştir. Ayrıca idrarın ortamı asidik (pH=5.0) veya bazik (pH=9.0) yapıldıktan sonra 5 mL metil tersiyer-butil eter kullanılarak ekstraksiyon işlemi denenmiştir. Bir dakika vorteks işleminden sonra örnekler 3500 rpm de 8 dk santrifüj edilmiştir. Organik faz 40°C'de azot ortamında uçurulmuştur. Ortamdan nemi uzaklaştırmak için tüpler 1 saat desikatörde bekletilmiştir. Kalıntı üzerine 50 µL MSTFA/β-merkaptotanol/NH₄I eklenerek 80°C'de 30 dk türevlendirilmiştir. Mutlak geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.

3.5.4. İç standart Seçimi

Deney tüplerinin her birinin içerisine 30 µg mL⁻¹ düzeyinde raloksifen HCl ve aynı derişimde denenecek iç standart [epioksandrolon, oksandrolon, danazol metaboliti (17-α-etinil-4-androsten-17β-ol-3-on) ve metiltestosteron] eklendikten sonra çözücü azot gazı atmosferinde uçurulup, 50 µL türev reaktifi (MSTFA/β-merkaptotanol/NH₄I) eklenerek maddenin 80°C ve 30 dk türevlenmesi sağlanmıştır.

3.5.5. Validasyon Çalışmaları için Örneklerin Hazırlanması

Validasyon çalışmaları için, ilaç kullanmayan, sağlıklı ve gönüllü insanlardan alınan 5 mL idrara uygun derişimde raloksifen HCl ve 10 µL IS (5 µg mL⁻¹ çözeltiden) eklenerek idrar örnekleri hazırlanmıştır. İdrar örnekleri 750 µL pH 9 karbonat tamponu ile bazik yapıldıktan sonra 5 mL metil tersiyer-butil eter eklenerek 1 dk karıştırılmıştır. Örnekler 3500 rpm de 8 dk santrifüj edildikten sonra, organik

faz 40 °C' de azot ortamında uzaklaştırılmıştır. Ortamdan nemi uzaklaştırmak için tüpler 1 saat desikatörde bekletilmiştir. Kalıntı üzerine 50 µL MSTFA/β-merkaptoetanol/NH₄I türevlendirme reaktifi eklenerek 80 °C' de 30 dk türevlenmesi sağlanmıştır.

Farmasötik preparattan analiz için, istenen derişimde raloksifen HCl ve 10 µL IS (5 µg mL⁻¹ çözeltiden) deney tüpüne eklenmiş ve azot ortamında çözücünün uzaklaşması sağlanmıştır. Ortamdan nemi uzaklaştırmak için 1 saat desikatörde bekletilen tüplerdeki kalıntı üzerine 50 µL MSTFA/β-merkaptoetanol/NH₄I türevlendirme reaktifi eklenerek 80 °C de 30 dk türevlenmesi sağlanmıştır.

3.5.6. Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması

Kalibrasyon eğrisini hazırlamak için 10, 15, 40, 80, 120, 160, 200 ng mL⁻¹ raloksifen HCl ve sabit derişimde (10 ng mL⁻¹) IS (metiltestosteron) içeren 6 şar seri idrar numunesi hazırlanıp Bölüm 3.5.5'de anlatıldığı gibi ekstraksiyon ve türevlendirme işleminden sonra numuneler GC-MS cihazına enjekte edilmiştir. Kalibrasyon eğrisi derişime karşı pik alan oranlarının [Raloksifenin alanı (m/z=578)/ IS alanı (m/z=446)] grafiğe geçirilmesi ile oluşturulmuştur. Deneyler 6 farklı gün tekrarlanmıştır.

Farmasötik preparattan raloksifen analizi için 10, 20, 40, 100, 200, 300, 400 ng raloksifen HCl ve 50 ng IS olacak şekilde 6 şar seri numune hazırlanıp Bölüm 3.5.5'de anlatıldığı gibi türevlendirdikten sonra GC-MS cihazına enjekte edilmiştir. 6 farklı gün analiz tekrarlanarak kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir.

3.6. Analitik Yöntem Validasyonu

3.6.1. Sistem Uygunluk Testleri

Geliştirilen GC-MS yöntemi için sistem uygunluk testleri yapılmıştır. Bu amaçla ayırıcılık (R_s), teorik tabaka sayısı (N), enjeksiyon tekrarlanabilirliği ve pik simetri oranı (PSO) parametreleri incelenmiştir. Bu parametrelerin Tablo 3.1'de verilen FDA kabul kriterleri ile uygunluğuna bakılmıştır (67).

Tablo 3.1. Sistem uygunluk test kriterleri

<i>Parametreler</i>	<i>FDA kabul kriterleri</i>
Enjeksiyon tekrarlanabilirliği	$BSS \leq \% 1, n > 5$
Ayırıcılık (Rs)	$Rs > 2$
Pik simetri oranı*	$PSO \leq 2$
Teorik tabaka sayısı (N)	$N > 2000$

*Pik yüksekliğinin % 10'undaki pik genişlikleri dikkate alınarak hesaplanmıştır

3.6.2. Özgünlük

Yöntemin özgünlüğü 8 farklı boş idrar örnekleri ile 10 ng mL^{-1} düzeyinde raloksifen HCl eklenen idrar örneğinin analizi ile değerlendirilmiştir. Boş idrar örneklerinde aynı alıkonma zamanlarında IS ve raloksifen için bir girişim olup olmadığı araştırılmıştır.

Farmasötik preparattan raloksifen analizi için yöntemin özgünlüğü sentetik preparatın analizi ile test edilmiştir. Bunun için plasebo ve sentetik preparat çözeltileri ayrı ayrı sisteme enjekte edilmiştir. Plasebo ve sentetik preparat çözeltilerinin analizi sonundaki kromatogramlar karşılaştırılmıştır. Sentetik preparattaki yardımcı maddelerin girişim yapıp yapmadığı araştırılmıştır.

Ayrıca standart ekleme yöntemi ile kalibrasyon eğrisi yöntemi karşılaştırılmıştır. Standart ekleme yöntemi için Bölüm 3.4.2'de anlatıldığı gibi hazırlanan farmasötik preparat çözeltisinden doğrusallık sınırları içinde uygun seyreltme yapılarak aynı miktarda bir dizi çözelti hazırlanmıştır. Daha sonra bu çözeltilerden ilkinde yalnızca sabit miktarda IS eklenmiş diğerlerinin üzerine artan miktarlarda raloksifen HCl standardı ve yine sabit miktarda IS eklenerek hazırlanan örneklerin analizi yapılmıştır.

Eklenen raloksifen HCl miktarına karşı Raloksifen ve IS pik alan oranları grafiğe geçirilmiştir. Bölüm 3.5.6'da anlatıldığı gibi yapılan doğrudan kalibrasyon ve standart ekleme kalibrasyon eğrilerinin eğimleri karşılaştırılmıştır.

3.6.3. Doğrusallık

Doğrusallık deneyleri için idrara eklenerek hazırlanan 10, 15, 40, 80, 120, 160, 200 ng mL⁻¹ yedi farklı derişimde raloksifen HCl örnekleri GC-MS cihazında analiz edilmiştir.

Farmasötik preparattan raloksifen analizi için ise 10, 20, 40, 100, 200, 300, 400 ng düzeyindeki raloksifen HCl örnekleri GC-MS cihazında analiz edilmiştir.

Her iki kalibrasyon eğrisinin de kontrolü; raloksifenin derişimine karşı, pik alan oranının [raloksifenin alanı (m/z 578) / IS alanı (m/z 446)] grafiğe geçirilmesi ile oluşturulan kalibrasyon grafikleri değerlendirilmesiyle yapılmıştır. Kalibrasyon eğrilerine ait regresyon denklemleri ve korelasyon katsayıları hesaplanmıştır. Kalibrasyon eğrilerinin doğrusallıktan ayrılış ve katsayılarının önem kontrolüne ait istatistiksel değerlendirmeler yapılmıştır (EK 1). Ayrıca yöntemin doğrusallığının kontrolü için olması gereken derişime karşı kalibrasyon verileri kullanılarak bulunan derişimler grafiğe geçirilmiştir.

3.6.4. Gözlenebilme ve Alt Tayin Sınırı

Analiz yöntemi için alt tayin sınırı (LOQ) ve gözlenebilme sınırı (LOD) değerleri saptanmıştır. Değerlendirme sinyal/gürültü oranına (S/G) göre yapılmıştır. Azalan derişimde hazırlanan raloksifen örnekleri analiz edilmiştir. Değerlendirmede temel pik m/z 578 iyonu esas alınmıştır. LOQ için S/G oranı 10, LOD için S/G oranı 3 olan noktalar belirlendikten sonra LOQ derişimi için BSS değeri hesaplanmıştır.

3.6.5. Doğruluk ve Kesinlik

Doğruluk ve kesinlik değerleri, gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik olmak üzere değerlendirilmiştir.

Raloksifen HCl eklenmiş idrar örnekleri için; idrara üç farklı derişimde (15, 80, 160 ng mL⁻¹) raloksifen HCl ve sabit derişimde IS eklenerek hazırlanan örnekler her gün altı seri halinde ve altı gün boyunca analiz edilmiştir.

Farmasötik preparattan raloksifen analizi için ise üç farklı miktarda (20, 100, 300 ng) raloksifen HCl ve sabit derişimde IS eklenerek hazırlanan örnekler her gün altı seri halinde ve altı gün boyunca analiz edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir. Kesinlik BSS, doğruluk ise BH olarak hesaplanmıştır.

3.6.6. Geri Kazanım

Geri kazanım, bağıl ve mutlak geri kazanım olmak üzere 2 şekilde yapılmıştır. Bağıl geri kazanımda, idrara eklenmiş standart raloksifen HCl ve IS'ın ekstraksiyon ve türevlendirme işleminden sonra elde edilen alan değeri ile, aynı miktar raloksifen HCl ve IS'ın Bölüm 3.5.5'de anlatılan numune hazırlama işlemlerinden santrifüj basamağından sonra eklenip ekstraksiyon işlemi uygulandıktan sonra analize devam edilip, elde edilen raloksifen\ IS pik alan değerlerinin oranı ile elde edilmiştir.

Mutlak geri kazanımda, idrara eklenmiş raloksifen HCl ve IS'ın ekstraksiyon ve türevlendirme işleminden sonra elde edilen alan değeri ile bu defa deney tüplerine yalnızca aynı miktarda raloksifen HCl ve IS eklenip çözücünün azot gazı altında uçurulup ekstraksiyon yapılmadan türevlendirme basamağından sonra GC-MS de analiziyle elde edilen alan raloksifen\ IS pik alan değerlerinin oranı ile elde edilmiştir (68).

Farmasötik preparattan raloksifenin mutlak geri kazanımı için Bölüm 3.4.1'de belirtildiği şekilde hazırlanan sentetik preparat çözeltisinden metanol ile seyreltilerek hazırlanan bağımsız çözeltilerin (n=6) geliştirilen yöntemle tekrarlı analizleri ile geri kazanım (Ek 2) değerleri bulunmuştur.

3.6.7. Kararlılık

Donma-erime döngüsü kararlılığı: Raloksifen HCl içeren idrar örneklerinin donma-erime döngüsü kararlılığı üç döngüde yapılmıştır. Raloksifen HCl örneği üç farklı derişimde üç seri halinde (her derişimde n = 6 olacak şekilde) idrara eklenerek hazırlanmıştır. Bu örnekler 24 saat -80°C'de bekletildikten sonra oda sıcaklığına çıkarılmış ve eriyene kadar bekletilmiştir. Bu işlem üç defa tekrarlanmıştır. Her

döngü sonrasında idrar örnekleri analiz edilmiştir. Analiz sonuçları taze hazırlanmış raloksifen HCl içeren idrar örnekleri ile karşılaştırılmıştır.

Kısa süre kararlılık: Üç farklı derişimde raloksifen HCl içeren idrar örnekleri 24 saat oda sıcaklığında saklanmıştır. Bu örnekler saklama süresi sonunda analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar taze hazırlanmış raloksifen HCl içeren idrar örnekleri ile karşılaştırılmıştır.

Uzun süre kararlılık: Üç farklı derişimde raloksifen HCl içeren idrar örnekleri, 3 ay -80°C de bekletilmiştir. Bu örnekler saklama süresi sonunda analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar taze hazırlanmış raloksifen HCl içeren idrar örnekleri ile karşılaştırılmıştır.

Oto örnekleyicide bekleme kararlılığı: Raloksifen ve IS'ın oto örnekleyicide kararlılığı araştırılmıştır. Bunun için, üç farklı derişimde hazırlanan idrar örnekleri analiz edilmiş ve bu örnekler 24 saat oto örnekleyicide bekledikten sonra tekrar ölçüm yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

Stok çözelti kararlılığı: Buzdolabında ($+4^{\circ}\text{C}$) saklanan raloksifen HCl'e ait stok çözeltisinin kararlılığını saptamak için, 2 aylık (uzun dönem) sürenin başında ve sonunda $1000\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ lik stok çözeltilerden seyreltilerek hazırlanan $25\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ raloksifen HCl içeren çözeltinin analizi yapılmış ve GC-MS'de elde edilen raloksifen ait pik alanları karşılaştırılmıştır.

Kararlılık parametresi % kalan değerleri hesaplanarak değerlendirilmiştir.

3.6.8. Sağlamlık ve Tutarlılık

Geliştirilen GC-MS yönteminin sağlamlık ve tutarlılık çalışmaları birlikte değerlendirilmiştir. Bunun için, Plackett Burman deneysel tasarım tekniği kullanılmıştır. Seçilen beş parametre ve bu parametrelere ait seviyeler Tablo 3.2.'de verilmiştir. Plackett Burman deneysel tasarım tekniğinde deneyler rastgele sıralama ile yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Minitab 16 da değerlendirilmiştir.

Tablo 3.2. Sağlamlık ve tutarlılık için seçilen parametreler ve parametrelere ait seviyeler.

	Faktörler	Düşük (-)	Yüksek (+)
Sağlamlılık	Tampon hacmi [A]	725 µL	775 µL
	Türev süresi [B]	25 dk	35 dk
Tutarlılık	Analizci [C]	Analizci 1	Analizci 2
	Farklı marka eter [D]	Eter 1	Eter 2
	Farklı marka MSTFA [E]	MSTFA1	MSTFA2

3.7. UV/GB Spektrofotometrik Yöntemle (Karşılaştırma Yöntemi) Yapılan Çalışmalar

Karşılaştırma yöntemi olarak kaynaklarda geçen (22) çalışmadaki Metot A yöntemi ile yapılmıştır. Bölüm 3.4.3’de anlatıldığı gibi raloksifen HCl’ün 15, 25, 50, 75, 100, 150 mg L⁻¹ olacak şekilde 0.1M NaOH içindeki çözeltileri hazırlanmıştır. Spektrofotometrede kör çözelti olarak 0.1M NaOH kullanılmıştır. Çözeltilerin UV/GB spektrumları kaydedilmiştir. Çözeltilerin 421 nm de verdiği absorbans, derişime karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Farmasötik preparat numune çözeltileri Bölüm 3.4.2’de anlatıldığı şekilde hazırlanarak 0.1M NaOH içindeki çözeltisinin absorbans değeri ölçülerek kalibrasyon eğrisinden numunedeki raloksifen miktarı hesaplanmıştır.

3.8. İstatistiksel Hesaplamalar

Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) Minitab 16 (16.1.0.0) programı, Eşleştirilmiş iki örnek (WILCOXON) testi ise SPSS (11.5) programı kullanılarak değerlendirilmiştir

4. BULGULAR

Çalışmamızda raloksifenin, GC-MS ile analizi için koşullar optimize edildikten sonra idrardan ve farmasötik preparatlardan raloksifen tayini için validasyon çalışmalarına geçilmiştir.

