

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .

← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

KAPSAİSİN'İN GAZ KROMATOĞRAFİSİ-KÜTLE
SPEKTROMETRESİ (GC-MS) YÖNTEMİ İLE
FARMASÖTİK PREPARATLARDA ANALİZİ

İBRAHİM DANIŞ

DANIŞMAN
PROF. DR. DURİ ŞEHVAR ÜNAL

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI

İSTANBUL-2017

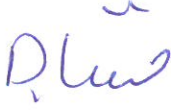
YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programında Yüksek Lisans öğrencisi İbrahim Daniş tarafından Prof. Dr. Durişehvar Ünal'ın danışmanlığında hazırlanan "Kapsaisin'in Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (Gc-Ms) Yöntemi İle Farmasötik Preparatlarda Analizi" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından. 14/07/2017 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



Jüri Başkanı

Prof. Dr. Serap Sağlık Aslan
İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Analitik Kimya Anabilim Dalı



Jüri-Danışman

Prof. Dr. Durişehvar Ünal
İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Analitik Kimya Anabilim Dalı



Jüri

Doç. Dr. Gülcemal Yıldız
İstanbul Teknik Üniversitesi,
Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü

BEYAN

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

İbrahim DANIŞ

(İmza)



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, samimiyeti ile her zaman yanımda olan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Durişehvar Özer Ünal'a

Değerli katkıları için Prof. Dr. Serap Sağlık Aslan'a

Bilgi ve tecrübeleriyle katkıda bulunan Analitik Kimya Anabilim Dalının tüm Öğretim Üyelerine

Desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen aileme, arkadaşlarıma ve İlaç Araştırma ve Uygulama Merkezi çalışanlarına teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 55974

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN	iii
İTHAF	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	x
ÖZET.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kapsaisinın Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	4
2.2. Kapsaisinın Farmakolojisi ve Etki Mekanizması	4
2.3. Yan Etkileri ve Genel Toksisite	5
2.4. Gaz Kromatografisi (GC).....	5
2.4.1. Taşıyıcı Gaz ve Regülatör Sistemi.....	8
2.4.2. Enjektör Bloğu.....	9
2.4.3. Fırın	12
2.4.4. Kolon.....	12
2.4.5. Dedektör	14
2.5. Kütle Spektrometresi (MS)	14
2.5.1. Ara Bağlantı.....	15
2.5.2. İyon Kaynağı	15
2.5.3. Kütle Analizörü.....	16
2.5.4. Dedektör	17
2.5.5. Vakum Sistemi.....	18
2.6. Analiz Yöntemleri	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1. Kimyasal Maddeler, Çözücü ve Taşıyıcı Gaz.....	22

3.2. Kapsaisin Çözeltileri.....	22
3.3. Aletler ve Gereçler.....	23
3.4. Analizin Gerçekleştirilmesi.....	25
3.5. Kapsaisinın Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi (GC-MS) ile Analizi.....	26
3.5.1. SIM Modda İyon Seçimi	26
3.5.2. Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması	26
3.6. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu	26
3.6.1. Spesifiklik ve seçicilik	27
3.6.2. Doğrusallık	27
3.6.3. Doğruluk.....	27
3.6.4. Kesinlik	27
3.6.5. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)	27
3.6.6. Validasyon Serisinin Hazırlanması.....	28
4. BULGULAR.....	30
4.1. Kromatografik Koşullar	30
4.2. Autotune Değerlendirmesi	31
4.3. Yöntem Validasyonu	33
4.3.1. Seçicilik	33
4.3.2. Doğrusallık	34
4.3.3. Doğruluk ve Kesinlik	35
4.3.4. Teşhis (LOD) ve Tayin (LOQ) Sınırları	36
4.3.5. Farmasötik Preparatların Hazırlanması.....	37
5. TARTIŞMA	39
KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	44

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1-1: Dünyadaki çeşitli biber türlerinin scoville dereceleri	2
Tablo 1-2: Doğal ve sentetik kapsaisinoidlerin bağıl oranları, kimyasal yapıları ve Scoville dereceleri	3
Tablo 2-1: GC kolonları ve özellikleri (14)	13
Tablo 3-1: Referans standart	22
Tablo 3-2: Çözücüler	22
Tablo 3-3: Taşıyıcı Gaz	22
Tablo 3-4: Kalibrasyon standartlarının hazırlanışı	23
Tablo 3-5: Kalite kontrol numunelerinin hazırlanışı	23
Tablo 3-6: Ekipmanlar	24
Tablo 3-7: Destek ekipmanlar	24
Tablo 3-8: Hazırlanan validasyon serisi	29
Tablo 4-1: Ayarlama sonucunda beklenen kütleler, bağıl çoklukları ve izotop oranları	31
Tablo 4-2: Validasyon serilerinden elde edilen doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları	34
Tablo 4-3: Birinci validasyon serisinin gün içi hesaplamaları	35
Tablo 4-4: İkinci validasyon serisinin gün içi hesaplamaları	35
Tablo 4-5: Üçüncü validasyon serisinin gün içi hesaplamaları	36
Tablo 4-6: Validasyon serisinin günler arası hesaplamaları	36
Tablo 4-7: Kapsaisin kalibrasyon standartlarının günler arası doğruluk ve kesinlik hesaplamaları	36

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Kapsaisin'in molekül yapısı.....	4
Şekil 2-2: Kromatografik ayırıcılık	6
Şekil 2-3: Van Deemter Eğrisi	6
Şekil 2-4: Gaz kromatografisinin şematik gösterimi.....	8
Şekil 2-5: Kullanılan taşıyıcı gaz cinsinin kromatografik ayırım üzerine etkileri	9
Şekil 2-6: Enjeksiyon Bloğu	10
Şekil 2-7: Bölmeli ve Bölmesiz enjeksiyonda akış yolları.....	11
Şekil 2-8: GC-MS sisteminin şematik gösterimi	15
Şekil 2-9: Elektron impactı iyonizasyon (EI)	16
Şekil 2-10: Kuadropolün şematik gösterimi.	17
Şekil 2-11: Dizi dinot elektron çoğaltıcı (a) ve devamlı dinot elektron çoğaltıcı (b)	18
Şekil 3-1: Kapsaisin'in GC-MS de 28 µg/mL konsantrasyonda alınmış spektrumu	26
Şekil 4-1: 50 µg/mL kapsaisine ait örnek kromatogram	30
Şekil 4-2: Kapsaisin'in parçalanma ürünü	31
Şekil 4-3: Cihaza ait autotune sonuc raporu	32
Şekil 4-4: Farklı kolonlarda yapılmış denemelere ait bir kromatogram	33
Şekil 4-5: Boş enjeksiyonuna ait kromatogram	33
Şekil 4-6: 1. Validasyon serisinin 1. Kalibrasyon eğrisi.	34
Şekil 4-7: 5 µg/mL kapsaisin enjeksiyonuna ait bir kromatogram	37
Şekil 4-8: 23 µg/mL yakı enjeksiyonuna ait bir kromatogram.....	38
Şekil 4-9: 28 µg/mL kapsikum enjeksiyonuna ait bir kromatogram.....	38

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

GC: Gaz Kromatografisi

MS: Kütle Spektrometresi

GC-MS: Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi

EI: Elektron İyonizasyon

CI: Kimyasal İyonizasyon

HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

MS: Kütle spektrometrisi

ICH: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı (International Conference on Harmonisation)

mM: miliMolar

v: hacim

g: gram

mg: miligram

μ g: mikrogram

ng: nanogram

mL: mililitre

μ L: mikrolitre

nm: nanometre

C: konsantrasyon

SD: Standart sapma

RSD: Bağlı standart sapma

%CV: Varyasyon katsayısı

LOD: Teşhis sınırı

LOQ: Tayin sınırı

ST: Standart

KPS: Kapsaisin

KK: Kalite Kontrol

VAL: Validasyon

ÖZET

Daniş, İ. (2017). Kapsaisin'in Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) Yöntemi İle Farmasötik Preparatlarda Analizi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi İstanbul.

Bu tez çalışmasında, kapsaisin'in yakıda tayini için gaz kromatografisi kütle spektrometresi yöntemi geliştirilmiştir. Analiz %5 difenil %95 dimetil polisiloksan kolonda; yüksek saflıkta helyum gazı hareketli fazı ile 2 mL/dak akış hızında kütle dedektörü ile geliştirilmiştir. Kapsaisin için enjektör bloğu sıcaklığı 300 °C, transfer hattı sıcaklığı 300 °C ve kolon sıcaklığı 250 °C'dir. Maddenin doğrusal aralığı 5-50 µg/mL olarak bulunmuştur. Kapsaisin için gözlenebilirlik sınırı 3,46 ve tayin sınırı ise 5 µg/mL olarak bulunmuştur. Yöntem valide edilerek yakılarda kapsaisin analizine başarıyla uygulanmıştır. Bu yöntem kolay ve tekrarlanabilir olup yakı analizlerinde güvenle kullanılabilir niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: Kapsaisin, GC-MS, Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi, Yakı Analizi

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 55974

ABSTRACT

Daniş, İ. (2017). Determination of capsaicin from pharmaceutical preparat by using gas chromatography mass spectrometry. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Analytical Chemistry. Master Thesis. İstanbul.

In this study, gas chromatography mass spectrometric method has been developed for determination of capsaicin in plasters. Method has developed in %5 diphenyl %95 dimethylpolysiloxane column with high purity helium gas and 2 ml/min flow rate by using mass dedector. For capsaicin inlet temperature is 300 °C, transfer line temperature is 300 °C and column temperature is 250 °C. The linear range was found in between 5-50 µg/mL. For capsaicin the limit of dedection was found 3,46 and the limit of quantification was found 5 µg/mL respectively. The developed method has validated and successfully applied to plaster analysis. This method is simple, reproducible and can be used safely routine analysis of capsaicin in plasters.