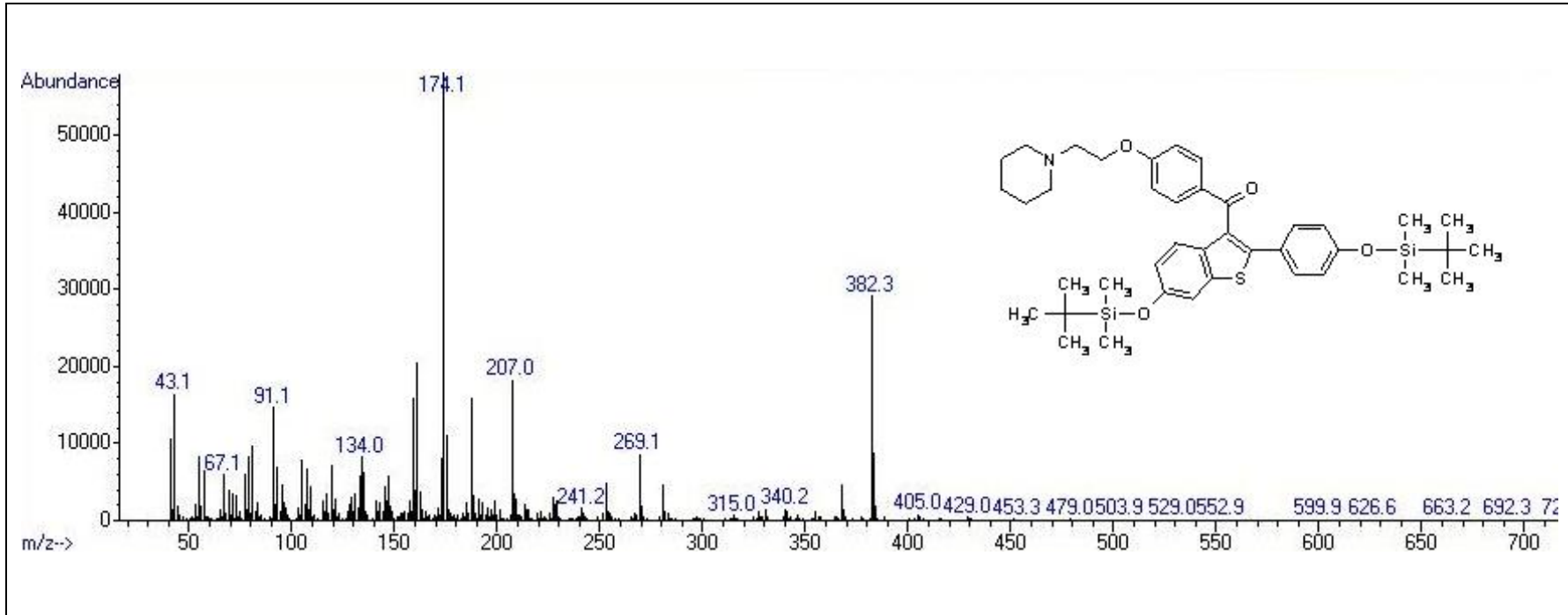
4.1. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi

4.1.1. Türevlendirme Basamağının Optimizasyonu

Raloksifen yapı olarak yüksek sıcaklıkta kararlı olduğu ve uçucu olmadığı için GC-MS ile direk analizi yapılamamaktadır. Bu yüzden raloksifenin GC-MS analizi için türevlendirme basamağı gereklidir. Bu çalışmada sililleme reaksiyonları için MSTFA ve MTBSTFA, ve metilleme reaksiyonu için metiliyodür kullanılmıştır. Ayrıca kaynaklarda, biyolojik materyaller için sililleme reaktiflerine göre daha kolay uygulanabilir ve etkili bir alternatif olarak gösterilen etilkloroformat (ECF) (69, 70) denenmiştir. Metiliyodür ve etilkloroformat ile raloksifenin türevlendirilmesi sağlanamamıştır. Raloksifenin MTBSTFA ile silillenmesi sonucunda Raloksifen-bis-O-terbutildimetilsilil türevi (Şekil 4.1, Tablo 4.1), MSTFA ile silillenmesi sonucunda Raloksifen-tris-O-TMS [TMS:Si(CH₃)₃] türevi elde edilmiştir (Şekil 4.2, Tablo 4.2). Ancak MTBSTFA ile yapılan türevlendirmede farklı sıcaklıklar (60 ve 80°C) ve farklı türevlendirme süreleri (20, 30, 60, 120 dk) taranarak yapılan çalışmalarda tekrarlanabilir sonuçlar elde edilememiştir. Ayrıca MTBSTFA ile yapılan türevlendirmede, MSTFA ile yapılan türevlendirmeye kıyasla daha düşük alanlar elde edilmiştir.

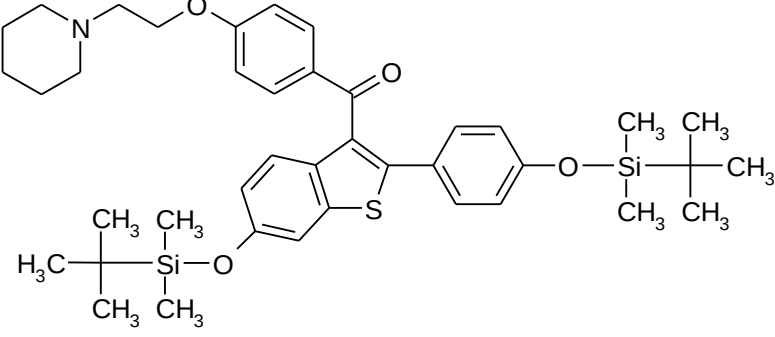
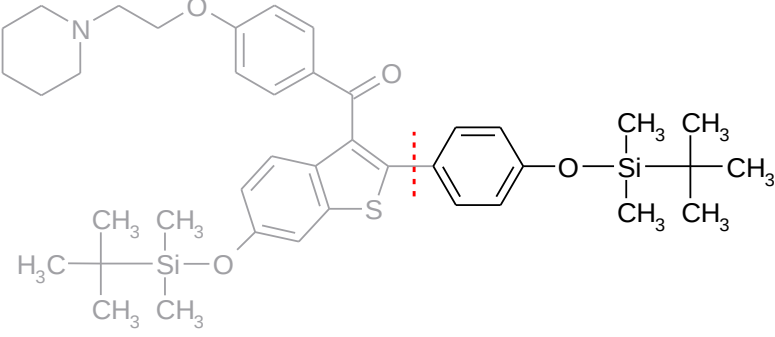
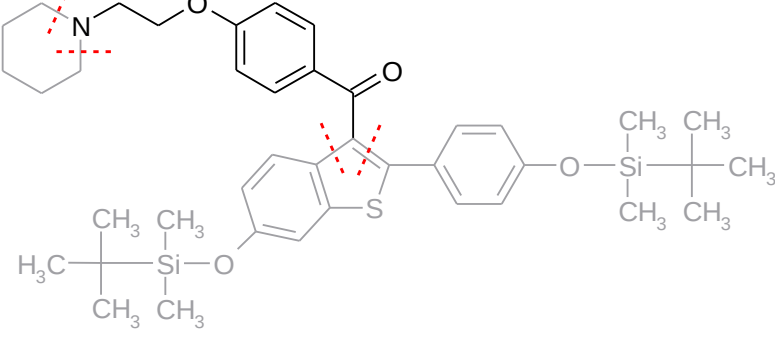
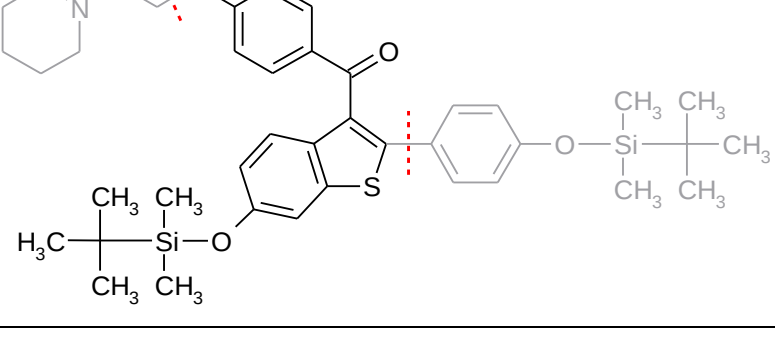
MSTFA ile yapılan çalışmalarda, maksimum sililleme elde edebilmek amacıyla, MSTFA tek başına veya çeşitli katalizörler (β -merkaptetanol/NH₄I, imidazol) ile farklı sıcaklıklar (60 ve 80°C) ve farklı türevlendirme süreleri (20, 30, 60, 120 dk) kullanılarak denemeler yapılmıştır. Sonuçlar karşılaştırılırken raloksifene ait 578 pikinin alanları ve standart sapmaları gözönünde bulundurulmuştur. Şekil 4.3'de görüldüğü gibi, katalizör eklenmesi MSTFA'nın sililleme kapasitesini arttırmıştır. Standart sapmasının düşük olması ve pik alanlarının yüksek olması nedeniyle MSTFA/ β -merkaptetanol/NH₄I türevlendirme ajanı ile yapılan türevlendirme uygun görülmüştür. MSTFA/ β -merkaptetanol/NH₄I kullanılarak

yapılan türevlendirmelerde 80°C’de 30 dk ve 60°C’de 120 dk türevlendirme sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığı WILCOXON ile test edilmiştir. Sonuçlar arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır ($P = 0.144 > 0.05$). Bu nedenle türevlendirme koşulu olarak MSTFA/ β -merkaptotanol/ NH_4I ile 80°C’de 30 dk seçilmiştir.

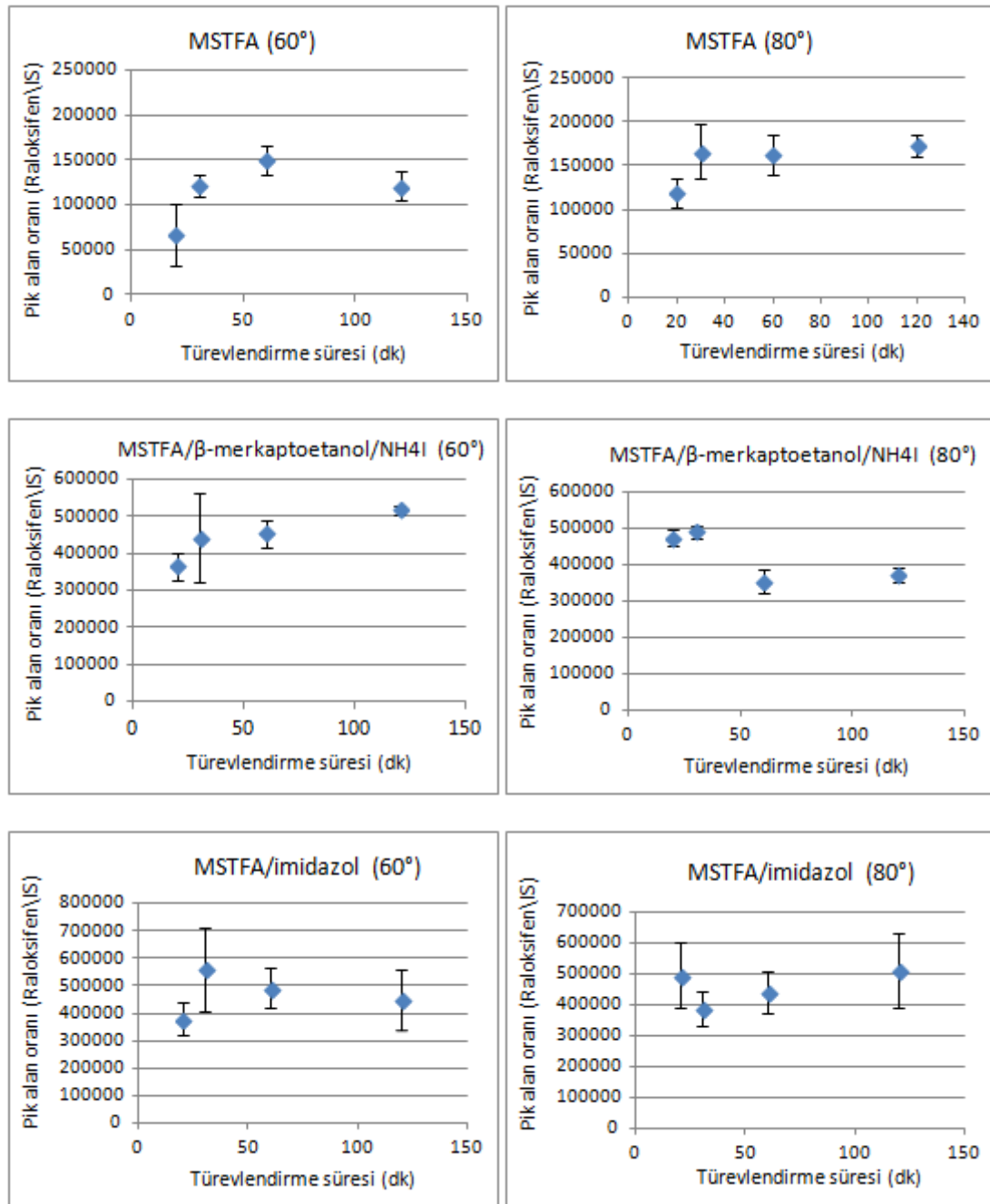


Şekil 4.1. Raloksifenin MTBSTFA ile silillenmesi sonucu elde edilen raloksifen-bis-O-terbutildimetilsilil'e ait kütle spektrumu

Tablo 4.1. Raloksifen-bis-O-terbutildimetilsilil'e ait parçalanma ürünleri *

Formül	Molekül Ağırlığı
	701
	207
	174
	382

*Mass Spec Calculator Pro TM programından yararlanılarak bulunmuştur.



Şekil 4.3. Sililleme reaktifleri ile farklı sıcaklık ve süreler uygulanarak elde edilen Raloksifen-tris OTMS türevine ait alan ortalama-standart sapma grafikleri

4.1.2. Kromatografik Yöntem Koşullarının Optimizasyonu

Analiz için % 5 fenilpolisiloksan % 95 metilpolisiloksan (10 m x 0.25 mm i.ç., 0.25 µm) kılcal kolon kullanılmıştır. Raloksifenin GC-MS ile analizi için en uygun kromatografik koşulların belirlenmesinde, sıcaklık programı ve akış hızının raloksifenin kromatografik davranışı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu sırada bir değişken değiştirilip diğerleri sabit tutulmuştur. Denenen sıcaklık programları Tablo 4.3’de verilmiştir. En uygun kromatografik koşulların belirlenmesinde, oluşturulan her koşul için Tablo 4.4 ‘de gösterilen şekilde sistem uygunluk parametreleri ve raloksifene ait m/z 578 iyonunun alanına bakılmıştır.

Tablo 4.3. Gaz kromatografisi için uygulanan sıcaklık programları

	<i>Fırının başlangıç sıcaklığı (°C)</i>	<i>Fırının son sıcaklığı (°C)</i>	<i>Sıcaklık artış oranı (°C dk⁻¹)</i>	<i>Gaz akış hızı (mL dk⁻¹)</i>
Koşul 1	200	310	25	1.5
Koşul 2	200	310	15	1.5
Koşul 3	200	310	20	1.5
Koşul 4	200	310	30	1.5
Koşul 5	160	310	25	1.5
Koşul 6	180	310	25	1.5
Koşul 7	220	310	25	1.5
Koşul 8	200	290	25	1.5
Koşul 9	200	300	25	1.5
Koşul 10	200	315	25	1.5
Koşul 11	200	310	25	1.0
Koşul 12	200	310	25	2.0
Koşul 13	200	310	25	2.5

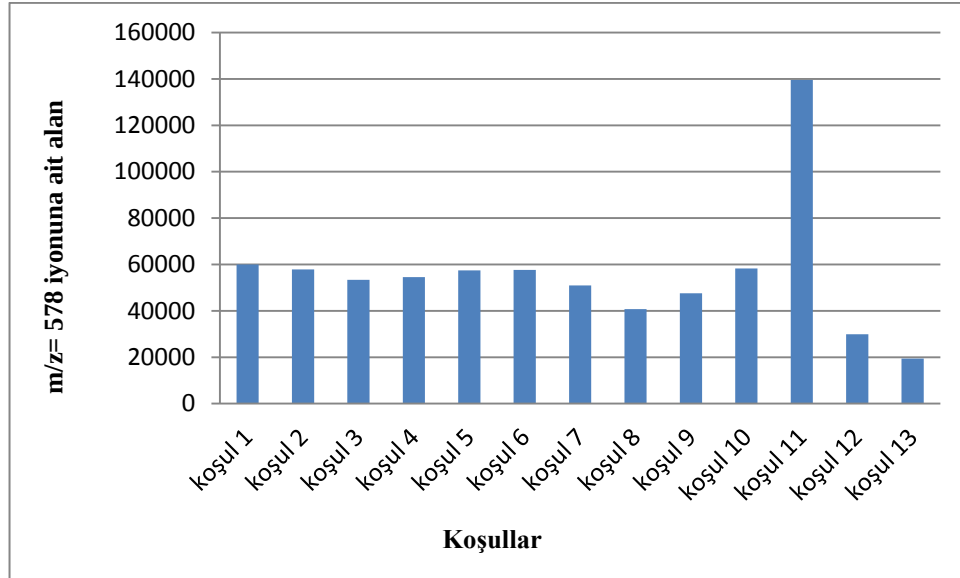
Denenen her koşul için raloksifene ait m/z 578 iyonunun alanı, alıkonma zamanı (t_R), pik ayırıcılığı (R_s), teorik tabaka sayısı (N) ve pik simetri oranına (PSO)

bakılmıştır. Sonuçta pik ayırcılığı (R_s) > 2 , pik simetri oranı ≤ 2 , teorik tabaka sayısı > 2000 şartlarına tüm koşullar uyum sağlamaktadır (Bkz. Tablo 3.1). Bu yüzden Şekil 4.4'e göre, raloksifene ait m/z 578 iyonunun alanına bakılarak, alanı en fazla olan koşul 11 deki (200°C/ 25°C dk⁻¹/ 310°C sıcaklık programı ile akış hızı sabit 1.0 mL dk⁻¹) seçilmiştir.

Tablo 4.4. Denenen koşullarda sistem uygunluk parametreleri

	$A(578)$	t_R (Raloksifen)	t_R (IS)	R_s	N	PSO^*
Koşul 1	59989	6.174	3.332	38.405	60989	1.6
Koşul 2	57852	8.441	4.578	45.447	114001	1.5
Koşul 3	53413	7.044	3.843	37.659	65610	1.3
Koşul 4	54567	5.658	2.984	33.425	35570	1.4
Koşul 5	57469	7.681	4.906	34.688	65553	1.4
Koşul 6	57684	7.005	4.115	30.421	40057	1.8
Koşul 7	50931	5.416	2.618	29.453	23945	1.9
Koşul 8	40772	8.349	3.346	38.485	23043	1.3
Koşul 9	47562	6.979	3.345	36.340	30442	1.5
Koşul 10	58281	5.963	3.344	29.100	39508	1.7
Koşul 11	139571	6.785	3.586	37.635	51151	1.4
Koşul 12	29947	5.833	3.171	33.275	37804	1.6
Koşul 13	19450	5.568	3.033	25.350	25308	1.7

*Pik yüksekliğinin % 10'undaki pik genişlikleri dikkate alınarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.4. GC-MS kromatografik koşulların karşılaştırma grafiği

4.1.3. Ekstraksiyon Basamağının Optimizasyonu

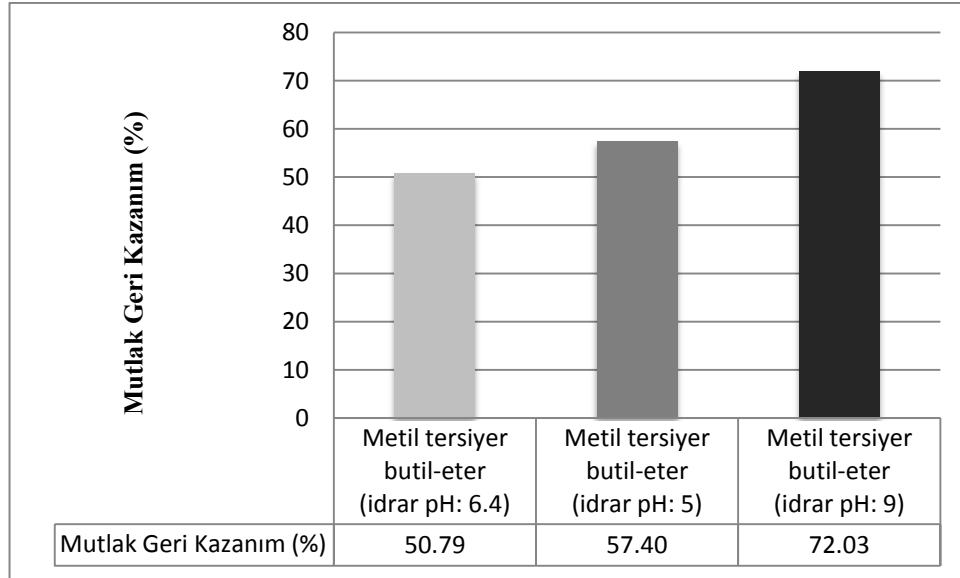
Sıvı-sıvı ekstraksiyonu için uygun organik faz araştırılmıştır. Bunun için etil asetat, metil tersiyer-bütil eter, pentan ve kloroform denenmiştir. Sonuçlar değerlendirilirken Tablo 4.5’ de verilen % geri kazanım değerleri karşılaştırılmıştır.

Tablo 4.5. Çeşitli organik çözücülerin kullanılmasıyla elde edilen % geri kazanım değerleri (20 ng mL⁻¹ Raloksifen HCl için)

<i>Organik Çözücü</i>	<i>% Mutlak Geri Kazanım</i>
Metil tersiyer-bütil eter	% 50.79
Etil asetat	% 40.62
Kloroform	% 16.34
Pentan	-

Geri kazanımı en yüksek olan metil tersiyer-bütil eter uygun çözücü olarak seçilmiştir. Bu basamaktan sonra eterin geri kazanımını arttırmak için idrarın pH değerinin asidik ve bazik olmasını sağlayacak tamponlar denenmiştir. Sonuçlar

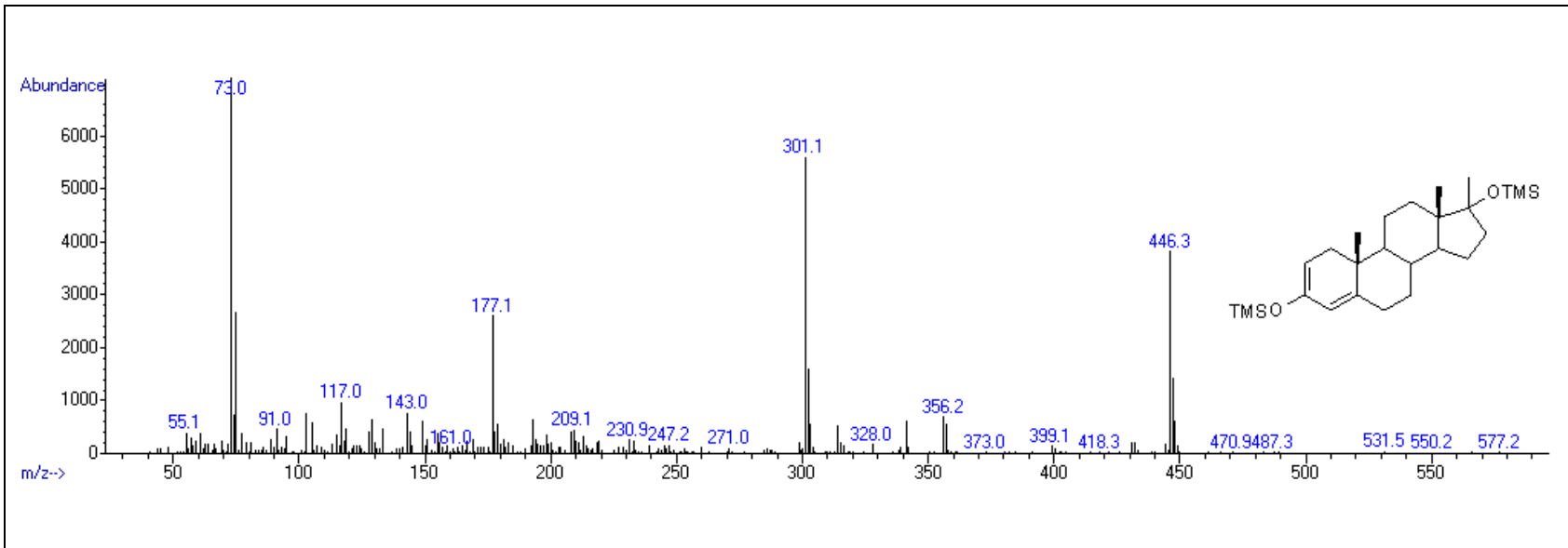
mutlak geri kazanım değerleri göz önünde bulundurularak Şekil 4.5 te verilmiştir. İdrarın pH'sı 9 yapıldıktan sonra metil tersiyer-bütil eterle yapılan ekstraksiyon sonucunda raloksifenin geri kazanım değerinin en yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ekstraksiyon için bu koşullar uygun görülmüştür.



Şekil 4.5. Raloksifenin farklı pH'larda metil tersiyer-bütil eter ile ekstraksiyonunda mutlak geri kazanım değerleri

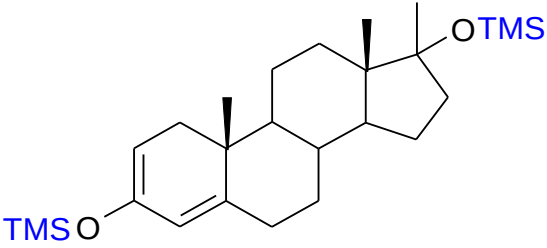
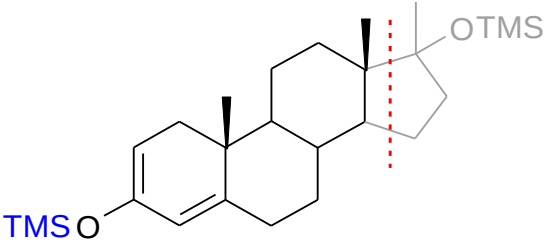
4.1.4. İç Standart Seçimi

Raloksifenin GC-MS yöntemiyle tayininde kullanılacak iç standart seçimi için epioksandrolon, oksandrolon, danazol metaboliti (17- α -etinil-4-androsten-17 β -ol-3on) ve metiltestosteron denenmiş ve bu maddelerin uygulanan kromatografik koşullarda alıkonma zamanları sırasıyla 3.07, 3.40, 3.18 ve 3.58 dk olarak tespit edilmiştir. Alıkonma zamanı raloksifene en yakın olan metiltestosteron IS olarak seçilmiştir. Seçilen IS için Raloksifenin türevlendirme şartlarında elde edilen BSS değeri % 1.94 olarak bulunmuştur. Metiltestosteronun geri kazanımına bakılmış ve % 93,7 bulunmuştur. Şekil 4.6'da metiltestosteron bis-OTMS türevine ait kütle spektrumu ve Tablo 4.6'da parçalanma ürünleri (71) verilmiştir.



Şekil 4.6. Metiltestosteron'un (IS) silillenmesi sonucu elde edilen metiltestosteron bis-OTMS ait kütle spektrumu

Tablo 4.6. Metiltestosteron bis-OTMS'ye ait parçalanma ürünleri

Formül	Molekül Ağırlığı
	446
	301

4.2. Raloksifenin İdrardan Analizi İçin Yöntem Validasyonu

Kromatografik yöntem ve sıvı-sıvı ekstraksiyon koşulları optimize edildikten sonra yöntemin validasyon çalışmaları biyolojik materyalden raloksifen miktar tayini için (57) ve farmasötik preparattan raloksifenin miktar tayini ayrı ayrı (59) yapılmıştır.

4.2.1. Sistem Uygunluk Testleri

Sistem uygunluk testleri, raloksifen HCl 30 ng mL⁻¹ standart çözeltisinin on tekrarlı enjeksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Raloksifene ait alıkonma zamanı, enjeksiyon tekrarlanabilirliği, raloksifen-IS pikleri arasındaki ayırıcılık (Rs), teorik tabaka sayısı (N) ve pik simetri oranı (Ps) Tablo 4.7 verilmiştir.

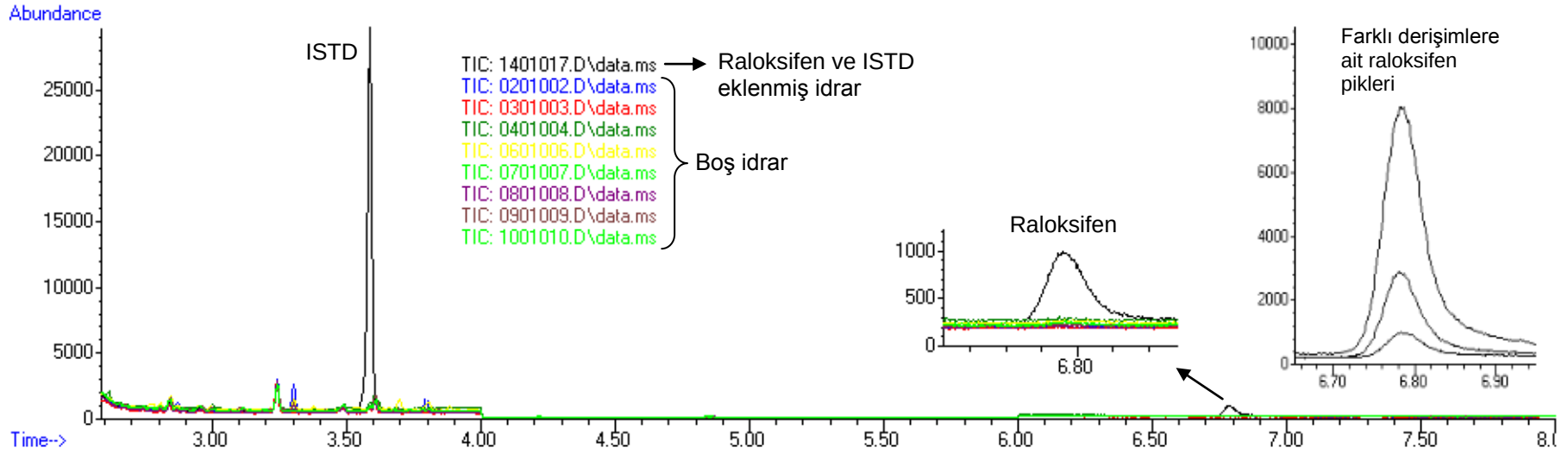
Tablo 4.7.Geliştirilen GC-MS yöntemi için sistem uygunluk parametreleri

Parametreler	Raloksifen	Metiltestosteron (IS)	FDA kabul kriterleri
Alıkonma zamanı (t_R)	6.785	3.586	-
Enjeksiyon tekrarlanabilirliği BSS % (n=10)	0.044	0.014	$BSS \leq \% 1$
R_s	37.635	-	$R_s > 2$
N	51151	82162	$N > 2000$
PSO*	1.4	0.9	$PSO \leq 2$

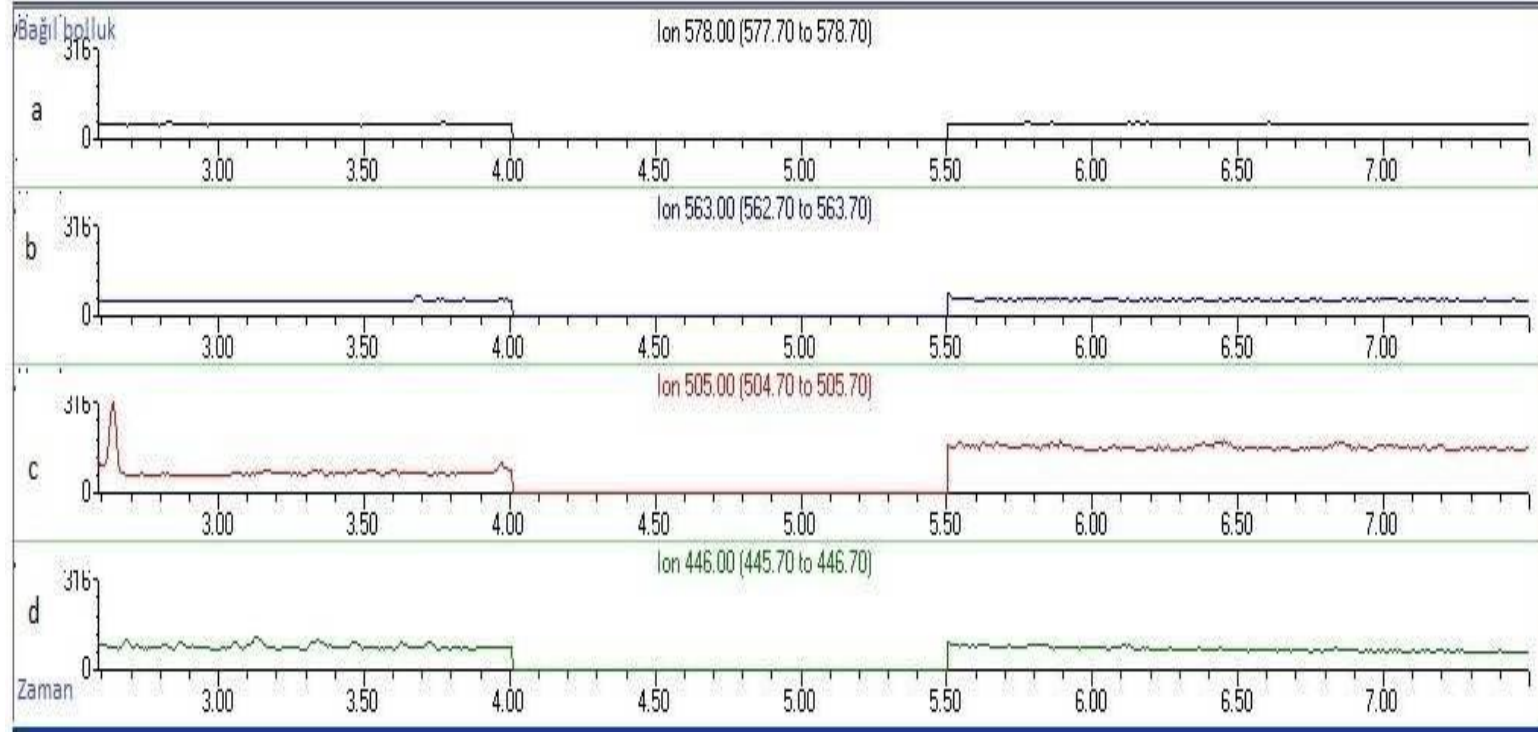
*Pik yüksekliğinin % 10'undaki pik genişlikleri dikkate alınarak hesaplanmıştır.