Key Words: Capsaicin, GC-MS, Gas Chromatography Mass Spectrometry, Plaster Analysis

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Proje No: 55974

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Solanaceae familyasının Capsicum türünden olan kırmızı acı biber esas vatanı Güney Amerika olmakla birlikte Güney Asya devletleri, ülkemizin Güneydoğu Bölgesi gibi dünyanın çeşitli yerlerinde yaklaşık 7000 yıldır üretilmekte olup acı ve keskin tadı nedeniyle sofralarda baharat ve sos olarak kullanılmaktadır (1).

Baharat olarak Hindistan'da kişi başı günlük 2,5 g, Tayland'da 5 g ve Meksika'da 20 g acı biber tüketimi bildirilmiştir. Amerika ve Avrupa'da ise kişi başı günlük kapsaisin tüketiminin 1,5 mg olduğu tahmin edilmektedir (2).

Biberin hint mutfağında yoğun olarak kullanılıyor olması nedeniyle kırmızı acı biberin anavatanının Hindistan olduğu gibi bir yanlış kanı vardır. Fakat Hindistan'da da chilli olarak bilinen acı biber, ilk kez meksikalılar tarafından 7000 yıl önce üretilmeye başlanmıştır ve chilli Meksika kökenli bir kelimedir. Avrupalılar kırmızı acı biber ile amerikanın keşfinden sonra tanışmış; İspanya'ya 1493, İngiltere'ye 1548 ve Orta Avrupa'ya 1585'de gelmiştir. Acı biberin Avrupa'dan Hindistan'a Portekizliler tarafından 17. yy'da götürüldüğü sanılmaktadır. 16. yy'da Osmanlı zamanında Avrupa ülkeleri ile kurulan ilişkiler sonucunda acı biber önce İstanbul'a getirilmiş ve buradan Anadolu'ya yayılmıştır (3).

Tatlı ve acı biberin kimyasal farkı; acı biberde amid bağı, tatlı biberde ester bağı yer almaktadır. Acı biberde uçucu yağ, sabit yağ ve acılığı veren kapsaisin bulunmaktadır. Biber rengini kapsantin, kapsorubin, karoten, kapsaisinoid, kriptoksantin, lutein, zeaksantin gibi karotenoidlerden alır. Acılığını kapsaisinoid bileşiklerinden alır (4).

Scoville dereceleri, biberin acılık birimidir. Scoville sistemi, 1912 de Wilbur Scoville isimli bir farmakolog tarafından geliştirilmiştir. Test, bir miktar biberin tadı katılımcılar tarafından hissedilmeyecek duruma gelene kadar şekerli suyla seyreltilmesi ve acının hissedilmediği anda şekerli su ile biberin oranlarının hesaplanmasıyla yapılır. Acı, kapsaisin adlı maddenin kemoreseptör sinir uçlarını uyarması sonucu hissedilir. Kapsaisin içeren meyvaler acı biber olarak ifade edilir ve Scoville dereceleri de kapsaisin oranlarının hesaplanmasına dayanır. Dünyadaki çeşitli biber türlerinin Scoville dereceleri Tablo 1-1'de verilmiştir (5).

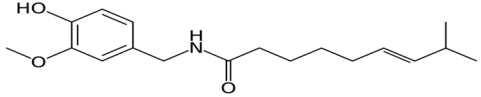
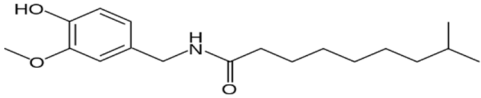
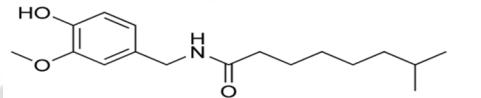
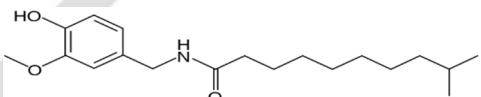
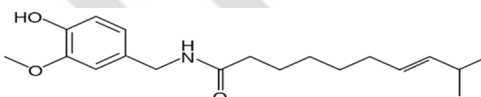
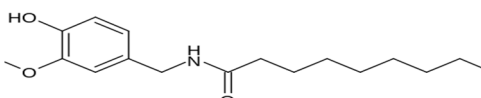
Tablo 1-1: Dünyadaki çeşitli biber türlerinin scoville dereceleri

Scoville derecesi	Biber türü
15,000,000–16,000,000	Saf Kapsaisin (<i>n-vanillil-8-metil-6-(e)-noneamid</i>) (Kimyasal hali)
9,100,000	Nordihidroksapsaisin (kimyasal hali)
2,000,000–5,300,000	Birleşik Devletler standartlarına uygun biber gazı
1,500,000	Caroline Reaper - <i>Capsicum chinense</i> (Dünyanın en acı biberi)
855,000–1,041,427	Naga Jolokia - <i>Capsicum chinense</i> (Dünyanın 2. en acı biber meyvesi)
876,000–970,000	Dorset Naga - <i>Capsicum chinense</i>
350,000–577,000	Red Savina™ - <i>Capsicum chinense</i>
100,000–350,000	Habanero biberi - <i>Capsicum chinense</i>
100,000–350,000	Scotch Bonnet - <i>Capsicum chinense</i>
100,000–200,000	Jamaika Acı Biberi
50,000–100,000	Thai biberi, Malagueta biberi - <i>Capsicum frutescens</i> , Chiltepin biberi - <i>Capsicum annuum</i>
30,000–50,000	Cayenne biberi - <i>Capsicum annuum</i> , Aji Peru biberi - <i>Capsicum baccatum</i> , Tabasco biberi - <i>Capsicum frutescens</i>
10,000–23,000	Serrano biberi
7000–8000	Tabasco sosu (Habanerolu)
5000–10,000	Wax biberi
2500–8000	Jalapeno biberi - <i>Capsicum annuum</i>
2500–5000	Tabasco sosu (Tabascolu)
1500–2500	Rocotillo biberi
1000–1500	Poblano biberi - <i>Capsicum annuum</i>
600–800	Tabasco sosu (Yeşil biberli)
500–1000	New Mexico Anaheim biberi
100–500	Pimento biberi (Tatlı kırmızı biber) - <i>Capsicum annuum</i> , Pepperoncini - <i>Capsicum annuum</i>
0-100	Acısız, Dolmalık biber - <i>Capsicum annuum</i> .

Sadece kapsikum meyvalerinden elde edilebilen kapsaisin kristal formda ilk kez 1816'da Bucholz ve bundan 30 yıl sonra Thresh tarafından elde edilmiştir. 1878'de Högyes, capsicol olarak adlandırdığı bu molekülün mukoz membranlar ile temas ettiğinde yanmaya neden olmasının yanında gastrik salgıda da yükselişe neden olduğunu kanıtlamıştır. Kapsaisin yapısı kısmen 1919 yılında Nelson tarafından açıklanmış ve 1930 yılında ilk kez Spath ve Darling tarafından sentezlenmiştir. Kosuge ve Inagaki acı biberden kapsaisinoid adı verilen kapsaisine benzeyen moleküller izole etmişlerdir (1).

Acı biberde kapsaisin, nordihidroksapsaisin, homodihidroksapsaisin, dihidroksapsaisin ve homokapsaisin olarak adlandırılan kapsaisinoidler bulunur. Bunlardan temel kapsaisinoidler olan kapsaisin ve dihidroksapsaisin tat ve sinirlere etkisi diğer kapsaisinoidlere (nordihidroksapsaisin, homodihidroksapsaisin ve homokapsaisine) göre daha fazladır. Doğal ve sentetik kapsaisinoidlerin bağıl oranları, kimyasal yapıları ve scoville dereceleri Tablo 1-2'de verilmiştir (6).

Tablo 1-2: Doğal ve sentetik kapsaisinoidlerin bağıl oranları, kimyasal yapıları ve Scoville dereceleri

Kapsaisinoid İsmi	Bağıl Oran	Scoville Acı Derecesi	Kimyasal Yapı
Kapsaisin	69%	16,000,000	
Dihidro-kapsaisin	22%	15,000,000	
Nordihidro-kapsaisin	7%	9,100,000	
Homodihidro-kapsaisin	1%	8,600,000	
Homokapsaisin	1%	8,600,000	
Nonivamid (Sentetik)		9,200,000	

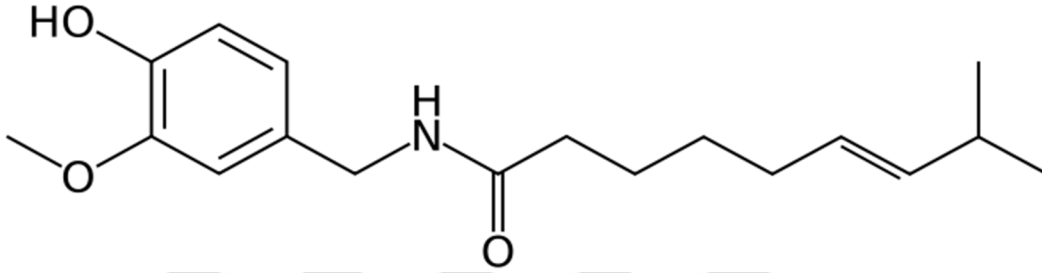
Yapılan literatür araştırmalarında bu ilaç etken maddesinin farmasötik preparatlarda analiz yöntemine ihtiyaç olduğu görülmüş ve bu nedenle bu tez çalışması GC-MS ile planlanmıştır.