4.2.2. Özgünlük

Yöntemin özgünlüğü için ilaç kullanmayan 8 farklı gönüllüden alınan idrar örneklerinin ve bir idrar örneğine eklenen 10 ng mL^{-1} düzeyinde raloksifenin kromatogramları karşılaştırılmıştır. Boş idrar örnekleri ile raloksifen HCl ve IS eklenmiş idrar örneğinin TIC kromatogramı (Şekil 4.7) ve boş idrar örneğine ait SIM kromatogramı (Şekil 4.8) değerlendirilmiştir. Elde edilen kromatogramlarda idrarda raloksifen ve IS olarak kullanılan metiltestesteron ile aynı alıkonma zamanına sahip herhangi bir pik gözlenmemiştir.

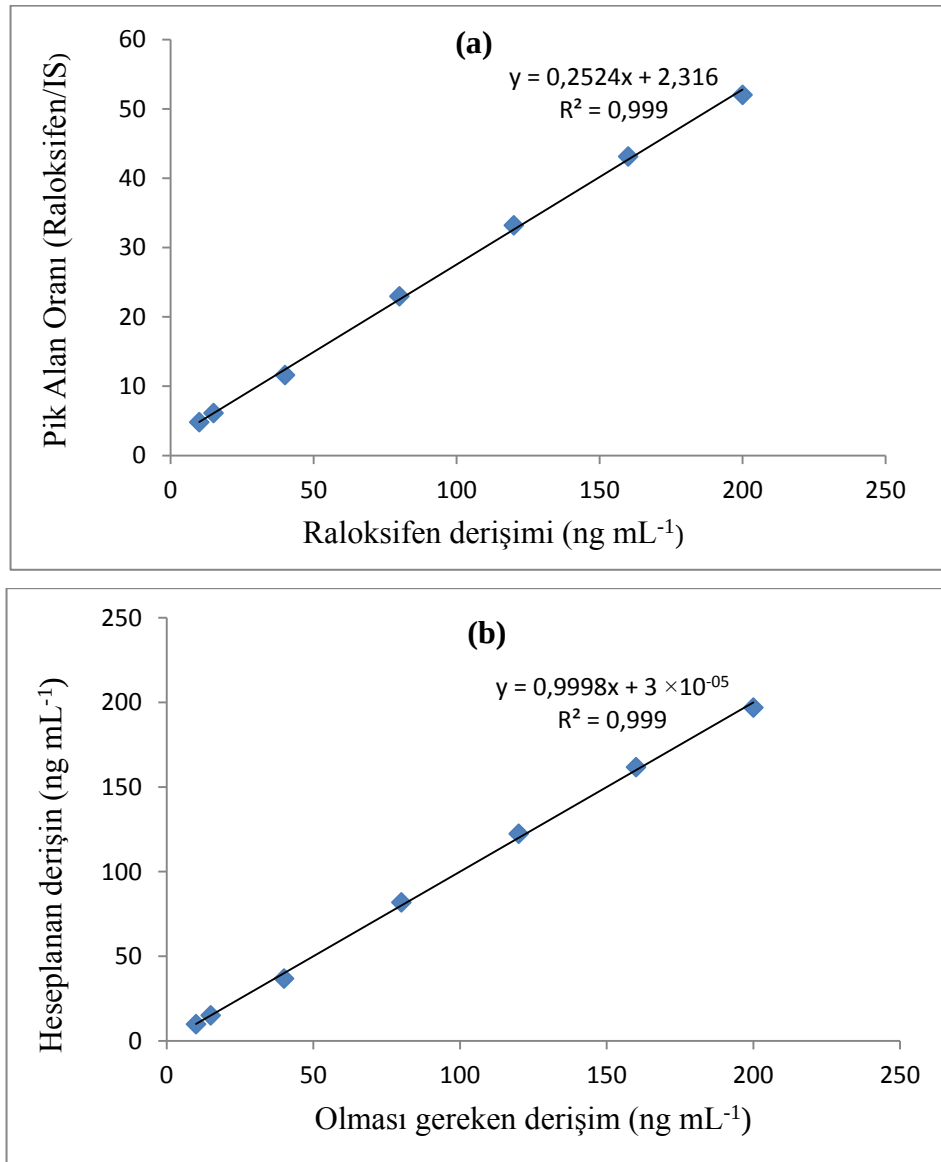


Şekil 4.7. Boş idrar (n=8) ve Raloksifen (10 ng mL^{-1}) ile IS (10 ng mL^{-1}) eklenmiş idrara ait kromatogramlar ve Farklı derişimlere ait ($10, 80, 160 \text{ ng mL}^{-1}$) raloksifen pikleri



4.2.3. Kalibrasyon Eğrileri ve Doğrusallık Aralıkları

İdrara eklenen raloksifen derişimi, raloksifen pik alanlarının IS pik alanı oranına karşı grafiğe geçirildiğinde 10 ile 200 ng mL⁻¹ aralığında doğrusal kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir (Şekil 4.9.a). Ayrıca yöntemin doğrusallığının kontrolü için kalibrasyon eğrisini oluşturan derişimlerde hazırlanan örneklerin analizleri yapıp kalibrasyon eğri denklemi ile sonuçlar hesaplanmış ve olması gereken derişimlere karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.9.b).



Şekil 4.9. İdrardan Raloksifen tayini için GC-MS yöntemi ile elde edilen a) Kalibrasyon eğrisi b) Doğrusallık kontrol grafiği

Kalibrasyon eğrisinin özellikleri Tablo 4.8’de verilmiştir. Kalibrasyon eğrisinin doğrusallıktan ayrılışının önemli olmadığı ve korelasyon katsayılarının raslantısal olmadığı istatistiksel olarak saptanmıştır (Tablo 4.9) (EK 1).

Tablo 4.8. İdrardan raloksifen tayini için GC-MS yöntemi ile çizilen kalibrasyon eğrisinin özellikleri

Regresyon Denklemi	*y = 0.2524x + 2.316
Eğimin Standart Hatası	0.013
Kesişimin Standart Hatası	1.465
Korelasyon Katsayısı (r)	0.9994
Tanımlayıcılık Katsayısı (R²)	0.9990
Doğrusallık Aralığı (ng mL⁻¹)	10-200

*y=ax+b; x ng mL⁻¹ biriminde derişim, y: Pik alan oranı, a:Eğim, b: Kesişim

Tablo 4.9. İdrardan raloksifenin tayini için GC-MS yöntemi ile çizilen kalibrasyon eğrisinin doğrusallıktan ayrılış ve korelasyon katsayısının önem kontrolü

Korelasyon Katsayısı Önem Kontrolü						
n		r	Sr	t _H		t _T
7		0.999	0.014	71.39		2.57
t _H >t _T : Korelasyon katsayısı tesadüfe bağlı bir değer değildir (p<0.05).						
Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü						
RKT	YOAKT	RAKT	RAKO	RKO	F _H	F _T
2071.114	2073.127	2.013	0.403	2071.114	5144.347	6.610
F _H > F _T : Derişim ile pik alan oranı arasındaki ilişki doğrusaldır (p<0.05).						

İstatiksel terimler ve hesaplamalar için Bkz. Ek 1

4.2.4. Gözlenebilme ve Alt Tayin Sınırı

LOD ve LOQ değerleri S/G oranı yöntemine göre yapılmıştır. LOD 8 ng mL⁻¹ LOQ ise 10 ng mL⁻¹ olarak bulunmuştur. LOQ düzeyinde BSS ve BH değerleri % 9.09 ve % 6.01 bulunmuştur (n=6).

4.2.5. Doğruluk

Üç farklı derişimde (15, 80, 160 ng mL⁻¹) raloksifen HCl ve sabit derişimde IS eklenmiş idrar örnekleri aynı günde altı farklı seride hazırlanarak analiz edilmiş (gün içi doğruluk) ve bu işlem altı farklı günde yinelenerek (günler arası doğruluk) analiz edilmiştir. Veriler hazırlanan kalibrasyon eğrilerine göre değerlendirilmiş ve Bağıl hata (BH) değerleri Tablo 4.10'da verilmiştir.

4.2.6. Kesinlik

Üç farklı derişimde (15, 80, 160 ng mL⁻¹) raloksifen HCl ve sabit derişimde IS eklenmiş idrar örnekleri aynı günde altı farklı seride hazırlanarak analiz edilmiş (gün içi kesinlik) ve bu işlem altı farklı günde yinelenerek (günler arası kesinlik) analiz edilmiştir. Veriler hazırlanan kalibrasyon eğrilerine göre değerlendirilmiş ve Bağıl standart sapma (BSS) değerleri Tablo 4.10' da verilmiştir.

Tablo 4.10. Raloksifenin GC-MS yöntemi ile idrardan analizinden elde edilen gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik bulguları (n=6)

	Gün içi			Günler arası		
<i>Raloksifen derişimi</i> (ng mL ⁻¹)	<i>Bulunan Derişim</i> ($\bar{X} \pm SH$)	<i>Doğruluk (BH)</i> %	<i>Kesinlik (BSS)</i> %	<i>Bulunan Derişim</i> ($\bar{X} \pm SH$)	<i>Doğruluk (BH)</i> %	<i>Kesinlik (BSS)</i> %
15	15.13 $\pm$ 0.22	0.86	8.91	15.36 $\pm$ 0.32	2.40	5.13
80	81.86 $\pm$ 0.67	2.33	7.11	80.90 $\pm$ 1.18	1.13	3.56
160	161.76 $\pm$ 0.92	1.10	5.24	161.40 $\pm$ 1.55	0.87	2.36

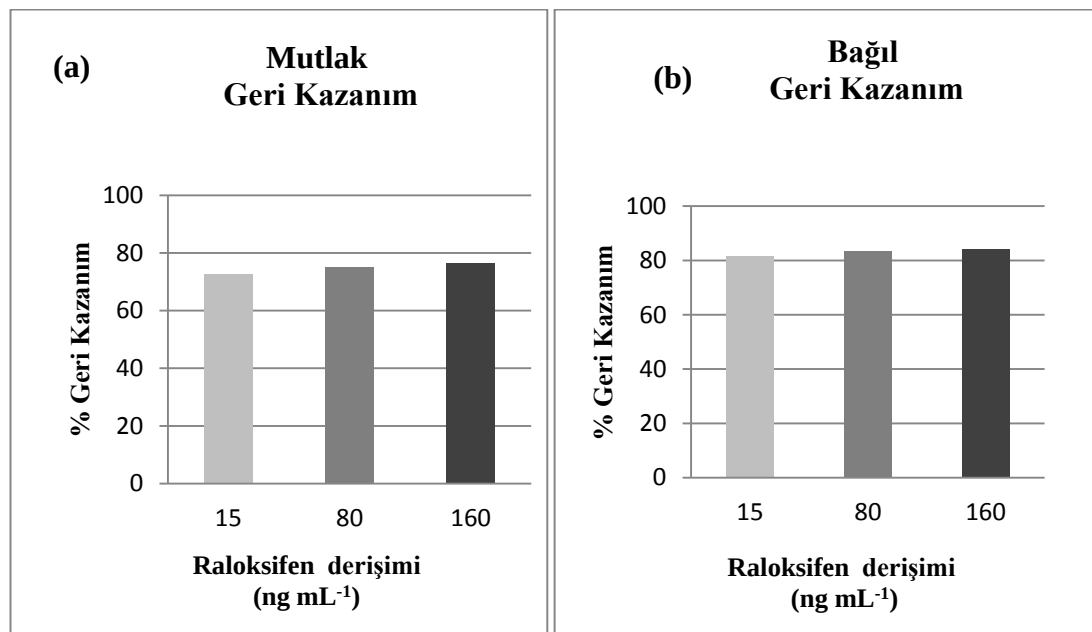
$\bar{X}$: Ortalama değer, SH : Standart hata, BSS: Bağlı standart sapma , BH : Bağlı hata
Hesaplamalar Ek-2’de açıklanmıştır.

4.2.7. Geri Kazanım

Raloksifenin geri kazanımı üç farklı derişimde yapılmıştır. Geri kazanım değerleri mutlak ve bağlı geri kazanım olarak Tablo 4.11’de verilmiştir. Geri kazanım değerlerini karşılaştırmak için Şekil 4.10’da grafikler verilmiştir.

Tablo 4.11. Raloksifenin idrardan ekstraksiyonu sonucu hesaplanan mutlak ve bağıl geri kazanım değerleri (n=6)

İdrardaki raloksifen (ng mL⁻¹)	Mutlak Geri Kazanım (%)	Bağıl Geri Kazanım (%)
15	72.51 ± 0.65 B.S.S: % 1.56	81.67 ± 1.10 B.S.S: % 2.34
80	75.06 ± 0.70 B.S.S: % 1.63	83.23 ± 0.71 B.S.S: % 2.09
160	76.32 ± 0.91 B.S.S: % 2.07	84.19 ± 0.57 B.S.S: % 1.65



Şekil 4.10. Raloksifenin idrardan ekstraksiyonu sonucu a) mutlak ve b) bağıl geri kazanım değerlerine ait grafikler (n=6)

4.2.8. Kararlılık

Raloksifenin kısa süre, uzun süre, oto örnekleyici ve stok çözelti kararlılığı (Tablo 4.12) ve donma-erime döngüsü kararlılığı (Tablo 4.13) sonuçları incelenmiştir.

Tablo 4.12. İdrarda raloksifenin kararlılık sonuçları (n=6)

Bilinen derişim (ng mL ⁻¹)	Kısa süre kararlılığı		Uzun süre kararlılığı		Oto örnekleyici kararlılığı		Stok çözelti kararlılığı (25 ng mL ⁻¹)	
	Kalan (%)	BSS (%)	Kalan (%)	BSS (%)	Kalan (%)	BSS (%)	Kalan (%)	BSS (%)
15	98.6	1.05	97.2	2.02	101.2	1.09	99.4	1.02
80	99.1	1.02	98.5	1.90	103.1	1.87		
160	101.5	0.51	98.9	1.57	102.8	1.04		

Tablo 4.13. İdrarda raloksifenin donma-erime döngüsü kararlılığı (n=6)

Bilinen derişim (ng mL ⁻¹)	Donma- erime döngüsü kararlılığı					
	1. döngü		2. döngü		3. döngü	
	Kalan (%)	BSS (%)	Kalan (%)	BSS (%)	Kalan (%)	BSS (%)
15	89.2	2.10	86.5	1.82	87.8	2.40
80	92.7	2.42	90.5	1.91	88.2	2.07
160	91.6	1.87	91.9	1.80	92.7	1.97

4.2.9. Sağlamlık ve Tutarlılık

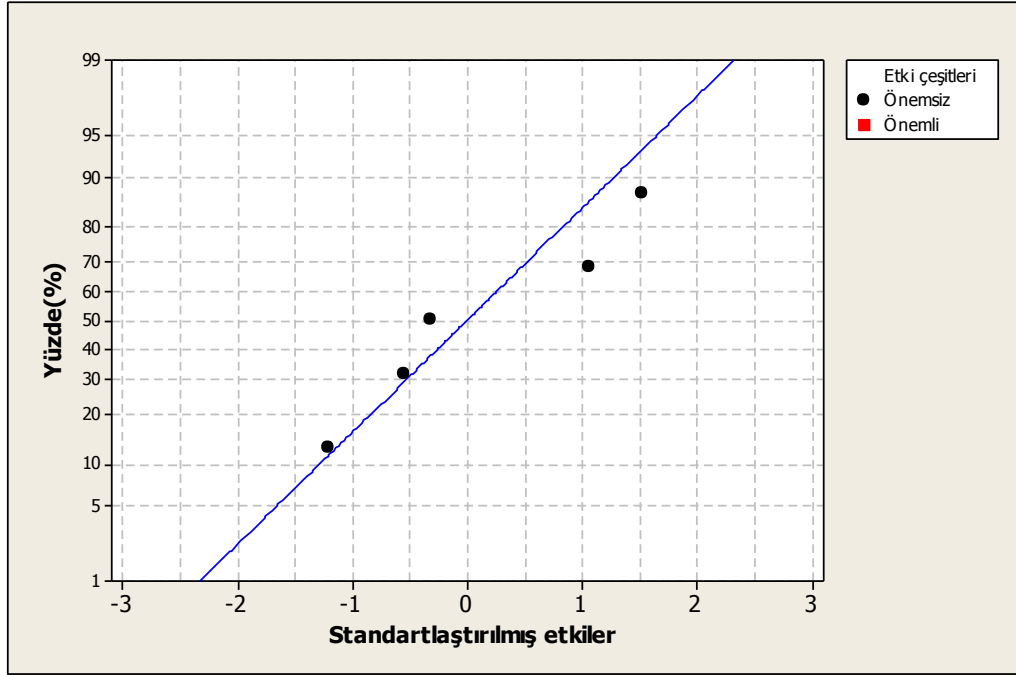
Geliştirilen yöntemin sağlamlık ve tutarlılık parametreleri “Placket-Burman” deneysel tasarımı kullanılarak birlikte incelenmiştir. İncelenen beş parametre (A:Tampon hacmi, B:Türev süresi, C:Analizci, D:Metil tersiyer-butil eter markası, E:MSTFA markası) için oniki deney yapılmıştır. Bu parametrelerin seviyeleri Tablo 3.2 ve tasarlanan deneyler için tasarım matriksi Tablo 4.14 `de verilmiştir. Elde edilen sonuçların, raloksifene ait m/z 578 iyonunun ve IS’a ait m/z 446 iyonunun alanlarına etkisi incelenmiştir. Tablo 4.15 de ANOVA sonuçları ve Şekil 4.11’da standartlaştırılmış etkilerin normal grafiği verilmiştir.

Tablo 4.14. Sağlamlık ve tutarlılık deneyleri için tasarım matrisi ve Raloksifen ile IS için elde edilen alan değerleri

Deney No	A	B	C	D	E	Raloksifen Alanı	IS Alanı
1	+	-	+	-	-	493069	52812
2	+	+	-	+	-	308702	65713
3	-	+	+	-	+	246014	73313
4	+	-	+	+	-	229160	74617
5	+	+	-	+	+	185260	78724
6	+	+	+	-	+	161496	73095
7	-	+	+	+	-	126953	72701
8	-	-	+	+	+	115887	73393
9	-	-	-	+	+	111840	70148
10	+	-	-	-	+	101615	73129
11	-	+	-	-	-	104526	66392
12	-	-	-	-	-	93556	66343

Tablo 4.15. Sağlamlık ve tutarlılık için elde edilen (Raloksifen alan/ IS alan) değerlerine ait ANOVA test sonuçları

Ana etkiler	F	P
A	2.31	0.179
B	0.10	0.763
C	0.14	0.327
D	0.30	0.605
E	1.45	0.273



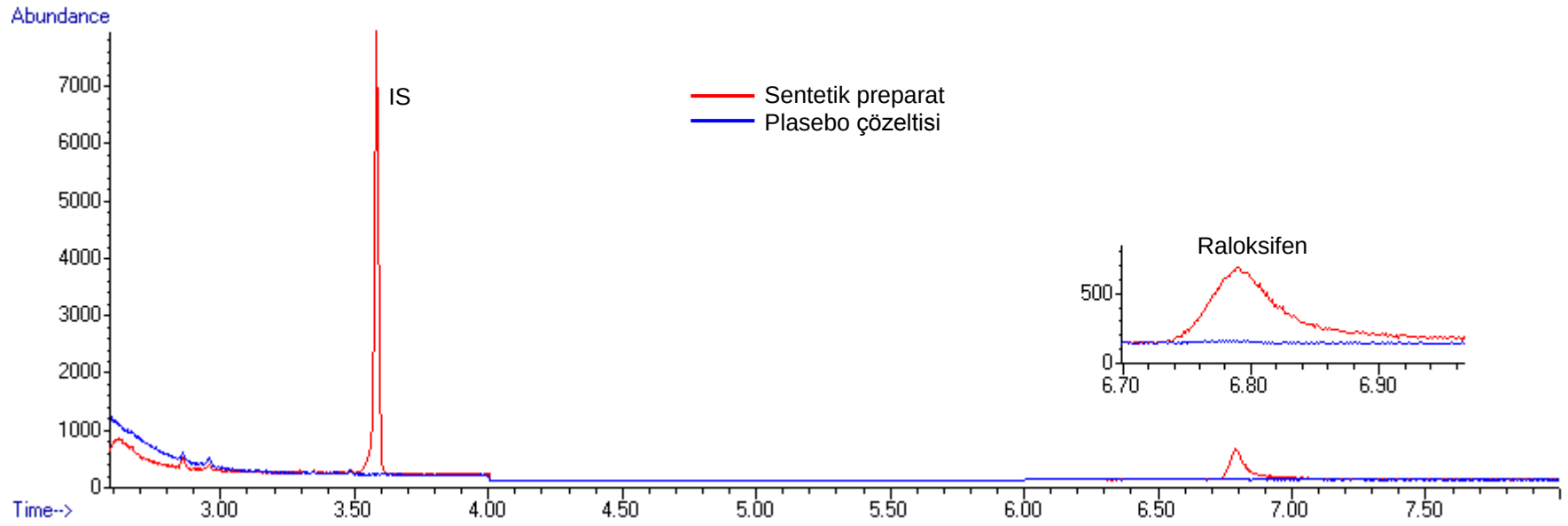
Şekil 4.11. (Raloksifen alan/IS alan) değeri için standartlaştırılmış etkilerin normal grafiği

Tablo 4.15 ve Şekil 4.11 incelendiğinde tampon miktarı ve türevlendirme süresindeki küçük değişikliklerden yöntemin etkilenmediği farklı analizci, farklı marka eter ve farklı marka MSTFA kullanımı gibi parametrelerin Raloksifen alan/IS alan değeri üzerinde etkisinin önemli olmadığı sonucuna varılmıştır.

4.3. Raloksifenin Farmasötik Preparattan Analizi İçin Yöntem Validasyonu

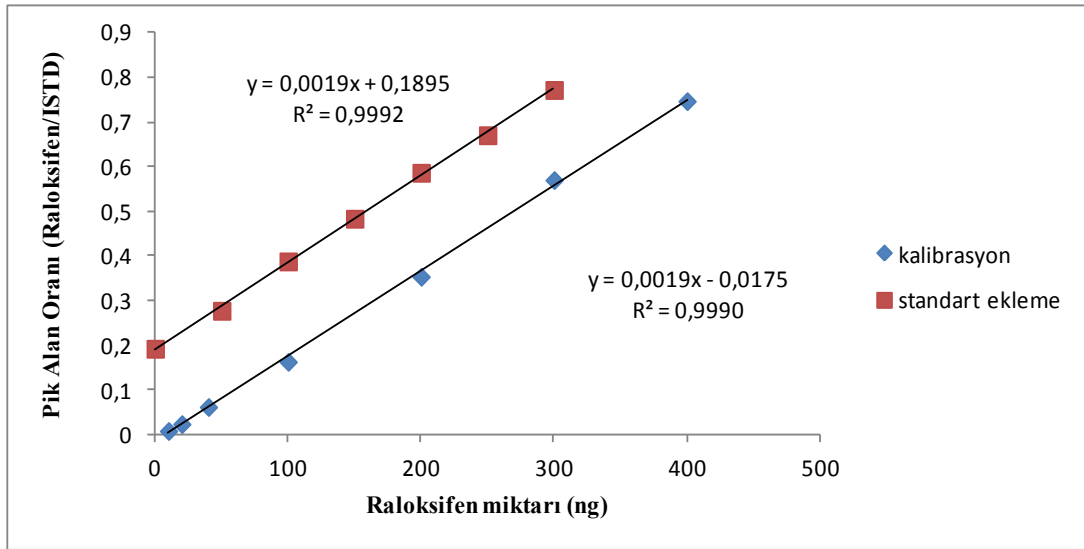
4.3.1. Özgünlük

Yöntemin özgünlüğü sentetik preparat çözeltisi hazırlanarak test edilmiştir. Bunun için plasebo ve plasebo içerisine raloksifen HCl ve IS eklenerek hazırlanan çözeltiler sisteme ayrı ayrı enjekte edilmiştir. Sentetik preparat ve plasebo çözeltilerine ait kromatogramlar Şekil 4.12’de verilmiştir. Plasebo çözeltilerinden elde edilen kromatogramda raloksifen ve IS olarak kullanılan Metiltestosteron ile aynı alıkonma zamanına sahip herhangi bir pik gözlenmemiştir.



Şekil 4.12. Plasebo çözeltisi (raloksifen = 10 ng) ve IS (50 ng) eklenmiş sentetik preparata ait kromatogramlar

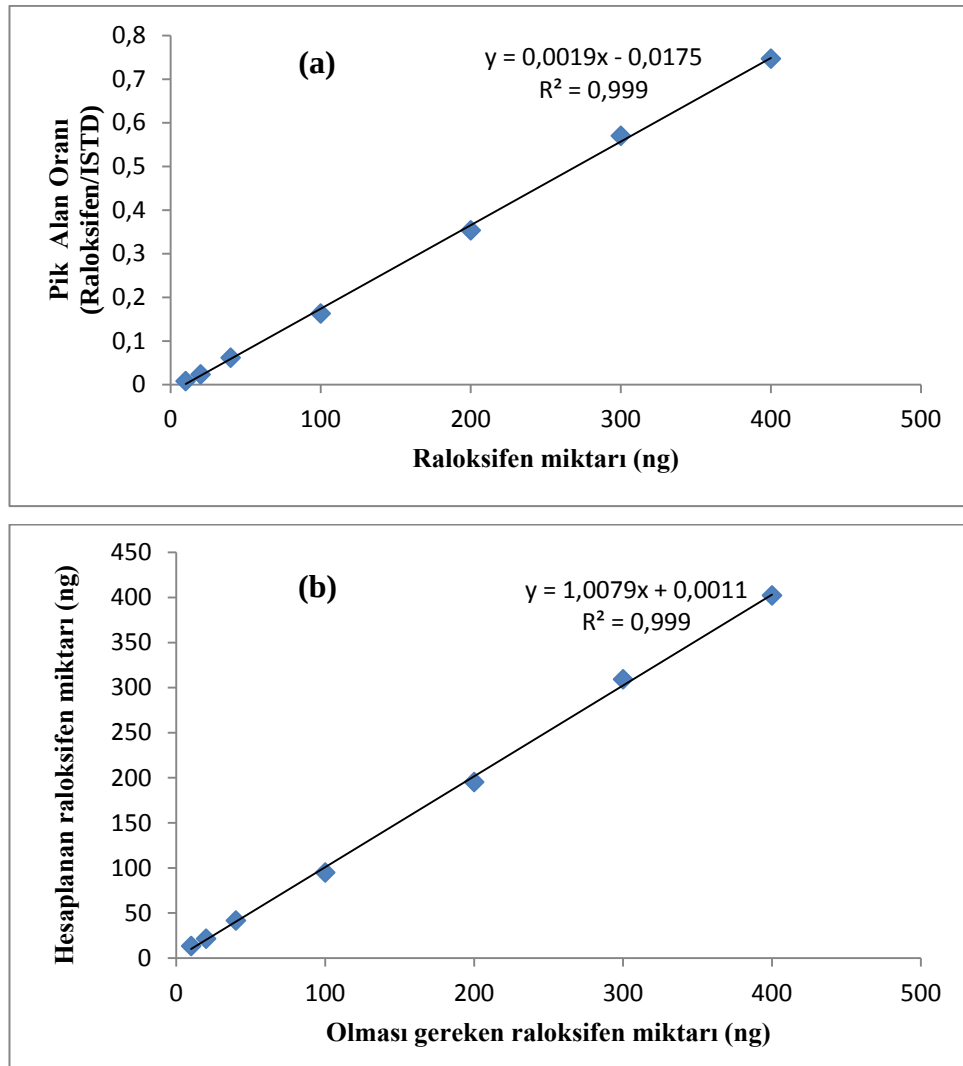
Ayrıca yöntemin özgünlüğünü göstermek amacıyla standart ekleme yöntemi uygulanmış, farmasötik preparata eklenen raloksifen HCl miktarına karşı ölçülen pik alan oranı (Raloksifen/IS) grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. (Şekil 4.13). Doğrudan kalibrasyon ve standart ekleme kalibrasyon eğrilerinin eğimlerinin farklı olmamasından dolayı farmasötik preparat içindeki yardımcı maddelerin girişim yapmadığı sonucuna varılmıştır. Bu durum da yöntemin özgünlüğünün bir göstergesidir.



Şekil 4.13. Raloksifenin GC-MS yöntemiyle tayini için kalibrasyon ve standart ekleme eğrileri

4.3.2. Kalibrasyon Eğrileri ve Doğrusallık Aralıkları

Raloksifen miktarı, raloksifen pik alanının IS alan oranına karşı grafiğe geçirildiğinde 10 ile 400 ng aralığında doğrusal kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir (Şekil 4.14.a). Ayrıca yöntemin doğrusallığının kontrolü için kalibrasyon eğrilerini oluşturan derişimlerde hazırlanan örneklerin analizleri yapıp kalibrasyon eğrisi denklemi ile sonuçlar hesaplanmış ve olması gereken derişimlere karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.14.b).



Şekil 4.14. Farmasötik preparattan raloksifen tayini için GC-MS yöntemi ile elde edilen a) Kalibrasyon eğrisi b) Doğrusallık kontrol grafiği

Kalibrasyon eğrisinin özellikleri Tablo 4.16’da verilmiştir. Kalibrasyon eğrisinin doğrusallıktan ayrılışının önemli olmadığı ve korelasyon katsayılarının rastlantısal olmadığı istatistiksel olarak saptanmıştır (Tablo 4.17).

Tablo 4.16. Farmasötik preparattan raloksifen tayini için GC-MS yöntemi ile çizilen kalibrasyon eğrisinin özellikleri

Regresyon Denklemi	$*y = 0.0019x - 0.00175$
Eğimin Standart Hatası	2.49381×10^{-5}
Kesişimin Standart Hatası	0.00539
Korelasyon Katsayısı (r)	0.9994
Tanımlayıcılık Katsayısı (R²)	0.9990
Doğrusallık Aralığı (ng)	10-400

*y=ax+b; x ng biriminde derişim, y: Pik alan oranı, a:Eğim, b: Kesişim

Tablo 4.17. Farmasötik preparattan raloksifen tayini için GC-MS yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisinin doğrusallıktan ayrılış ve korelasyon katsayısının önem kontrolü

Korelasyon Katsayısı Önem Kontrolü						
n	r	Sr	t _H	t _T		
7	0.9990	0.01414	70.67531	2.57		
t _H >t _T : Korelasyon katsayısı tesadüfe bağlı bir değer değildir (p<0.05).						
Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü						
RKT	YOAKT	RAKT	RAKO	RKO	F _H	F _T
0.50809	0.50859	0.00049	9.86×10^{-05}	0.508093	5152.49990	6.610
F _H > F _T : Derişim ile pik alan oranı arasındaki ilişki doğrusaldır (p<0.05).						

İstatiksel terimler ve hesaplamalar için Bkz. Ek 1

4.3.3. Gözlenebilme ve Alt Tayin Sınırı

LOD ve LOQ değerleri S/G oranı yöntemine göre yapılmıştır. LOD 5 ng LOQ ise 10 ng olarak bulunmuştur. LOQ düzeyinde BSS ve BH değerleri % 9.52 ve % 7.81 bulunmuştur (n=6).

4.3.4. Doğruluk

Üç farklı miktarda (20, 100, 300 ng) raloksifen HCl ve sabit miktarda IS eklenerek hazırlanan örnekler aynı günde altı farklı seride hazırlanarak analiz edilmiş (gün içi doğruluk) ve bu işlem altı farklı günde yinelenerek (günler arası doğruluk) analiz edilmiştir. Veriler hazırlanan kalibrasyon eğrilerine göre değerlendirilmiş ve BH değerleri Tablo 4.18’ de verilmiştir.

4.3.5. Kesinlik

Üç farklı miktarda (20, 100, 300 ng) raloksifen HCl ve sabit miktarda IS eklenerek hazırlanan örnekler aynı günde altı farklı seride hazırlanarak analiz edilmiş (gün içi kesinlik) ve bu işlem altı farklı günde yinelenerek (günler arası kesinlik) analiz edilmiştir. Veriler hazırlanan kalibrasyon eğrilerine göre değerlendirilmiş ve BSS değerleri Tablo 4.18’de verilmiştir.