Bu özgün yüksek lisans tezi kapsamında kapsaisin'in farmasötik preparatlarda analizi için gaz kromatografisi-kütle spektrometresi kullanılarak yeni bir yöntem geliştirilecektir. Önerilen yöntemin validasyonu yapılacak ve ilaç etken maddesinin farmasötik preparatlarda analizlerine uygulanabilirliği test edilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kapsaisin Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

Kapsaisin patlıcangiller ailesinden acı biber'in meyvalarından sentezlenen bir harici analjeziktir. Kapsaisin acı bibere keskin tadını veren esas maddedir. Kapsaisin genellikle artrit, hafif ağrılar, kas ve eklem ağrılarının tedavisinde kullanılan preparatların bileşimine girer (7).



Şekil 2-1: Kapsaisin'in molekül yapısı

Kapsaisin'in IUPAC ismi (E)-N-(4-Hidroksi-3-metoksibenzil)-8-metilnon-6-enamid dir. Kapsaisin'in molekül ağırlığı 305,41 kapalı formülü $C_{18}H_{27}NO_3$ dür. Kapsaisin beyaz renkli bir tozdur. Çok uçucu ve yakıcıdır. Erime noktası $62\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'dir. Kaynama noktası $210\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'dir. Suda 0,0013g/100mL oranında çözünür. Alkol, eter ve benzende çözünür; karbon sülfür, hidroklorik asit ve petrolde az çözünür (7).

2.2. Kapsaisin Farmakolojisi ve Etki Mekanizması

Kapsaisin periferik duyuşal nöronlarda P maddesinin bitirilmesini sağlar ve yeniden çoğalmasına engel olur. P maddesi dermis ve epidermisin sinirsel donanımı sağlayan C tipi iletim hızı yavaş, miyelinsiz sinir liflerinde bulunur. P maddesinin ağrı impulslarının periferden santral sinir sistemine taşınmasında görev yapan esas kimyasal mediyatör olduğuna inanılmaktadır. P maddesi eklem dokusu içine de salıverilir ve burada romatoid artrit gelişimiyle ilgili enflamatuvar maddeleri aktive eder. Kapsaisin sözü edilen nöronlardaki P maddesini bitirerek lokal ağrı impulslarının beyine gitmesini engeller ve böylece cilt ve eklem dokusunun ağrıya karşı duyarlılığını azaltır. Kapsaisin tedavisi kesildiğinde P maddesi yeniden çoğalır ve nöronal duyarlık normal düzeyine geri döner (7).

2.3. Yan Etkileri ve Genel Toksikite

En çok görülen yan etki uygulanan bölgede hissedilen yanma ve batma hissidir. Ancak bu daha sonra azalmaktadır. Bunun yanı sıra kapsaisin kan basıncında artışa da neden olabilmektedir. Uygulanan bölgede kızarıklık ve kaşıntıya neden olabilir (8).

2.4. Gaz Kromatografisi (GC)

Kromatografi; karışımda halinde bulunan maddelerin, hareketli faz ile sabit faz arasında dağılma, adsorbsiyon veya iyon değişimine ve buna benzer bazı mekanizmalara bağlı olarak ayrılması temeline dayanır. Gaz kromatografisi, uçucu olan veya uçucu hale getirilebilecek maddelerin belirlenen bir sıcaklıkta, bir taşıyıcı gaz yardımıyla, sabit faz içinde ayrılmaları temeline dayanır (9).

Gaz kromatografisinde hareketli faz inert bir gazdır ve adını buradan almıştır. Gaz kromatografisi sabit fazın yapısına göre ikiye ayrılır.

1- Sabit fazı katı olan gaz-katı kromatografisi

2- Sabit fazı sıvı olan gaz-sıvı kromatografisi

Gaz-katı kromatografisinde, maddeler sabit katı faz üzerinde ve belirli sıcaklıklarda adsorpsiyon-desorpsiyon temeline dayanarak ayrılırlar. Bu yöntemde pikler çoğunlukla kuyrukludur. Bu piklerin birbirlerinden ayrılması oldukça güçtür. Bu sebeple gaz-katı kromatografisi günümüzde kullanımı azdır (10,11).

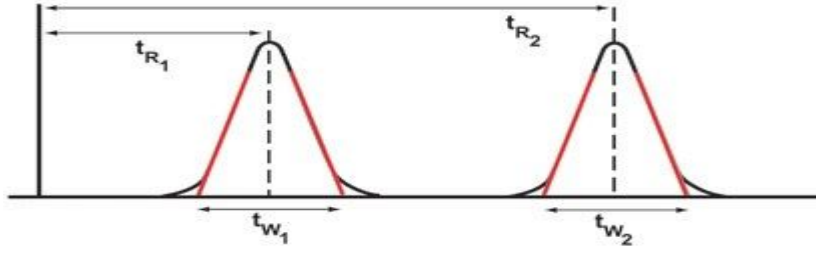
Gaz-sıvı kromatografisinde ise, gözenekli bir yüzeye sıvı polimer veya siloksan emdirilerek oluşturulan sıvı sabit faz ve hareketli fazı gaz olan bir türüdür. Günümüzde gaz-sıvı kromatografisi ilaç, gıda maddeleri, vitaminler, şekerler, yağlar ve farklı organik bileşiklerinin analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır (10,11).

Çalışmalarımız gaz-sıvı kromatografisi ile yürütülmüştür.

Kromatografide alıkonma zamanı (t_R) örnek enjekte edildiği andan itibaren dedektörde sinyalin görüldüğü ana kadar geçen süre olarak tanımlanır. Molekül içi kuvvetler, moleküller arası kuvvetler, taşıyıcı gazın hızı, sıcaklık, molekül büyüklüğü ve polarite alıkonma zamanına etki eder (9).

Kromatografide Van Deemter eşitliği ile kolon etkinliği ve ayırıcılık önemlidir. Ayırıcılık; kromatografide iki maddenin birbirinden ayrılması olarak tanımlanır(9).

Kromatografik ayırıcılık: $(R) = 2 (t_2 - t_1) / W_2 + W_1$ (Şekil 2-2)



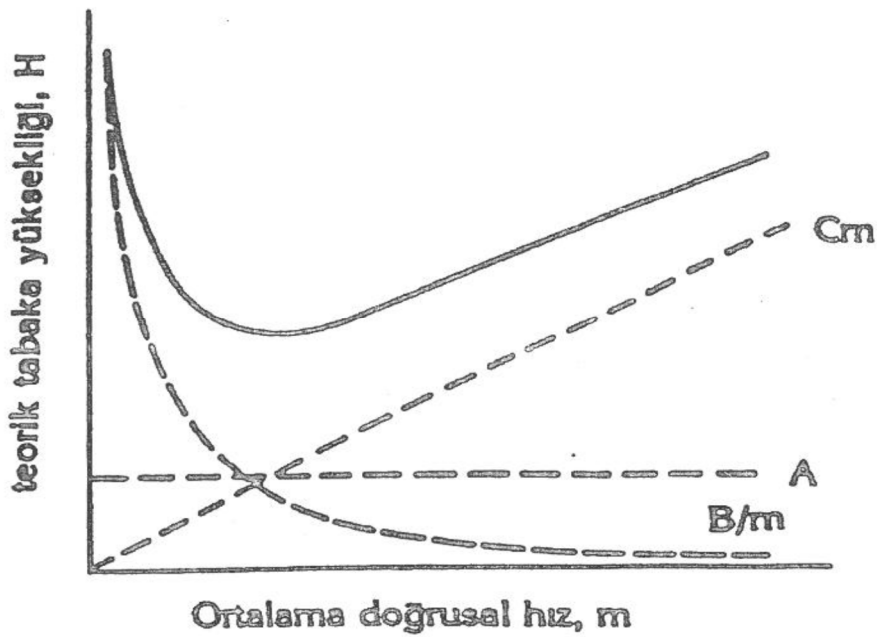
Şekil 2-2: Kromatografik ayırıcılık

t_1 , t_2 alıkonma zamanları, W_2+W_1 pik genişlikleridir. Ayırıcılık 1'den büyük değerlerde iyidir. Ayırıcılık, kolon boyunca hareket eden bileşenlerin kolon ile etkileşmesi ve dar pikler vermesi ile anlaşılır. Dar pikler elde edildikçe kolon etkinliği artar. Kolonda ayırıcılık, teorik tabaka sayısına bağlıdır (9).

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_h} \right)^2$$

N , teorik tabaka sayısı, W_h , pik genişliği

Kolonun kromatografik performansını belirten esas eşitlik 1956 yılında Hollandalı bilimadamı Van Deemter tarafından geliştirilmiştir. Bu eşitlik verimliliği hareketli faz doğrusal hızının (μ) bir fonksiyonu olarak açıklar (9). (Şekil 2.3)



Şekil 2-3: Van Deemter Eğrisi

Klasik Van Deemter eşitliği aşağıdaki gibidir.

$$H = A + B/\mu + C\mu$$

H: Teorik tabaka yüksekliği

A: Eddy difüzyon katsayısı

B: Boyuna difüzyon katsayısı

C: Kütle transfer katsayısı

μ : Taşıyıcı gazın akış hızı

Dolgu kolonlarda bu A terimi geçerlidir, kılcal kolonlarda ise geçerli değildir (9).