Tablo 4.18. Raloksifenin GC-MS yöntemi ile farmasötik preparat analizinde elde edilen gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik bulguları

	Gün içi			Günler arası		
Raloksifen miktarı (ng)	Bulunan Derişim ($\bar{X} \pm SH$)	Doğruluk (BH) %	Kesinlik (BSS) %	Bulunan Derişim ($\bar{X} \pm SH$)	Doğruluk (BH) %	Kesinlik (BSS) %
20	19.76 $\pm$ 0.01	1.18	1.61	19.86 $\pm$ 0.11	0.70	1.34
100	98.55 $\pm$ 0.01	1.45	0.87	99.37 $\pm$ 0.48	0.63	1.18
300	297.22 $\pm$ 0.07	0.93	1.53	300.87 $\pm$ 1.22	0.29	0.99

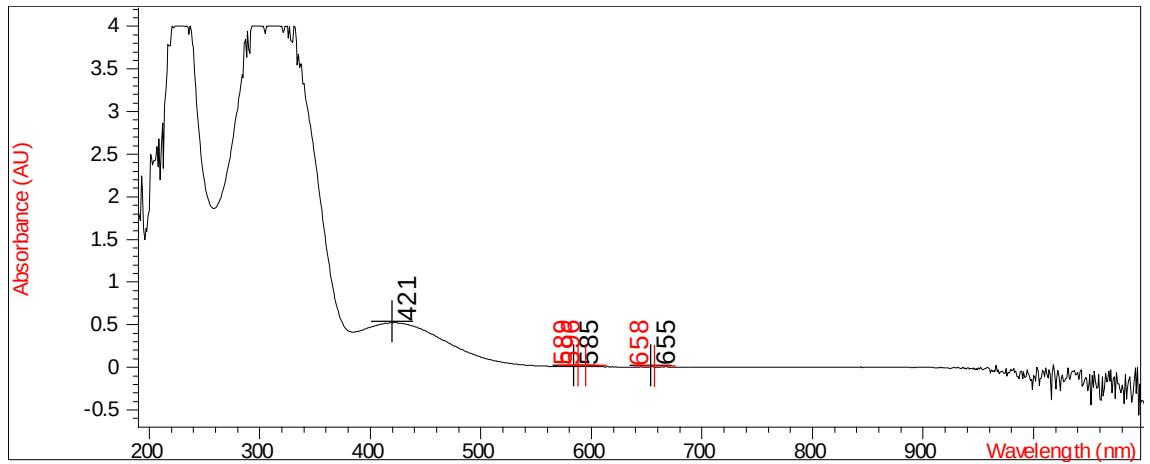
$\bar{X}$: Ortalama değer, SH : Standart hata, BSS: Bağlı standart sapma , BH : Bağlı hata
Hesaplamalar Ek-2’de açıklanmıştır.

4.3.6. Geri kazanım

60 mg Raloksifen HCl ve yardımcı maddeleri içeren sentetik farmasötik preparat çözeltisine ait mutlak geri kazanım değerleri $\% 99.29 \pm 0.04$ (Ortalama $\pm$ Standart hata), SS: 0.025, BSS: $\% 4.88$ olarak bulunmuştur.

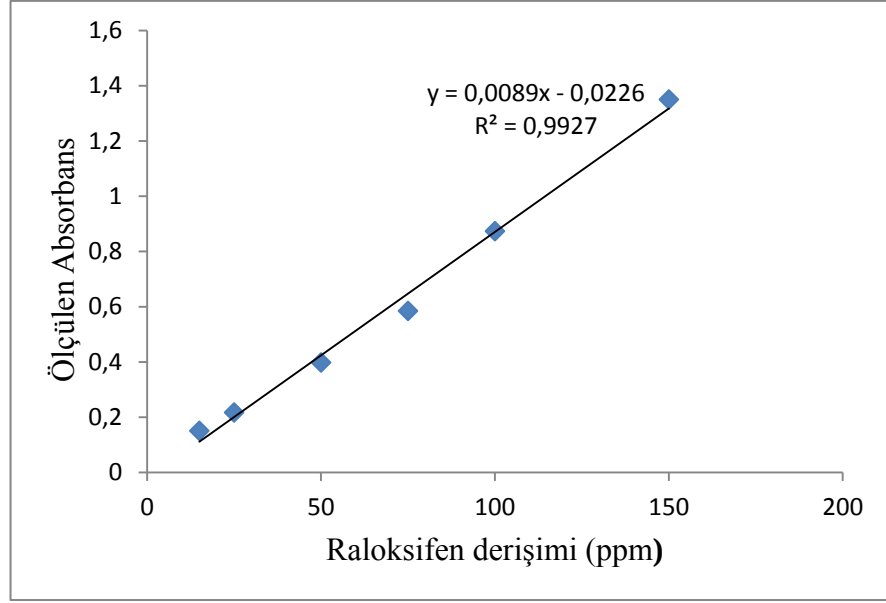
4.4. UV Spektrofotometrik (Karşılaştırma) Yöntem Bulguları

Raloksifenin farmasötik preparattaki miktar tayini için geliştirilen yöntem, kaynaklarda belirtilen Metot A (22) yöntemiyle karşılaştırılmıştır. Bunun için raloksifenin 0.1 M NaOH çözeltisi içindeki UV-GB spektrumu alınmıştır (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Raloksifenin 0.1 M NaOH çözeltisi içindeki spektrumu

Raloksifenin derişimine karşı 421 nm’de gösterdiği absorbansı ölçülerek kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Farmasötik preparattan raloksifen tayini için UV-GB spektrofotometrik yöntem ile elde edilen kalibrasyon eğrisi

4.5. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Geliştirilen GC-MS yöntemi Türkiye piyasasında bulunan raloksifen HCl etken maddesi içeren Evista® tabletlere uygulanmıştır. Aynı tabletler kaynaklarda verilen UV spektrofotometrik yöntemle (22) de analiz edilmiş ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.19’da verilmiştir.

Tablo 4.19. Raloksifenin farmasötik preparatlardan GC-MS ve UV/GB spektrofotometrik yöntem ile analiz bulguları (n=6)

Evista Tablet® (60 mg/tablet)		
NUMUNE	GC-MS yöntemi ile bulunan değer (mg)	UV/GB yöntemi ile bulunan değer (mg)
1	58.386	58.994
2	59.597	59.391
3	59.446	58.663
4	60.450	60.416
5	59.910	58.776
6	59.792	59.330
	$\bar{X} = 59.597 \pm 0.280$ SS = 0.685 BSS = % 1.15 GA= 59.317 – 59.877	$\bar{X} = 59.262 \pm 0.269$ SS = 0.635 BSS = %1.07 GA=59.002 – 59.521
P=0.173 > 0.05 Wilcoxon'a göre sonuçlar arasındaki fark önemsizdir.		

$\bar{X}$: ortalama $\pm$ standart hata, SS:Standart sapma, BSS:Bağıl standart sapma

GA: Güven Aralığı (α : 0.05) (Bkz. Ek 2)

Tablo 4.19'da görüldüğü gibi her iki yöntemin sonuçları WILCOXON istatistiksel testi ile karşılaştırılmıştır. Her iki yöntemin sonuçları arasındaki farkın önemli olup olmadığı araştırılmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (P = 0.173 > 0.05).

5. TARTIŞMA

Kaynaklarda raloksifenin GC-MS yöntemiyle analizi ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada raloksifenin insan idrarından ve farmasötik preparattan analizi için GC-MS yöntemi geliştirilmiştir. Bu amaçla farklı türevlendirme reaktifleri, tepkime sıcaklıkları ve süresi ile sıvı- sıvı ekstraksiyon teknikleri denenmiştir. Ayrıca farklı kromatografik koşullar denenerek yöntemin optimizasyonu sağlanmıştır. Geliştirilen yöntemin validasyon parametreleri insan idrarı ve farmasötik preparatlar için ayrı ayrı değerlendirildikten sonra, yöntem raloksifen HCl içeren farmasötik preparatın analizine uygulanmıştır. Sonuçlar kaynaklardaki UV spektrofotometrik yöntem (metot A) sonuçlarıyla karşılaştırılarak aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Raloksifen yüksek sıcaklıkta kararlı ve uçucu olmadığı için GC-MS ile direk analizi yapılamamaktadır. Bu yüzden türevlendirme yapılması gerekmektedir. Raloksifen polar -OH gruplarına ve keton yapısına sahip olduğu için türevlendirmeye uygundur. Bu amaçla sililleme reaksiyonları için MSTFA, MTBSTFA, metilleme reaksiyonu için CH_3I ve Etilkloroformat (ECF) türevlendirmesi kullanılmıştır. ECF türevlendirmesi kaynaklarda özellikle biyolojik materyallerde ve sulu ortamlarda kolay uygulanabilmesi açısından silillemeye alternatif olarak gösterilmektedir (69, 70). Ancak yapılan denemelerde raloksifenin CH_3I ve ECF ile türevlendirilmesi başarılı olmamıştır. Sililleme reaktifi olan MTBSTFA ile türevlendirme sonucunda Raloksifen-bis-O-terbutildimetilsilil (Bkz. Şekil 4.1) ve MSTFA ile yapılan türevlendirme sonucunda Raloksifen-tris-O-TMS (Bkz. Şekil 4.2) türevli yeni moleküller oluşturulmuştur. Ancak MTBSTFA ile yapılan türevlendirmede farklı sıcaklıklar ve farklı türevlendirme süreleri taranarak yapılan çalışmalarda tekrarlanabilir sonuçlar elde edilememiştir. Ayrıca MTBSTFA ile yapılan türevlendirmede, MSTFA ile yapılan türevlendirmeye kıyasla daha düşük alanlar elde edilmiştir.

Türevlendirme tepkimesinde, en yüksek verimi ve tekrarlanabilir sonuçları elde etmek için MSTFA'ya ek olarak farklı türevlendirme katalizörleri (MSTFA/imidazol, MSTFA/ β -merkaptetanol/ NH_4I) ile birlikte tepkime sıcaklıkları ve süreleri gibi parametrelerin türevlendirme tepkimesine etkisi incelenmiştir. Oluşan

yeni türevlere ait alan değerleri, ortalama-standart sapma grafiği oluşturularak karşılaştırılmıştır.

Yapılan türevlendirmelerle elde edilen sonuçlarda alan değerleri karşılaştırılarak en yüksek verim belirlenmiş, tekrarlanabilirlik için ise alan değerlerinin ortalama değerden ne kadar saptığı incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, MSTFA/ β -merkaptetanol/ NH_4I türev reaktifi olarak seçilmiş ve türevlendirme koşulları 80°C de 30 dk olarak belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.3). 80°C de 30 dk ve 60°C de 120 dk türevlendirme sonuçları arasındaki farkın anlamlı olmadığı WILCOXON testi ile istatistiksel olarak gösterilmiştir ($P=0.144>0.05$).

Raloksifenin GC-MS ile analizi için en uygun kromatografik koşulların belirlenmesi için, sıcaklık programı (fırın başlangıç ve son sıcaklığı ile sıcaklık artış oranı) ve akış hızının raloksifenin kromatografik davranışı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu sırada bir değişken değiştirilirken diğerleri sabit tutulmuştur. Bu bağlamda denenen her koşul için raloksifene ait m/z 578 iyonunun alanı, alıkonma zamanı (t_R), pik ayıricılığı (R_s), teorik tabaka sayısı (N) ve pik simetri oranına (PSO) bakılmıştır (Bkz. Tablo 4.4). Sonuç olarak incelenen sistem uygunluk parametrelerinden pik ayıricılığı (R_s) > 2 , pik simetri oranı ≤ 2 , teorik tabaka sayısı > 2000 kabul edilebilir aralıklarda olduğu için, koşulları değerlendirirken asıl önemli parametre m/z 578 iyonunun alanı olmuştur. Bu değer yöntemin hassasiyetini belirleyeceği için çok önemlidir. Burada cihazın cevabının, akış hızı ile ters orantılı olarak artış gösterdiği gözlenmektedir. Bunun sebebi, akış hızı arttıkça kütle spektrometresindeki iyon kaynağına daha fazla He birikecek ve bu da iyonlaşmayı azaltacaktır. Cihazın cevabı da buna bağlı olarak düşecektir (72, 73). Bunun için de 578 pik alanının en yüksek olduğu koşul 11 ($200^\circ\text{C}/ 25^\circ\text{C dk}^{-1}/ 310^\circ\text{C}$ sıcaklık programı ile akış hızı sabit 1.0 mL dk^{-1}) seçilmiştir (Bkz. Şekil 4.4). Belirlenen koşullarda raloksifenin toplam analiz süresi 8 dk bulunmuştur.

Raloksifenin idrardan ekstraksiyonu için sıvı-sıvı ekstraksiyon teknikleri denenmiştir. Bu amaçla çeşitli organik çözücüler (etil asetat, metil tersiyer-bütül eter, pentan ve kloroform) kullanılmıştır. Raloksifen idrardan organik faza çekilerek geri kazanım değerleri karşılaştırılmıştır (Bkz. Tablo 4.5). Çözücü olarak metil tersiyer-butül eter kullanıldığında mutlak geri kazanımının daha yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca idrarın pH değerinin asidik ($\text{pH}=5$) ve bazik ($\text{pH}=9$) olmasını sağlayacak

tamponlar denenmiştir. Bazik ortamda raloksifenin geri kazanımının arttığı görülmüştür (Bkz. Şekil 4.5). Bunun nedeni raloksifen HCl pKa değeri 9.55'dir. Sulu ortamda molekül tuzu şeklinde bulunur. Bazik ortamda nötral hale gelir ve organik faza geçişi kolaylaşır. Sonuç olarak raloksifenin geri kazanımı için idrar 750 µL karbonat tamponu (pH 9) ile bazik yapıldıktan sonra 5 mL metil tersiyer-bütil eter kullanılarak yapılan ekstraksiyon yönteminin uygulanmasına karar verilmiştir.

IS olarak epioksandrolon, oksandrolon, danazol metaboliti (17- α -etinil-4-androsten-17 β -ol-3on) ve metiltestosteron denenmiştir. Alıkonma zamanları incelendiğinde alıkonma zamanı raloksifene en yakın olan metiltestosteron IS olarak seçilmiştir. Bu madde MSTFA/ β -merkaptotanol/ NH_4I sililleme reaktifi kullanarak 80°C'de 30 dk'da türevlendirildiğinde BSS değeri % 1.15 olarak bulunmuştur. Raloksifen ile aynı koşullarda sıvı-sıvı ekstraksiyon uygulandığında mutlak geri kazanım değeri % 93,7 olarak hesaplanmıştır.

Geliştirilen yöntem sistem uygunluk testleri, özgünlük, duyarlılık, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, geri kazanım, kararlılık, sağlamlık ve tutarlılık parametreleri araştırılarak valide edilmiştir.

Geliştirilen analiz yönteminin sistem uygunluğu; enjeksiyon tekrarlanabilirliği, R_s , N ve PSO parametrelerine göre değerlendirilmiştir. Test için standart çözeltinin on tekrarlı enjeksiyonu sonucunda elde edilen veriler kullanılmış ve elde edilen değerler incelendiğinde sınır değerler içinde olduğu görülmüştür (Bkz. Tablo 4.7).

Raloksifenin İdrardan Analizi İçin Yöntem Validasyonu:

Yöntemin özgünlüğünü (seçiciliğini) gözlemek için sağlıklı ve ilaç kullanmayan 8 farklı gönüllüden elde edilen boş idrar ile raloksifen HCl ve IS eklenmiş idrar örneği analiz edilmiş ve elde edilen TIC ve SIM kromatogramları incelenerek (Raloksifen için m/z 578, 563, 505 ve IS için 446) girişime neden olacak herhangi bir seçilmiş iyon rastlanmamıştır (Bkz. Şekil 4.7 ve 4.8). Bu durum geliştirilen GC-MS yönteminin özgün olduğunu göstermektedir.

İdrara eklenen raloksifen HCl derişimi, raloksifen pik alanlarının IS pik alanına oranına karşı grafiğe geçirildiğinde 10 ile 200 ng mL⁻¹ aralığında, doğrusal olduğu kalibrasyon eğrisinin doğrusallıktan ayrılışının önemli olmadığı ($F_H > F_T$,

$p < 0.05$) ve korelasyon katsayılarının tesadüfen bulunmuş değerler olmadığı ($p < 0.05$) istatistiksel olarak saptanmıştır (Bkz. Tablo 4.9). Ayrıca yöntemin doğrusallığının kontrol grafikleri çizilmiş (Bkz. Şekil 4.9) ve elde edilen kalibrasyon eğrilerinin korelasyon katsayılarının bire yakın çıkması yöntemin doğrusal olduğunu göstermiştir.

LOD ve LOQ değerleri S/G oranının 3 ve 10 olmasına göre seçilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 8 ng mL^{-1} ve 10 ng mL^{-1} bulunmuştur. LOQ düzeyinde kesinliğin % 20'den az olması gerektiği bildirilmiştir (57). Yöntemde LOQ düzeyinde hesaplanan BSS % 9.09 olarak bulunmuştur. Bu nedenle LOQ değeri 10 ng mL^{-1} olarak seçilmiştir. Bu değer raloksifenin idrardan analizi için geliştirilen GC-MS yönteminin yeteri kadar duyarlı olduğunu göstermektedir.

Yöntemin gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmaları çizilen kalibrasyon eğrisi üzerinden 3 farklı derişimdeki ($15, 80, 160 \text{ ng mL}^{-1}$) bağımsız numunelerin tekrarlı ($n=6$) analizleri ile yapılmıştır. Geliştirilen yöntemin gün içi ve günlerarası analizleri sonucunda elde edilen BH değerleri sırasıyla % 0.86- 2.33 ve 0.87-2.40 arasında bulunmuştur. Bağlı hata değerleri yöntemin doğruluğunun kanıtıdır. Ayrıca yöntemin gün içi ve günlerarası analizleri sonucunda elde edilen BSS değerleri sırasıyla, 5.24-8.91 ve 2.36-5.13 arasında çıkmıştır (Bkz. Tablo 4.10). BSS değerleri ise yöntemin kesinliğinin bir ölçütüdür. Kesinliğin (BSS) ve doğruluğun (BH) % 15'den fazla olmaması gerekir, ancak LOQ düzeyinde % 20'ye kadar olan değerler kabul edilebilir (57). Bu verilere göre değerlendirme yapıldığında, gün içi ve günler arası sonuçlarının kesinliğinin yüksek ve yöntemin doğru ve tekrarlanabilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Geri kazanım, bağıl ve mutlak geri kazanım olarak üç farklı derişimde ($15, 80, 160 \text{ ng mL}^{-1}$) yapılmıştır. Mutlak geri kazanım, tüm analiz yönteminin sonucunda idrara eklenen maddelerin ne kadarının bulunduğunu belirlemek için yapılırken, bağıl geri kazanım ise matriks etkisi sonucundaki kaybı belirlemek için yapılır. Mutlak geri kazanım, % 72.51-% 76.32 ve bağıl geri kazanım % 81.67-% 84.19 değerleri arasında bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.11). Bunlar da kabul edilebilir sınırlardadır.

Kararlılık çalışmaları, donma-erime döngüsü, kısa süreli, uzun süreli, oto örnekleyicide ve stok çözelti kararlılığı olmak üzere beş şekilde incelenmiştir (Bkz.

Tablo 4.12, 4.13). Biyolojik materyallerde bağıl miktarda % 15'e kadar meydana gelebilecek değişimler kabul edilebilir ve stok çözeltilerdeki kararlılık için ise % 5-7 arasına kadar kabul edilebilir (74). Raloksifen HCl eklenmiş idrar örneklerinin donma-erime döngüsü 3 döngüye kadar incelenmiş ve kararlı olduğu görülmüştür. Ayrıca 24 saat boyunca oda sıcaklığında saklanarak elde edilen kısa süreli kararlılık ve -80°C de 3 ay süre ile beklenen örneklerle elde edilen uzun süreli kararlılık sonuçlarına bakıldığında bu koşullarda raloksifen HCl eklenmiş idrar örneklerinin kararlı olduğu sonucuna varılmıştır. Oto örnekleyicide beklemede raloksifen miktarında az da olsa bir artış gözlenmiştir. Bu artışın nedeninin raloksifenin sililleme tepkimesinin oto örnekleyicide bekleme sırasında bir miktar da olsa devam etmesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Stok çözelti kararlılığında ise % 0.6'lık bir değişim gözlenmektedir. Bu değişim de kabul edilebilir sınırlar içindedir.

Sağlamlık ve tutarlılık çalışmaları için Plackett-Burman deneysel tasarım tekniği kullanılmıştır. Bu teknikte deneyde oluşabilecek ana parametrelerdeki küçük değişimlerin sonuçlar üzerindeki etkisi incelenmektedir. Elde edilen ANOVA değerleri (Bkz. Tablo 4.15) ve standartlaştırılmış etkilerin normal grafiği (Bkz. Şekil 4.11) verilmiştir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde yöntemin sağlamlık çalışması için tampon miktarı [A] ve türev süresinde [B] meydana gelen küçük değişikliklerden etkilenmesinin önemsiz olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca yöntemin tutarlılık çalışması için ise farklı analizci [C], farklı marka eter [D], farklı marka MSTFA [E] kullanımının raloksifen alan /IS alan oranı üzerinde etkisinin olmadığı ve böylece yöntemin sağlam ve tutarlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Raloksifenin Farmasötik Preparattan Analizi İçin Yöntem Validasyonu:

Raloksifenin farmasötik preparattan analizinde idrardan raloksifen tayini için kullanılan kromatografik parametreler uygulanmıştır.

Yöntemin özgünlüğünü (seçiciliğini) gözlemek için sentetik preparat çözeltisi hazırlanarak analizi yapılmıştır. Sentetik preparat çözeltisi ve plasebo çözeltisine ait kromatogram değerlendirilerek raloksifen ve IS ile aynı alıkonma zamanına sahip herhangi bir pik gözlenmemiştir (Bkz. Şekil 4.12). Ayrıca yöntemin özgünlüğü, farmasötik preparattan miktar tayini için standart ekleme yönteminin uygulanması ile de gösterilmiştir. Standart ekleme tekniği ile elde edilen doğrunun eğiminin çizilen

kalibrasyon eğrisinin eğimiyle aynı bulunması farmasötik preparatta bulunan yardımcı maddelerin analizi etkilemediğinin ve yöntemin özgünlüğünün göstergesidir (Bkz. Şekil 4.13). Standart ekleme eğrisinin ve kalibrasyon eğrisinin eğimlerinin aynı olması farmasötik preparat analizlerinin bundan sonraki çalışmalarda doğrudan kalibrasyon yöntemi ile yapılması yönünde tercih sebebi olmuştur.

Raloksifen standardının miktarı, raloksifen pik alanlarının IS pik alanına oranına karşı grafiğe geçirildiğinde 10 ile 400 ng aralığında, doğrusal olduğu kalibrasyon eğrisinin doğrusallıktan ayrılışının önemli olmadığı ($F_H > F_T$, $p < 0.05$) ve korelasyon katsayılarının tesadüfen bulunmuş değerler olmadığı ($p < 0.05$) istatistiksel olarak saptanmıştır (Bkz. Tablo 4.17). Ayrıca yöntemin doğrusallığının kontrol grafikleri çizilmiş ve elde edilen kalibrasyon eğrilerinin korelasyon katsayılarının bire yakın çıkması yöntemin doğrusal olduğunu göstermiştir (Bkz. Şekil 4.14).

LOD ve LOQ değerleri S/G oranının 3 ve 10 olmasına göre seçilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 5 ng ve 10 ng bulunmuştur.

Yöntemin gün içi ve günler arası kesinlik doğruluk çalışmaları çizilen kalibrasyon eğrisi üzerinden 3 farklı miktardaki (20, 100, 300 ng) bağımsız numunelerin tekrarlı ($n=6$) analizleri ile yapılmıştır. Geliştirilen yöntemin gün içi ve günlerarası analizleri sonucunda elde edilen BH değerleri sırasıyla % 0.93- 1.45 ve % 0.29-0.70 arasında bulunmuştur. Bağıl hata değerleri yöntemin doğruluğunun kanıtıdır. Ayrıca yöntemin gün içi ve günlerarası analizleri sonucunda elde edilen BSS değerleri sırasıyla, % 0.87-1.61 ve % 0.99-1.34 arasında çıkmıştır (Bkz. Tablo 4.18). BSS değerleri ise yöntemin kesinliğinin bir ölçütüdür. BSS ve BH değerlerinin % 2'den fazla olmaması nedeniyle (75,76), gün içi ve günler arası sonuçlarının kesinliğinin yüksek ve yöntemin doğru olduğu sonucuna varılmıştır.

Geri kazanım çalışması sentetik farmasötik preparat çözeltisine uygulanmıştır. Geri kazanım değeri % 99.29 ± 0.04 olarak bulunmuştur.

Geliştirilen GC-MS yönteminin geçerli (valide) olduğu validasyon parametreleri test edilerek ve kabul edilebilir sınırlarda olduğu (59) kanıtlandıktan sonra, raloksifenin farmasötik preparatlardan analizi için uygulanmasına karar verilmiştir. Geliştirilen yöntem piyasada bulunan raloksifen içeren Evista® tablete uygulandığında hesaplanan BSS değeri % 1.15 bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.19). Bu

değer kabul kriteri olan % 2'den küçüktür (75). Ayrıca geliştirilen ve farmasötik preparatlar için valide edilen yöntemin farmasötik preparatlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar kaynaklarda verilen UV spektrofotometrik yöntemin sonuçları ile de karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Bkz. Tablo 4.19). Bu durum geliştirilen yöntemin doğru ve farmasötik preparatlara uygulanabilir olduğunu göstermektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez kapsamında kadınlarda postmenopozal osteoporozun tedavisi için ve erkeklerde doping amacıyla kullanılan raloksifenin biyolojik materyalden (insan idrarı) ve farmasötik preparattan analizi için GC-MS yöntemi geliştirilmiş ve validasyon çalışmaları yapılmıştır.

Raloksifenin GC-MS yöntemi ile analizi için 200°C/ 25°C dk⁻¹/ 310°C sıcaklık programı ile akış hızı sabit 1.0 mL dk⁻¹ olarak ayarlanmıştır. Seçilen kromatografik koşullarda IS ve raloksifenin alıkonma zamanları sırasıyla 3.586, 6.785 dk olarak bulunmuştur.

Raloksifen GC-MS cihazında analizine uygun hale getirilebilmesi için 80°C’de 30 dk MSTFA/β-merkaptotanol/NH₄I reaktifi ile türevlendirilmiştir.

Raloksifenin idrardan ekstraksiyonu için sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi geliştirilmiştir. Bunun için idrar pH 9 karbonat tamponu ile bazik yapıldıktan sonra 5 mL metil tersiyer-butyl eter kullanıldığında geri kazanımı maksimum olduğu görülmüştür. Bu koşulların literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Geliştirilen yöntemin validasyonu biyolojik materyalden raloksifen tayini için ve raloksifenin farmasötik preparattan analizi ayrı ayrı değerlendirilmiştir (57, 59). Bunlara göre analit çözeltilerinin özgünlük, doğruluk, kesinlik, geri kazanım, duyarlılık, kararlılık, sağlamlık ve tutarlılık validasyon parametreleri değerlendirilmiştir. Bütün validasyon parametrelerinin kabul edilebilir sınırlar içinde olduğu tespit edilmiştir.

Valide edilen yöntem Türkiye ilaç piyasasında satılan Evista® isimli farmasötik tablet preparata uygulanmıştır. Sonuçlar kaynaklardaki yöntemle karşılaştırılmış ve aralarında anlamlı fark bulunmamıştır.

Raloksifenin farmasötik preparatlardan HPLC (10, 11, 14, 15) ve kapiler elektroforez (21) ile analizlerinde alt tayin sınırlarının geliştirilen yöntemden daha kaba olduğu görülmektedir. Ayrıca idrardan raloksifenin LC-MS-MS yöntemiyle tayininde (19) LOQ 20 ng mL⁻¹ olarak verilmiştir. Bu değer de geliştirilen yöntemin LOQ değerinden (10 ng mL⁻¹) yüksektir. Geliştirilen yöntemin kaynaklardaki yöntemlerden daha duyarlı olduğu söylenebilir.

Ayrıca bu tez çalışmasının raloksifenin GC-MS yöntemiyle tayini için ilk çalışma olarak kaynaklara geçeceği de önemli bir husus olarak değerlendirilmektedir.

Geliştirilen ve valide edilen GC-MS yöntemi insan idrarından raloksifen analizi için bildirilmiş pahalı LC-MS-MS yöntemlerine bir alternatif olarak sunulabilir. Ayrıca GC-MS cihazlarının maliyetinin düşük olması, analiz laboratuvarlarında yaygın olarak bulunabilmesi, pahalı çözücüye gerek olmaması ve çevreye zarar vermemesi yöntemi çekici kılmaktadır. Geliştirilen yöntemin ilaç endüstrisinde bulunan Ar-Ge, kalite kontrol ve doping kontrol laboratuvarlarına faydalı olabileceği de ayrıca düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Jordan, V. C. ve O'Malley, B.W. (2007). Selective Estrogen-Receptor Modulators and Antihormonal Resistance in Breast Cancer. J Clin Oncol, 25, 5815-5824.
2. Goldstein, S.R., Siddhanti, S., Ciaccia, A.V. ve Plouffe, L.Jr. (2000). A pharmacological review of selective estrogen receptor modulators. Hum Reprod Update, 6, 212-224.
3. Delmas, P.D., Bjarnason, N.H., Mitlak, B.H., Ravoux, A.C., Shah, A.S., Huster, W.J., Draper, M. ve Christiansen, C. (1997). Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women. N Engl J Med, 337, 1641-1647.
4. Ettinger, B., Black, D.M. ve Mitlak, B.H. (1999). Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: results from a 3 year randomized clinical trial. JAMA, 282, 637-645.
5. Raloxifene (prospektüs). International Multicenter study. (1998). Indianapolis: Eli Lilly and Company.
6. Walsh, B.W., Kuller, L.H. ve Wild, R.A. (1998). Effects of raloxifene on serum lipids and coagulation factors in healthy postmenopausal women. JAMA, 279, 1445-1451.
7. Cengiz, B., Demirel, C. ve Kurtay, G. (2002). Clinical usage of selective estrogen receptor modulators. T Klin J Gynecol Obst, 12, 1-7.
8. Duschek, E.J., Gooren, L.J. ve Netelenbos, C. (2005). Comparison of effects of the rise in serum testosterone by raloxifene and oral testosterone on serum insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding protein-3. Maturitas, 51, 286.
9. WADA. (2012). The World Anti-doping code-The 2012 Prohibited List: International standart. Erişim:06.04.2012, http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-Prohibited-list/2012/WADA_Prohibited_List_2012_EN.pdf

10. Reddy, P .V., Sudha Rani, B., Srinu Babu, G. ve Seshagiri Rao, J.V.L.N. (2006). RP-HPLC determination of Raloxifene in pharmaceutical tablets. E-journal of Chemistry, 3 (10), 60-64.
11. Trontelj, J., Vovk, T., Bogataj, M. ve Mrhar, A. (2005). HPLC analysis of raloxifene hydrochloride and its application to drug control studies. Pharmacological Research, 52, 334-339.
12. Wang, Q., Zhang, H. ve Zhiguo, Y. (2002). Determination of the content of raloxifene hydrochloride by HPLC. Shenyang Yaoke Daxue Xuebao, 19 (2), 105-108.
13. Nandini, P. ve Jayant, W. (2001). Development and validation of a HPLC method for analysis of raloxifene hydrochloride. Indian Drugs, 38, 591-592.
14. Pavithra, D.C. ve Lakshmi, S.S. (2006). RP-HPLC estimation of raloxifene hydrochloride in tablets. Indian J Pharm. Sci., 68, 401-402.
15. Basavaiah, K., Kumar, U.R., Tharpa, K. (2008). Gradient HPLC analysis of raloxifene hydrochloride and its application to drug quality control. Acta Pharmaceutica, 58 (3), 347-356.
16. Yang, Y., Zhang, Z., He, X.B., Zhao, G.Y. ve Zhang, Y.Q. (2007). Validation of a novel HPLC method for the determination of raloxifene and its pharmacokinetics in rat plasma. Chromatographia, 65, 197-201.
17. Trontelj, J., Bogataj, M., Marc, J. ve Mrhar, A. (2007). Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for the determination of raloxifene and its metabolites in human plasma. Journal of Chromatograph, 855, 220-227.
18. Zweigenbaum, J. ve Henion, J. (2000). Bioanalytical high-throughput selected reaction monitoring-LC/MS determination of selected estrogen receptor modulators in human plasma: 2000 samples/day. Anal. Chem, 72, 2446.
19. Kumar, A., Basavaiah, K., Tharpa, K. ve Vinay, B. (2009). Determination of Raloxifene hydrochloride in human urine by lc-ms-ms. Chemical industry & chemical Engineering Quarterly, 15(3), 119-123.
20. Trdan, T., Roskar, R., Trontelj, J., Ravnikar, M. ve Mrhar, A. (2011). Determination of raloxifene and its glucuronides in human urine by liquid

chromatography-tandem mass spectrometry assay. *Journal of Chromatography B*, 879, 2323-2331.