Kılcal kolon için Van Deemter eşitliği $H = B/\mu + C\mu$

Kolonun etkinliği, kolon uzunluğu ve teorik tabaka sayısı ile ilgilidir. Kolonda N ne kadar büyükse yani H ne kadar küçükse, kolon verimi o kadar yüksek olur.

$$H = L / N$$

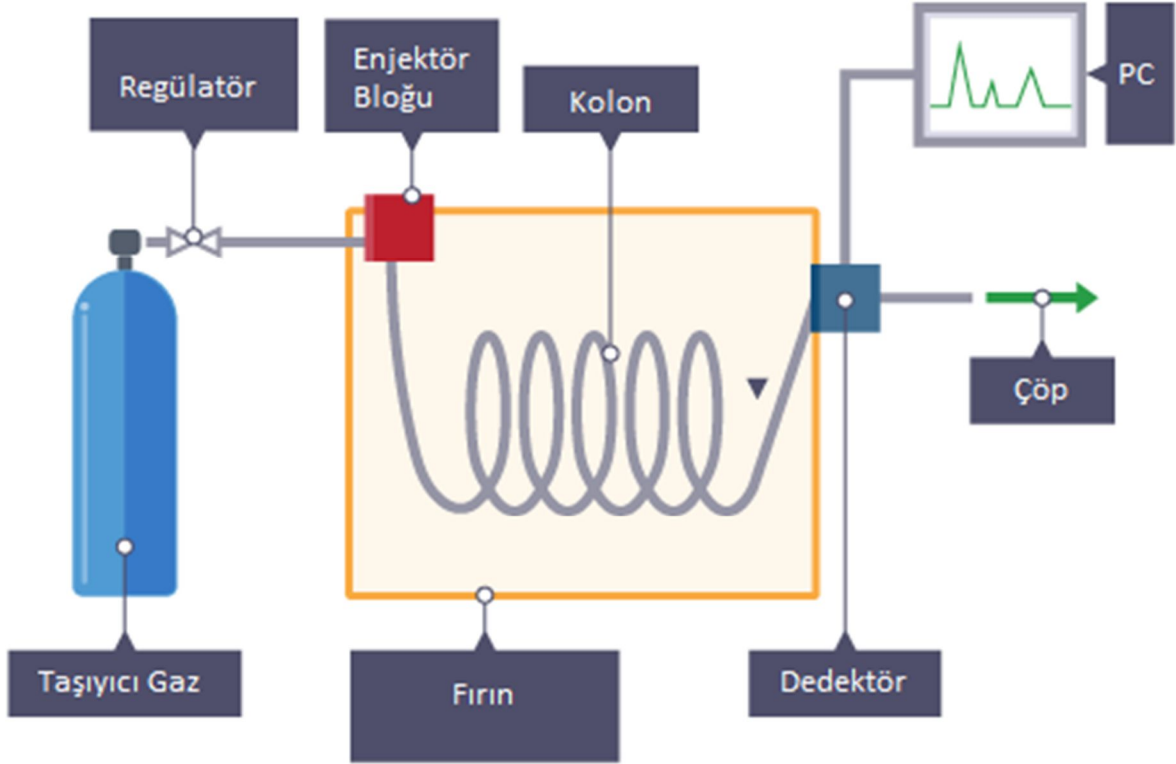
L: Kolon uzunluğu

N: Teorik tabaka sayısı

H: Teorik tabaka eşdeğer yüksekliği

Gaz kromatografisi cihazı genel olarak altı bölümden oluşur. (Şekil 2-4).

1. Taşıyıcı gaz ve regülatör sistemi
2. Enjektör Bloğu
3. Fırın
4. Ayırma kolonu
5. Dedektör
6. Bilgisayar ve yazıcıdan oluşmaktadır.



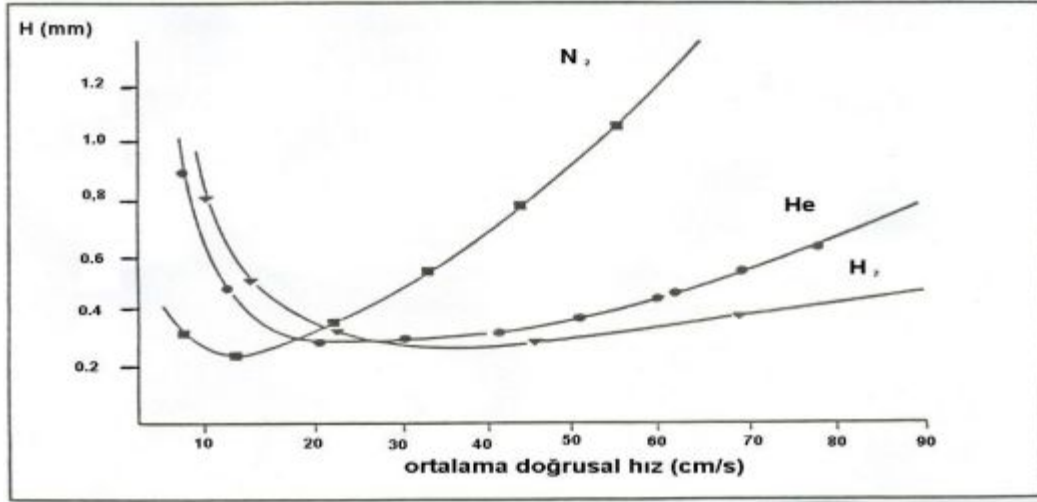
Şekil 2-4: Gaz kromatografisinin şematik gösterimi.

2.4.1. Taşıyıcı Gaz ve Regülatör Sistemi

Gaz Kromatografisinde taşıyıcı gaz olarak çoğunlukla azot, helyum ve hidrojen gazı kullanılır. Taşıyıcı gaz, enjekte edilen numunenin kolondan taşınmasını ve madde ya da maddelerin sabit fazla etkileşimini sağlar. En yüksek verimlilik azot gazı kullanılarak elde edilmektedir (minimum H). Bu minimum değer düşük taşıyıcı gaz doğrusal hızlarında görülmekte ve doğrusal artan hızla orantılı olarak, verimlilik de düşmektedir. Bu nedenle azot gazı, kılcal kolonların kullanıldığı GC'de çok fazla hareketli faz olarak kullanılmaz. Diğer yandan hidrojen gazının daha düşük viskozitesine bağlı olarak taşıyıcı gaz hızındaki değişiklikler kolon ayırıcılığını belirgin bir şekilde etkilemeyecektir. Hidrojen verimlilik eğrisinin minimumu daha geniş bir aralıkta ve daha yüksek doğrusal hızlarda ortaya çıkmaktadır. Ancak hidrojen gazının patlayıcı özelliği engelleyici bir etkidir. Bu nedenle çalışmalarda azot ve hidrojen gazının dezavantajlarını göstermeyen ve verimlilik eğrisinin minimumu azot gazına göre daha geniş aralıkta ve daha yüksek doğrusal hızlarda ortaya çıkan helyum gazı yaygın olarak kullanılmaktadır. Kolon verimliliğini etkileyen taşıyıcı gaz; inert ve ucuz olmalı, toksik olmamalı ve ayrıca detektöre uygun olmalıdır. Taşıyıcı gazlar basınçlı tüpler ile sağlanır. Gazın cihaza gönderilebilmesi için basınç regülatörleri kullanılır.

Ayrıca, nem ve diğer safsızlıkların tutulması için, sistemde bir moleküler elek de bulundurulur (9,12).

Çalışmamızda taşıyıcı gaz olarak helyum gazı kullanılmıştır.



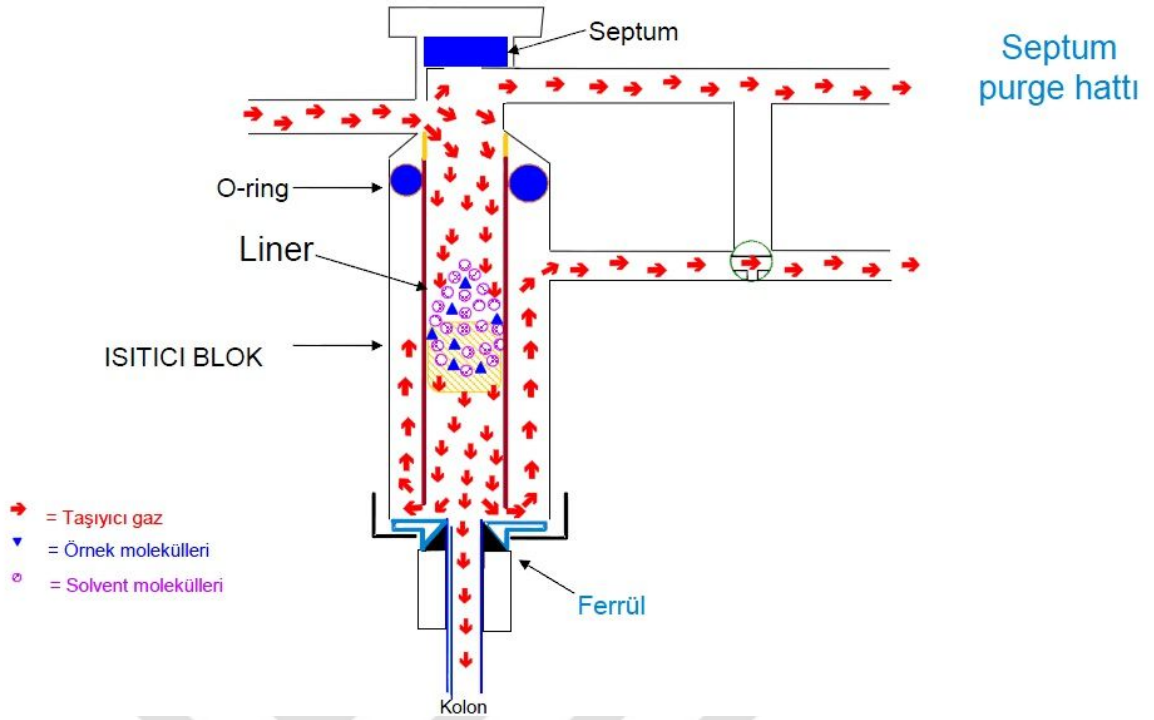
Şekil 2-5: Kullanılan taşıyıcı gaz cinsinin kromatografik ayırım üzerine etkileri

2.4.2. Enjektör Bloğu

Enjeksiyon bloğunda kolona gönderilecek maddenin miktarı belirlenir. Bu çeşitli enjeksiyon türleriyle sağlanır. Enjeksiyon bölümünden numune beş şekilde verilmektedir (9).

1. Bölmeli (split) enjeksiyon
2. Bölmesiz (splitless) enjeksiyon
3. Kolona enjeksiyon
4. Doğrudan enjeksiyon
5. Sıcaklık programlı buharlaşmalı enjeksiyon

Enjeksiyon bloğunun çalışma sistemi Şekil 2-6'da gösterilmiştir (13, 14).



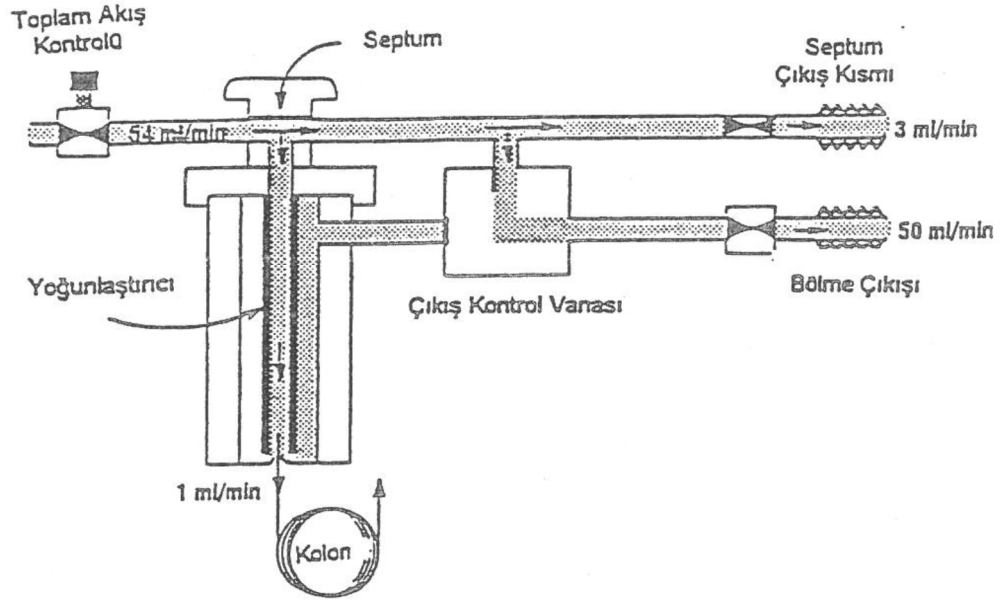
Şekil 2-6: Enjeksiyon Bloğu

Bölmeli (split) enjeksiyonda numune ısıtılır, buharlaştırılır ve sadece az bir miktarı analiz için kolona geçer büyük miktarı ise atık olarak atılır. Bölme oranı analist tarafından kontrol edilir. Bu teknikle dar piklerin oluşma olasılığı yüksektir. Bölmeli enjeksiyon daha çok yüksek derişimlerde uygulanır. Böylece kolonun kirlenmesi engellenmiş olur (15).

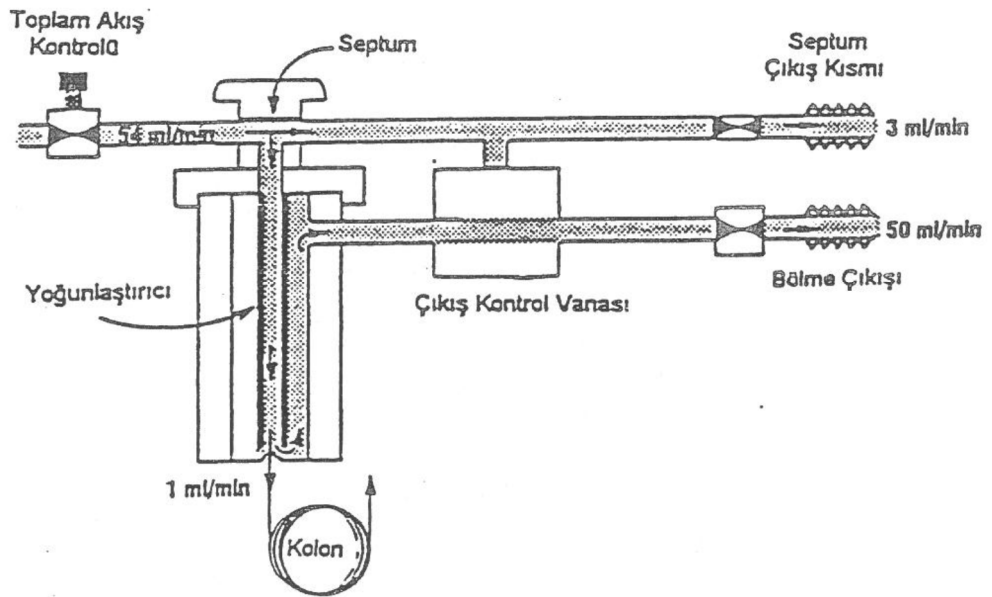
Bölmesiz (splitless) enjeksiyonda enjektörün bölme kapakçığının enjeksiyon anında kapatılması ile çalışmaktadır. Örnek ısıtılır, buharlaştırılır ve örneğin 95% den fazlası kolona gider. Bu teknik seyreltik örneklerde kullanılır (15).

Bölmeli (split) ve Bölmesiz (splitless) enjeksiyonlarda akış yolları Şekil 2-7'de gösterilmektedir (9).

A. Bölmesiz Enjeksiyon



B. Bölmeli Enjeksiyon



Şekil 2-7: Bölmeli ve Bölmesiz enjeksiyonda akış yolları

Çalışmamızda bölmeli (split) enjeksiyon kullanılmıştır.

Enjektörün numuneyi liner'a düzgün bir şekilde bırakması için enjeksiyon bloğuna yerleştirilen, enjektörün girmesini sağlayan tıpayı septum denir. Septum, taşıyıcı gaz kaçağını, sisteme hava ve nem girişini önler. Septumdan sonra numune liner'a gelir. Liner numunenin homojen buharlaşmasını ve taşıyıcı gaz ile karışmasını sağlar. Liner içinde bulunan cam veya kuartz pamuğu, kolonda tıkanmaya yol

açabilecek küçük partiküllerin tutulmasını ve homojenizasyonu sağlamaktadır. Böylece düzgün pikler elde edilerek pik alanı hesaplamalarında tekrarlanabilirlik ve doğruluk artmaktadır (9).

2.4.3. Fırın

GC'de alıkonma zamanının ayarlanabilmesi için fırın sıcaklığı değiştirilir. Sıcaklıktaki 20-30 °C'lik bir artış alıkonma zamanının 2-3 kat azalmasına neden olur. Piyasada mevcut GC fırınlarının en yüksek sıcaklık limiti 450 °C olduğundan, sıcaklık alıkonma zamanını 100 kat kadar değiştirebilir (9).

2.4.4. Kolon

Enjekte ettiğimiz bileşenlerin birbirlerinden ayrıldığı, nitel ve nicel analizin gerçekleştiği bölümdür. Dolgulu kolon ve kılcal kolon olmak üzere iki tür GC kolonu bulunmaktadır. Dolgulu kolonlar, cam veya metalden yapılmıştır. Teorik tabaka sayısı kılcal kolonlarınkinden azdır. Kılcal kolonlarda ise dolgu yerine sıvı faz kendisi veya destek maddesi ile birlikte kolon iç çeperlerine bağlanmıştır. Kılcal kolonların çıkmasıyla dolgu kolonların kullanımı azalmıştır (9).

Gaz kromatografisinde yaygın olarak kullanılan kolonlar ve özellikleri Tablo 2-1'de gösterilmektedir.

Tablo 2-1: GC kolonları ve özellikleri (14)

Kompozisyon	Polarite	Aplikasyonlar	Sıcaklık Limitleri
%100 dimetil polisiloksan (Gum)	Apolar	Fenoller, Hidrokarbonlar, Aminler, Sülfür bileşikleri, pestisitler	-60°C...325°C
%100 dimetil polisiloksan (Fluid)	Apolar	Amino asit türevleri, Esansiyel yağlar	0°C...280°C
%5 difenil %95 dimetil polisiloksan	Apolar	Yağ asitleri, Metil esterler, Alkaloidler, İlaçlar, Halojenli bileşikler	-60°C...325°C
%7 siyanopropil %7 fenil polisiloksan	Orta	İlaçlar, Steroidler, Pestisitler	-20°C...280°C
%50 fenil %50 metil polisiloksan	Orta	İlaçlar, Steroidler, Pestisitler, Glikollar	60°C...240°C
%50 siyanopropilmetil %50 fenilmetil polisiloksan	Orta	Yağ asitleri, metil esterler, Alditol asetatlar	60°C...240°C
%50 trifloropropil polisiloksan	Orta	Halojenli bileşikler, Aromatikler	45°C...240°C
Polietilen glikol-TPA modifiye	Polar	Asitler, Alkoller, Aldehitler, Akriyatlar, Nitriller, Ketonlar	60°C...240°C
Polietilen glikol	Polar	Serbest asitler, Alkoller, Eterler, Esansiyel yağlar, Glikollar, Çözücüler	60°C...220°C

Çalışmamızda %5 difenil %95 dimetil polisiloksan kapiler kolon kullanılmıştır.