21. Perez-Ruiz, T., Martinez -Lozano, C., Sanz, A. ve Bravo, E. (2004). Development and validation of quantitative assay for raloxifene by capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34, 891-897.
22. Annapurna, M., Rao, M.E. ve Kumar, B.V.V. (2007). Spectrophotometric determination of raloxifene hydrochloride in pharmaceutical formulations. *E-journal of chemistry*, 4 (1), 79-82.
23. Basavaiah, K., Kumar, U.R., Tharpa, K. ve Vinay, K.B. (2008). Validated spektrophotometric methods for the determination of raloxifene hydrochloride in pharmaceuticals. *J.Chil.Chem.Soc.*, 3, 53.
24. Basavaiah, K., Anil Kumar, U.R., Tharpa, K., Rajedraprasad, N., Hiriyanna, S. ve Vinay, K.B. (2009). Optimized and validated spectrophotometric methods for the determination of raloxifene in pharmaceuticals using permanganate. *Archives of Pharmacal Research*, 32 (9), 1271-1279.
25. Dharuman, J., Ravichandran, V., Thirumoorthy, N. ve Dharamsi, A. (2004). Spectrophotometric determination of raloxifene hydrochloride in pure and pharmaceutical formulations. *Pharmazie*, 59, 720-721.
26. Jensen, E.V., Jacobson, H.I. (1962). Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent Progr Hormone Res*, 18, 387-414.
27. Clarkson, T. (2002). Raloxifene revisited, *Ferti Steril*, 77 (3), 445-447.
28. McDonnell, D.P. (1999). The molecular pharmacology of SERMs. *TEM*, 10 (8). 301-31.
29. Baker, V.L., Draper, M., Paul, S., Allerheiligen, S., Glant, M., Shifren, J. ve Jaffe, R.B. (1998). Reproductive endocrin and endometrial effects of raloxifene hydrochloride, a selective estrogen receptor modulator, in women with regular menstruel cycles. *J Clin Endocr Metab*, 83(1), 6-13.
30. Biewenga, E., Cabell, L., Audesirk, T. (2005). Estrodiol and raloxifene protect cultered SN4741 neurons against oxidative stress. *Neurosci Lett*, 373, 179-183.

31. Brzozowski, A.M., Pike, A.C., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engstrom, O., Ohman, L., Greene, G.L., Gustafsson, J.A. ve Carlquist, M. (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the estrogen receptor. *Nature*, 389 (6652), 753-758.
32. Duschek, E., Gooren, L. ve Netelenbos, C. (2004). Effects of raloxifene on gonadotrophins, sex hormones, bone turnover and lipids in healthy elderly men. *European Journal of Endocrinology*, 150, 539-546.
33. Sato, M., Glasebrook, A.L. ve Bryant, H.U. (1994). Raloxifene: a selective estrogen receptor modulator. *J Bone Miner Metab.*, 12, 9-20.
34. Barkhem, T., Carlsson, B., Nilsson, Y., Enmark, E., Gustafsson, J. ve Nilsson, S. (1998). Differential reponse of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonist/antagonist. *Mol Pharmacol.*, 54, 15-112.
35. Levenson, A.S. ve Jordan, V.C. (1998). The key to antiestrogenic mechanism of raloxifene is aminoacid 351 (aspartate) in the estrogen receptor. *Cancer Res.*, 58, 1872-1875.
36. Turner, C.H., Sato, M. ve Bryant, H.V. (1994). Raloxifene preserves bone strength and bone mass in evriectomized rats. *Endocrinology*, 135, 2001-2005.
37. Short, L., Glasebrook, A.L., Adrian, M.D., Cole, H., Shetler, P. ve Rowley, E.R. (1996). Distinct effect of selective estrogen receptor modulators on estrogen-dependent and estrogen-independent human breast cancer proliferation. *J Bone Miner Metab.*, 11, 482.
38. .Anzano, M.A., Peer, C.W., Smith, J.M. (1996). Chemoprevention of mammary carcinogenesis in the rat: combined use of raloxifene and 9-cis-retinoic acid. *J. Nati Cancer Inst*, 88, 123-125.
39. Knadler, M.P., Lantz, R.J., Gillespie, T.A. (1995). The disposition and metabolism of ¹⁴C labeled raloxifene in humans. *Pharm Res.*, 12, 372.
40. Jeong, E.J., Liu,Y., Lin, H., Hu,M. (2005). Species- and disposition model-dependent metabolism of raloxifene in gut and liver: role of UGT1A10. *Drug Metab. Dispos.*, 33 (6), 785.

41. Draper, M.W., Flowers, D.E., Huster, W.J. ve Mitlak, B.H. (1996). A controlled trial of raloxifene (LY 139481) HCl: impact on bone turnover and serum lipid profile in healthy postmenopausal women. *Y Bone Miner Res.*, 11, 835-842.
42. Delmas, P.D., Byarhason, N.H., Mitlak, B.H., Ravoux, A.C., Shah, H.A., Huster, V.J., Draper, M.W. ve Christiansen, C. (1997). Effects of raloxifene on Bone mineral density serum cholesterol concentrations and uterine endometrium in postmenopausal women. *N Engl J Med.*, 337 (23), 1641-1647.
43. Balfour, J.A. ve Goa, K.L. (1998). Raloxifene. *Drugs&Aging*, 12 (4), 335-341.
44. Skoog, D.A., Holler, J. ve Nieman, T. (2000). Principles of instrumental analysis, Çeviri Editörleri ; Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H., (5. bs.). Ankara: Bilim Yayıncılık Ltd. Şti.
45. Gündüz, T. (2007). İnrümental Analiz (10. bs.), Ankara: Gazi Kitabevi.
46. Grob, R.L. (2004). Modern practice of gas chromatography (4. bs.), New Jersey: Wiley-Interscience.
47. Willet, J. (1991). Gas chromatography analytical chemistry by open learning (5' bs.), Kealley, D. (Ed), London, 65-73.
48. Agilent Technologies (1999). Mass Selective Detector. USA.
49. Fluka (1995). Derivatization Reagents, Fluka Chemie AG, Buchs Switzerland.
50. Segura J., Ventura, R., Jurado, C. (1998). Derivatization procedures for gas chromatographic–mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents. *Journal of Chromatography B*, 713, 61–90.
51. Danielson, N.D., Gallagher, A.P., Bao, J.J. (2008). Chemical reagents and derivatization procedures in drug analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 7042-7046.
52. Proceeding of the Manfred Donike Workshop 14th Cologne Workshop on Dope Analysis 17th to 22th March. (1996). 247-252.

53. Yavuz O. ve Aksoy A. (2006). Örnek hazırlamada katı faz ekstraksiyonu, F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi. 20 (3), 259-269.
54. Swartz, M.E. ve Krull, I.S. (1997). Analytical method development and validation. USA, New York, Marcel Dekker Inc.
55. Shabir, G. (2003). Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. Journal of Chromatography A, 987, 57–66.
56. Sahil, K., Akanksha, M., Premjeet, S., Seth, G. L. ve Bihani, S.D. (2012). Validation of analytical procedures: a comparison of ICH vs pharmacopoeia vs FDA. Pharmatutor-art, 1172.
57. Food and Drug Administration Technical Review Guide: Validation of Chromatographic Methods, (1993). Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Rockville, MD.
58. Ertaş, Ö. S. ve Kayalı, A. (2005). Analitik yöntem geçerliliğine genel bir bakış. Ankara Ecz. Fak. Derg., 34 (1), 41-57.
59. ICH. (2005). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1) Harmonized Tripartite Guideline.
60. Dinç, E. (2007). Kemometri çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri. Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi, 27 (1), 61-92.
61. Massart, D.L., Brereton, R.G., Dessy, R.E., Hopke, P.K., Spiegelman, C.H., Wegscheider, W. (1990). Chemometrics Tutorials, Amsterdam: Elsevier.
62. Kramer, R. (1998). Chemometrics techniques for quantitation analysis, CRC Pres.
63. Palabıyık, İ.M. ve Onur, F. (2010). İlaç analizlerinde kullanılan metot optimizasyon teknikleri. Eczacılıkta Yenilikler 2, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 99, 17-35.
64. Buffer solutions, European Pharmacopoeia 5.0.
65. Mohan, C. (2003). Buffers. Calbiochem, San Diego, California, Merck.
66. Handbook of Pharmaceutical Excipients (3. bs.). (2000). Washington DC: American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Press.

67. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM): Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation (2001).
68. Zhang, G., Terry, Jr. ve Bartlett, M. G. (2007). Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of olanzapine, risperidone, 9-hydroxyrisperidone, clozapine, haloperidol and ziprasidone in rat plasma. *Rapid communications in mass spectrometry*, 21, 920-928.
69. Tao, X., Liu, Y., Wang, Y., Qiu, Y. ve Lin, J. (2008). GC-MS with ethyl chloroformate derivatization for comprehensive analysis of metabolites in serum and its application to human uremia. *Anal Bioanal Chem*, 391, 2881-2889.
70. Dernroth, N., Rundström, A., Kagedal, B. (2009). Gas chromatography-mass spectrometry analysis of pheomelanin degradation products. *Journal of chromatography A*, 1216, 5730-5739.
71. Pozo, O. J., Eenoo, P.V., Deventer, K., Lootens, L., Thuyne, W.V. ve Parr, M.K. (2009). Detection and characterization of a new metabolite of 17 α -methyltestosterone. *Drug Metabolism and Disposition*, 37, 2153-2162.
72. How to improve your GC-MS analysis. Erişim: 25.08.2012, <http://www.sge.com/uploads/55/6a/556ae4e55c042c95832191d30557f017/TA-0061-C.pdf>
73. Rood D. (2007). The troubleshooting and maintenance guide for gas chromatographers, 97 ,Wiley, USA.
74. Nowatzke, W., Woolf E. (2007). Best practices during bioanalytical method validation for the characterization of assay reagents and the evaluation of analyte stability in assay standards, quality controls, and study samples. *The AAPS Journal*, 9 (2), 13.
75. Ermer, J. (2001). Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24 (5-6), 755-767.
76. Green, J. (1996). A practical guide to analytical method validation. *Anal. Chem*, 68, 305A-309A.

EKLER

Ek-1. Korelasyon Katsayısı Önem Kontrolü Testi

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

- 1- H_0 : korelasyon katsayısı tesadüfe bağlı bir değişkendir ($r=0$).
- 2- Test istatistiğinin hesaplanması:

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

t = Test istatistiği

r = Korelasyon katsayısı

S_r = Korelasyon katsayısının standart hatası

- 3- Yanılma olasılığı $\alpha = 0,05$ seçilmiştir.
- 4- Serbestlik derecesi= $n-2$ (n : ölçüm sayısı)
- 5- $\alpha = 0,05$ yanılma düzeyinde ve $n-2$ serbestlik derecesindeki tablo t değerine bakılır.
- 6- Karşılaştırma: hesapla bulunan “ t ” değeri tablo “ t ” değerinden büyükse H_0 reddedilir, küçükse kabul edilir.
- 7- Karar:
 - a) Korelasyon katsayısı önemli bir değerdir, tesadüfen bulunmuş bir değer değildir (t hesaplanan değeri, $p < 0,05$).
 - b) Korelasyon katsayısı önemli bir değer değildir, tesadüfen bulunmuş bir değerdir (t = hesaplanan değeri, $p > 0,05$).

Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü

- 1- Kareler toplamı bulunur,
 - a) Regresyon kareler toplamı (RRT):

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

b) Y ortalamadan ayrılış kareler toplamı (YOAKT):

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

c) Regresyondan ayrılış kareler toplamı (RAKT) hesaplanır:

$$RAKT = YOAKT - RKT$$

2- Serbestlik dereceleri bulunur,

a) Regresyon serbestlik derecesi (RSD)= 1

b) Y ortalamadan ayrılış serbestlik derecesi (YOASD)= n-1

c) Regresyondan ayrılış serbestlik derecesi (RASD)= YOASD-YSD

3- Kareler ortalamaları bulunur,

a) Regresyon kareler ortalamaları= RKT\RSD

b) Regresyondan ayrılış kareler ortalaması (RAKO)=RAKT\RASD

4- Ho=Değişim ile dedektör cevabı arasındaki ilişki doğrusal değildir.

5- Yanılma olasılığı $\alpha = 0,05$ seçilmiştir.

6- $F = RKO \backslash RAKO$

7- $P = 0,05$ dezeğinde RSD VE RASD serbestlik derecelerindeki tablo F değerleri bulunur.

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

9- Karar: değişim ile dedektör cevabı arasındaki ilişki doğrusaldır.

(F = Hesaplanan değer, $p < 0,05$).

(F = Hesaplanan değer $p > 0,05$).

Kesişimin sıfırdan ayrılışının önem kontrolü

$$1. S_{yx} = \frac{\sum y^2 - (\sum x)^2/n}{n-1} \left[\frac{(1-r)^2(n-1)}{n-2} \right]^{1/2}$$

$$2. S_{H(a)} = (S_{yx})^2 \left[(1/n) + \bar{X} / \left(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right) \right]$$

3. H_0 = Kesişim değeri (a) sıfıra eşittir.

4. Yanılma olasılığı $p = 0.05$ seçilmiştir.

5. $t_H = a / S_{H(a)}$

6. $\alpha = 0.05$ düzeyinde t_T değerleri bulunur.

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

8. Karar: Kesişim değeri sıfıra eşittir ($t_H =$ Hesapla bulunan, $p > 0.05$) veya Kesişim değeri sıfırdan farklıdır ($t_H =$ Hesapla bulunan, $p < 0.05$)

Ek-2. Tez İçinde Kullanılan İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması

$$\text{Bağıl Standart Sapma (B.S.S.)} = \frac{S.S.}{X} \times 100$$

S.S= Standart Sapma

X= Aritmetik Ortalama

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

$$\text{Standart Hata (S.H.)} = \frac{S.S.}{\sqrt{\text{Ölçüm sayısı}}}$$

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

Evren Ortalaması Güven Aralığının Hesaplanması

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

μ : Evren ortalaması

$\bar{x}$: Örneklem ortalaması

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

t: Seçilen yanılma düzeyi (α) ve n-1 serbestlik derecesindeki t Tablosundaki değer

Ek-3. Sertifika



Eli Lilly S.A. - Irish Branch

DUNDERROW, KINSALE, CO. CORK
 TELEPHONE 021-4772699 EMAIL: kinsale@lilly.com FAX 021-4775152

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product: RALOXIFENE HYDROCHLORIDE

Item Code:	QA420Y	Manufacturing Date:	4-JAN-2008
Lot Number:	A438730	Reevaluation Date:	7-JAN-2010
Date of Release:	4-MAR-2008		

TEST	RESULT	UNITS	SPECIFICATION
Description	Conforms		It is an off white to pale yellow solid
IR Ident	Conforms		Compares to Reference Standard
HPLC Ident	Conforms		Compares to Reference Standard
Ident Chloride	Conforms		The sample tested positively for chloride
Assay	100.0	%	97.0 to 102.0
Total Related Substances	0.14	%	0.00 to 0.50
Individual Related Substances	0.01	%	0.00 to 0.10
7-Isomer	0.04	%	0.00 to 0.10
Diacylated I	0.06	%	0.00 to 0.20
1,2 Dichloroethane	Conforms		Not more than 5 ppm
Heavy Metals	Conforms		Not more than 10ppm
Residue on Ignition	Conforms		Not more than 0.10% w/w.
Mean Particle Size	9	um	5 to 20
Avg 10% cumulative undersize vol.dia.	1	um	Not Less than 1
Avg 90% cumulative undersize vol.dia.	19	um	0 to 35
X-Ray Diffraction	Conforms		The diffraction pattern of the Sample compares to that of the Reference Standard
Loss On Dry	0.0	%	0.0 to 0.5
Methanol	0.07	%	0.00 to 0.30

This certificate is generated from validated systems. The data contained herein are assay results obtained by Eli Lilly and Company from tests performed on this product. This batch was manufactured in accordance with current Good Manufacturing Practices.

Anna Quobelha Date: 13 Jan 12
 Quality Assurance

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Ankara’da doğdum. Süleyman Demirel Anadolu Lisesini bitirdikten sonra 2003 yılında girdiğim Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya bölümünden 2008 yılında mezun oldum. 2009 yılında Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisans programına başladım. 2008’den beri Hacettepe Üniversitesi Türkiye Doping Kontrol Merkezi’nde bölüm sorumlusu olarak çalışmaktayım.