2.4.5. Dedektör

GC dedektörleri, taşıyıcı gaz ile hareket ederek kolon çıkışına gelen bileşenlerin elektrik sinyaline çevrilip tanınmasına yarayan elektronik sistemlerdir. Bazı GC dedektörleri şunlardır (16, 17).

1. Termal İletkenlik Dedektörü (TCD)
2. Alev İyonizasyon Dedektörü (FID)
3. Nitrojen Fosfor Dedektörü (NPD)
4. Elektron Yakalama Dedektörü (ECD)
5. Atomik Emisyon Dedektörü (AED)
6. Fotoiyonizasyon Dedektörü (PID)
7. Alev Fotometrik Dedektör (FPD)
8. Elektrolitik İletkenlik Dedektörü (ELCD)
9. İnfrared Dedektörü (IRD)
10. Kütle Spektrometre Dedektörü (MSD)

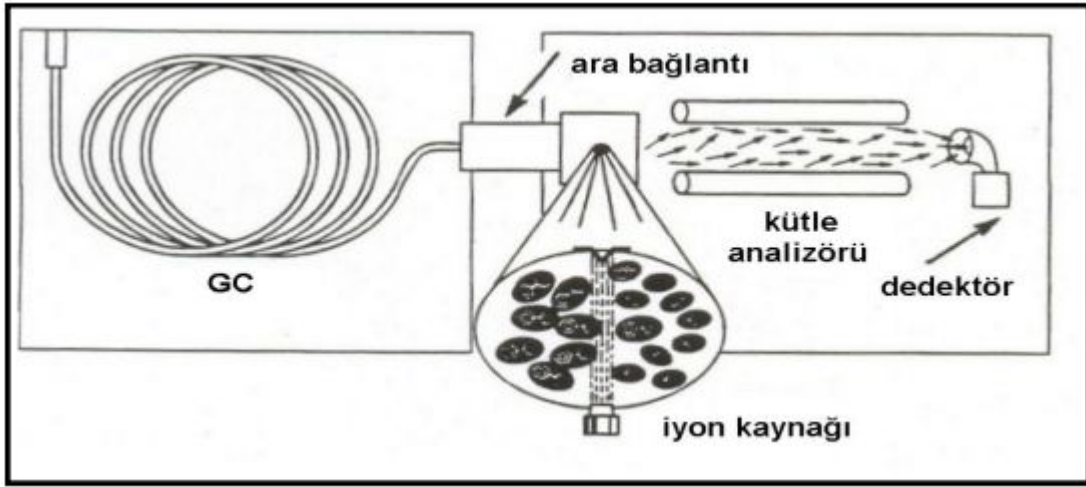
Çalışmamızda kütle spektrometresi dedektörü kullanıldığı için sadece bu dedektör incelenecektir.

2.5. Kütle Spektrometresi (MS)

Kütle spektrometresi uzun süredir kullanılmakta olup ilk kez bir kütle spektrumu 1898'de Wien tarafından elde edilmiştir. 1905'de ise Thompson kararlı izotopların bulunduğunu göstermek için yaptığı deneyde farklı pozitif iyonların kütle/yük (m/z) oranına göre farklı parabolik yörünge kat ettiğini göstermiştir. 1957 yılında Holmes ve Morrel tarafından GC ile entegre edilmiştir. Tüm organik bileşiklerde ortak bir fiziksel özellik olan kütleye cevap verebilmesi en büyük özelliğidir. Kütle spektrometresini temelini açıklayacak olursak; gaz fazındaki numune, yüksek enerjili elektronlarla çarpıştıktan sonra elektronlarını kaybederek pozitif yüklü çeşitli iyonlar haline dönüşür. Hızlandırılan bu katyonlar manyetik ve/veya elektrik alanında saptırılır. İyonların sapması; kütlelerine, yüklerine ve hızlarına bağlıdır. Eğer yük, hız ve saptırıcı güç sabit ise, sapma ağır parçacıklarda az hafif parçacıklarda çok olacaktır (9, 18).

Kütle spektrometresi 5 kısımdan oluşur (Şekil 2-8).

1. Ara Bağlantı
2. İyon Kaynağı
3. Kütle Analizörü
4. Dedektör
5. Vakum Sistemi



Şekil 2-8: GC-MS sisteminin şematik gösterimi

2.5.1. Ara Bağlantı

GC ile MSD arasında basınç farkı nedeniyle bir ara bağlantıya gerek vardır. GC atmosfer basıncında, MS ise çok daha düşük basınçta ($10^{-6} - 10^{-8}$ torr) çalışmaktadır. MS'deki vakum koşullarının bozulmasını engellemek için ara bağlantı kullanılır (9).

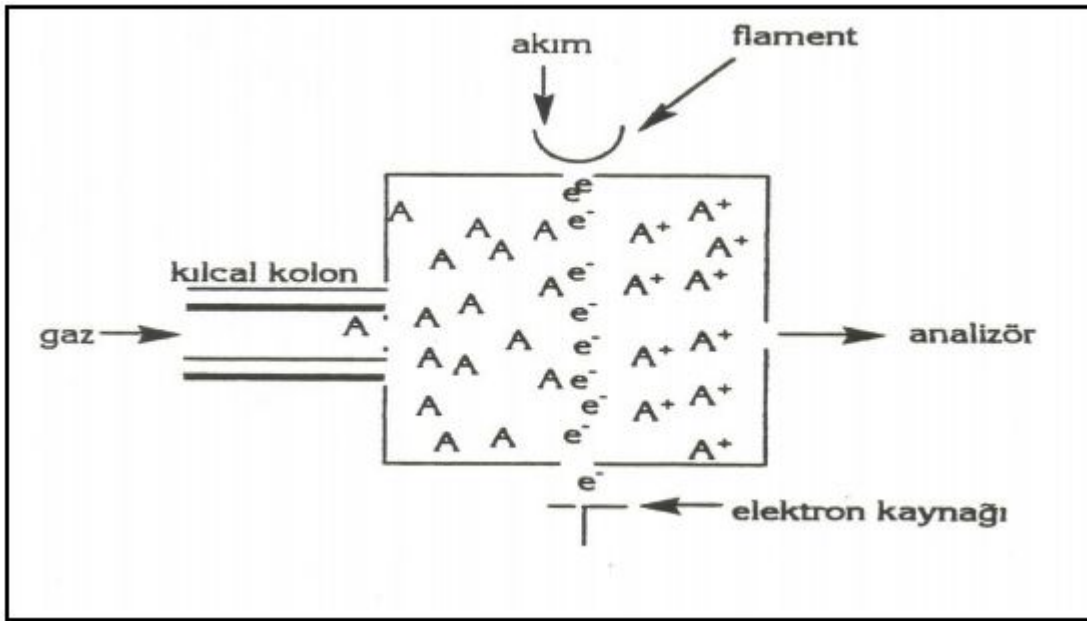
2.5.2. İyon Kaynağı

Moleküllerin iyonlaştığı bölmedir. Bir molekül, atom veya iyondan bir elektron uzaklaşmasıyla iyonizasyon gerçekleşir. Uçucu bileşikler için iki tür iyon kaynağı mevcuttur.

1. Elektron Impact İyonizasyon (EI)
2. Kimyasal İyonizasyon (CI)

Dedektörümüzde elektron impact iyonizasyon (EI) iyon kaynağı mevcuttur. Bu yüzden bu iyon kaynağı açıklanacaktır (Şekil 2-9).

Elektron impact iyonizasyon (EI), molekülün enerjili elektronlarla bombardıman edildiği iyonizasyon yöntemi olarak tanımlanır. Sıcak bir filamentten çıkan elektronlar bölme boyunca odaklanacaklar ve 70 eV'luk bir potansiyele sahip bir elektrot tarafından çekilirler. Böylece herbir elektron 70 eV'luk bir enerji kazanır ve ortama giren numune ile çarpışarak bir seri parçalanma tepkimeleri oluşturur. $M + e^- \rightarrow M^+ + 2e^-$ Elektronun sahip olduğu enerji bütün bağları kırmak için yeterli enerjidir. 70 eV'luk enerjinin kullanılması kararlı, tekrarlanabilir ve moleküle özgü kütle spektrumlarının oluşmasını sağlar (9, 18).



Şekil 2-9: Elektron impact iyonizasyon (EI)

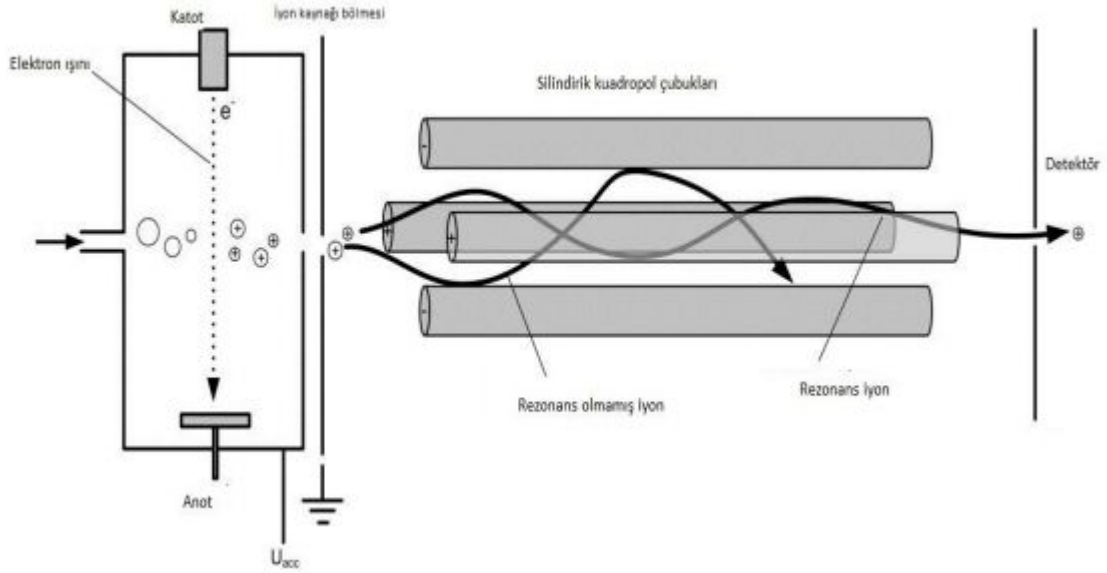
2.5.3. Kütle Analizörü

İyon kaynağından çıkan ürünler analizöre yönlendirilir. Analizör, kütle/yük (m/z) oranlarına göre maddelerin ayırımını sağlar (9, 18)

Dedektörümüzde kuadrupol analizör (Q) mevcuttur (Şekil 2-10).

Güçlü bir gaz kromatografisi analizörüdür. Örnek kolondan çıktıktan sonra, kütlelerin girişinde bulunan bir transfer hattından geçer ve bir elektron-şok iyon kaynağıyla veya kimyasal iyonizasyonla iyonlaştırılır, parçacıklara ayrılır. Dört kutuplu kuadrupol analizörler simetrik olarak yerleştirilmiş dört paralel çubuktan oluşur. Kuadrupolün belirli bir kütle aralığında tarama yapması ve ayırım için doğru akım (DC) ve radyo frekansı (RF) voltaj uygulanır. X eksenindeki çubuklara pozitif, y eksenindeki çubuklara negatif gerilim uygulanarak iyon halindeki örnek moleküllerinin çubuklar

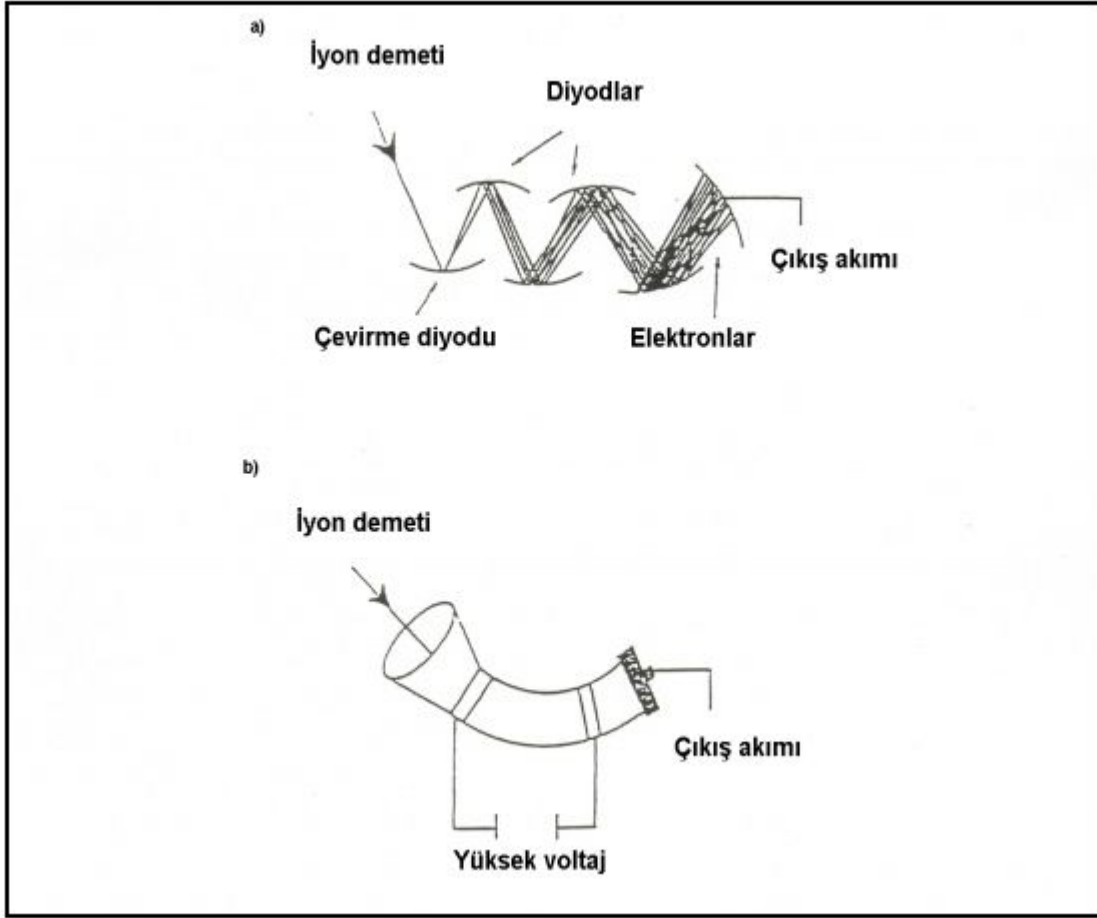
arasında rezonansa gelmesi sağlanır. DC/RF kuadropol voltajları değiştirilerek iyonlar taranır. RF alanda, sadece seçilmiş kütle/yük oranındaki iyonlar doğru osilatör yolu izlerler (9, 18).



Şekil 2-10: Kuadropolün şematik gösterimi.

2.5.4. Dedektör

Kütle analizörlerinden geçen iyonlar elektron çoğaltıcı dedektöre gelir. Burada çarpışma sebebiyle oluşan akım, önce analog voltaja, daha sonra da dijital sinyale dönüşür. En çok kullanılan dedektörler dizi dinot elektron çoğaltıcı (Şekil 2.11.a) ve devamlı dinot elektron çoğaltıcılardır (Şekil 2.11.b). Dizi dinot elektron çoğaltıcıda dinod dizileri vardır. Bunlar, artan potansiyeller altında tutulurlar, sonuçta bir dizi amplifikasyon meydana gelir. Devamlı dinot elektron çoğaltıcıda boynuz şeklinde sürekli bir dinod bulunur; dinod yüzeyinde tekrarlanan çarpışmalar sonucu amplifikasyonlar meydana gelir (9, 16).



Şekil 2-11: Dizi dinot elektron çoğaltıcı (a) ve devamlı dinot elektron çoğaltıcı (b)

2.5.5. Vakum Sistemi

MS $10^{-6} - 10^{-8}$ torr civarında çalışmaktadır. Cihazımızda bu basıncı sağlayacak pompa kullanılmaktadır.

2.6. Analiz Yöntemleri

Costinescu ve arkadaşları *Capsicum Annum L'nin* iki farklı çeşidini, RP-HPLC metodu kullanarak kapsaisin içeriğini incelemişlerdir. En yüksek içerik kurutulmuş yeşil biberde bulunmuş (85.262 mg/L), bunu (75.457 mg/L) ile daha önceden çekirdekleri ve sapı alınmış kurutulmuş kırmızı biber takip etmiştir (19).

Daood ve arkadaşları, baharat olarak kullanılan biber ürünlerinde kapsaisin ve dihidro türevinin ayrımı ve belirlenmesi için 20 dakikada floresansla ve 35 dakikada kütle spektrometresi dedeksiyonuyla kolay ve etkili yüksek performanslı sıvı kromatografisi metodu geliştirilip ve valide edildi. Ayrım ters faz kromatografisiyle çapraz bağlı uçları kapalı adsorban ile 1:1 asetonitril-su veya asetonitril-%1 lik formik asit içeren elüentle izokratik şartlar altında gerçekleştirilmiştir. Standart madde

çözeltilerinde kapsakinoitlerin dedeksiyon ve tayin limitleri 2 ile 10 ng/mL aralığındadır. Floresans tayini ile en düşük dedekte edilebilen kapsaisin miktarı 1 µ mg/g altında biber tozunda bulunmuştur (20).

Kapsaisin, (trans-8-metil-N-valilil-6-nonenamid), dihidrokapsaisin (8-metil-N-vanililonamid) ve kapsikum ekstarktlarının ana kapsasinoit içeriklerinin miktar tayini yapmak için bir ters faz yüksek – performanslı sıvı kromatografi metodu geliştirilmiştir. Kromatografik ayrılma C8 kolonda , % 40 (v/v) asetonitril ve %60 (v/v) ortofosforik asit çözeltisinden oluşan izokratik mobil faz 1,5 ml/dk. akış hızıyla kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elue olan maddelerin konsantrasyonları 281 nm dalga boyunda diod-array dedektör kullanılarak bakılmıştır. Metot; validasyon parametrelerine göre değerlendirilmiştir ve, metodun 0,0005-0,5000 mg/ml konsantrasyon aralığında her iki kapsasinoit için doğrusal olduğu bulunmuştur (21).

Ashwini ve arkadaşları kapsaisinin tayini için geliştirdikleri ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile ayırım Hypersil BDS C8, 4,6×250mm, 5µm kolonu kullanarak, fosfat tamponu 6.8, metanol, asetonitril 30:60:10 V/V/V 1mL/dk akış ile gerçekleştirilmiştir. Dedekdiyön 281 nm de gerçekleştirilmiştir. Doğrusallık 50-150 µg/mL aralığında bulunmuştur. Kapsaisin için korelasyon katsayısı 0.998 bulunmuştur (22).

Biberlerin içindeki ana kapsaisinoitleri ayırmak için yeni bir kromatografik yöntem geliştirilmiştir. Su içinde % 0,1 asetik asit ve metanolde % 0,1 asetik asit çözeltileri mobil fazda gradient olarak ayırım saptanmıştır. Sonuçta kapsaisinoitlerin 3 dakikadan daha kısa bir sürede tamamen ayrılabilmesini sağlamıştır. Son olarak, bu yöntem, İspanya'da üretilen 16 acı biber numunesindeki başlıca kapsaisinoitlerin belirlenmesinde uygulanmıştır (23).

Kapsaisin preparatif olarak ayrılmış ve kapsikum oleoresinden sulu ekstraksiyon ve kromatografi yöntemiyle saflaştırılmıştır. Kapsaisinin geri kazanımı için en uygun sistemin potasyum karbonat / etanol sistemi olduğu görülmüştür. Daha sonra kapsaisinoit ekstraktları D101 makro gözenekli reçine ve ucuz SKP-10-4300 ters faz reçinesi kullanılarak kromatografik ayırma tutulmuştur. Kapsaisin geri kazanımları sırasıyla % 93 ve % 80 olarak bulunmuştur (24).

İnsan serum örneklerinden toplam kapsaisinoitler, metil-izo-butilketon kullanılarak ekstrakte edilerek HPLC sisteminde (dH₂O:ACN; 40:60; v/v) mobil fazı ile

ayrılmıştır. Taşıyıcının absorpsiyonu 205 nm'de gözlemlenmiştir. Tayin sınırları, kapsaisin ve dihidrokapsaisin için sırasıyla 2,6 ve 3,8 ng/mL'dir (25).

Plazmada kapsaisin ve dihidrokapsaisin analizi için ultra yüksek performanslı sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrisi yöntemi geliştirilmiştir ve valide edilmiştir. Analitler, metil tert-bütül eter kullanılarak sıvı-sıvı ekstraksiyon ile plazmadan geri kazanılmıştır. Hareketli faz, 2 mM amonyum format ve metanolden oluşmaktadır. Her iki analit için saptama, tayin ve dedeksiyon sınırları, sırasıyla 0,5 1,0 ve 2,5 pg/mL. Doğrusal aralık 1.0-1.000 pg/mL dir Atlardan doping analizleri için yöntem önerilmiştir (26).

Rutin kalite kontrolü için Scoville acılık değerlerini hesaplamak amacıyla kurutulmuş biber meyvelerindeki kapsaisinoid içeriğini ölçmek için gaz kromatografi (GC) yöntemi geliştirilmiştir. Kalibrasyon eğrileri, kapsaisin için 3.0-195.0 µg mL⁻¹ ve dihidrokapsaisin ve nordihidro-kapsaisin için 2.6-105.0 µg mL⁻¹ aralığında ve korelasyon katsayıları 0.996 ve 0.997 dir. Veriler, gün içi bağıl standart sapma (RSD) <% 5 ve gün içi bağıl tekrarlanabilirlik standart sapması (RSDr) <% 6 olarak bulunmuştur (27).

Biberlerde, kapsaisin ve dihidrokapsaisin'in ultrason yardımıyla ekstraksiyonu (USAE), ardından gaz kromatografi-kütle spektrometre (GC-MS) analizi için basit bir yöntem geliştirilmiştir. Sonuçlar USAE (% 98) uygulaması ile ekstraksiyon verimliliğinin Soxhlet'le elde edildiği kadar iyi olduğunu ve gerikazanım hassasiyetinin% 5'ten az olduğunu göstermiştir; buna ek olarak ekstraksiyon zamanı 5 saatten 25 dakikaya düşürülmüştür. GC-MS analiz yöntemi, kapsaisin ve dihidrokapsaisin için 10-100 mg / mL aralığında doğrusal olup korelasyon katsayısı = 0.998 ve her iki kapsaisinoid için de pik alanı değişkenliği% 1 idi. Yöntem, Meksika'da yetiştirilen 11 çeşit acı biberin analizine uygulanmıştır. Bu biber örneklerinde kapsaisin (101-6800 mg / g) ve dihidrokapsaisin (110-2736 mg / g) için geniş bir konsantrasyon aralığı bulunmuştur (28).

Lokal ağrıdan kurtulmak için topikal formülasyonlarda, kapsaisinoidler, salisilik asit, metil ve etil salisilat, glikol monosalisilat, kafur ve l-mentol yaygın olarak kullanılır. Farklı fiziko-kimyasal özellikler nedeniyle, iki yöntem aynı anda geliştirilmiş ve optimize edilmiştir. Uçucu olmayan kapsaikinoidler, salisilik asit ve glikol monosalisilat, sıvı-sıvı ekstraksiyon takiben sıvı kromatografi ile analiz edilirken, uçucu

bileşikler static headspace gaz kromatografisiyle analiz edilmiştir. Ortalama geri kazanım değerleri % 98 ile % 102 arasındadır (29).

Biber ve biber soslarında kapsaisin ve dihidrokapsaisin'in katı faz mikro ekstraksiyon gaz kromatografisi-kütle spektrometresi ile analizi için basit bir yöntem geliştirilmiştir. Yöntem, kapsaisin için 0.109-1.323 µg / mL ve dihidrokapsaisin için 0.107-1.713 µg / mL aralığında doğrusal ve her iki kapsaisinoid için $r = 0.9970$ 'e kadar olan korelasyon katsayısına sahiptir. Yöntemin hassasiyeti % 10'dan azdır ve bu yöntem 11 çeşit biber ve dört biber sosunun analizine uygulanmıştır. Biber ve biber sosları örneklerinde (4,3-717,3 ve 1,0-134,8 µg / g) geniş bir aralıkta kapsaisin (55,0-25 459 µg / g) ve dihidrokapsaisinin (93-1 130 µg / g) sırasıyla bulunmuştur (30).

Acı biber sosundaki kapsaisin'in analizi için hassas, hassas ve spesifik bir gaz kromatografisi (GC) yöntemi geliştirilmiş ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile karşılaştırılarak doğrulanmıştır. Metod validasyon parametreleri, doğrusallık, hassaslık, doğruluk ve kesinlik dahil olmak üzere iyi sonuçlar vermiştir. GC ayırımı alev iyonizasyon dedektörü ile takip edilen (% 5 fenil) -metil polisiloksan kolon [uzunluk 30 m, iç çap (id) 250 µm, film kalınlığı 0.25 µm] üzerinde gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık programlama koşulları başlangıçta 220 ° C'de 1 dakika, artış 5 °C/dakika ile 270 °C arasındaydı ve 10 dakika bekletilmiştir. Acı biber sosundaki kapsaisin'in geri kazanımı >% 92 ve GC analizindeki dedeksiyon sınırı ve tayin sınırı sırasıyla 1.0 ve 5.0 µg/g'dır. Kapsaisin için kalibrasyon eğrisi, GC için 1 ile 250 ug / mL ve HPLC için 0.5 ila 50 ug / mL aralığında doğrusaldır. Gün içi ve günler arası hassasiyetler (bağıl standart sapmalar) <% 4.02 'dir (31).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması 2015-2017 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda ve İstanbul Üniversitesi İlaç Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yapılmıştır.

3.1. Kimyasal Maddeler, Çözücü ve Taşıyıcı Gaz

Metod geliştirme ve validasyon çalışmaları sırasında kullanılan referans standart Tablo 3-1'de verilmiştir.

Tablo 3-1: Referans standart

Standart	Temin Edildiği Firma	Kullanım Amacı
Kapsaisin	Medigen Pharma	Analit

Metod geliştirme ve validasyon çalışmaları sırasında kullanılan organik çözücü Tablo 3-2'de belirtilmiştir.

Tablo 3-2: Çözücüler

Çözücüler	Marka
Metanol (LC-MS Saflığında)	MERCK

Metod geliştirme ve validasyon çalışmaları sırasında kullanılan taşıyıcı gaz Tablo 3-3'de belirtilmiştir.

Tablo 3-3: Taşıyıcı Gaz

Taşıyıcı Gaz	Marka
Yüksek Saflıkta He (%99.9999)	HABAŞ

3.2. Kapsaisin Çözeltileri

5 mg kapsaisin tartıldıktan sonra 50 mL'lik bir balonjoje de metanol ile çözülerek hacmine tamamlandı (0.1 mg/mL-100 µg/mL, KPS-SÇ1). Daha sonra 5-50 µg/mL aralığında standart çözeltiler ve kalite kontrol örnekleri metanol ile hazırlandı.

Kalibrasyon standartlarının ve kalite kontrol örneklerinin hazırlanışı Tablo 3-4 ve 3-5’de verilmiştir.

Tablo 3-4: Kalibrasyon standartlarının hazırlanışı

Standart Adı	Analit	Konsantrasyon ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	KPS-SÇ1’den Alınan Hacim (KPS-SÇ1:100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	Final Hacim (Metanol)
ST1	KPS	5	250 μL	5mL
ST2	KPS	10	500 μL	5mL
ST3	KPS	20	1000 μL	5mL
ST4	KPS	40	2000 μL	5mL
ST5	KPS	50	2500 μL	5mL

Kalibrasyon eğrisi standartları hazırlandıktan sonra düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlarda seçilen noktalarda kalite kontrol örnekleri hazırlanmıştır (Tablo 3-5).

Tablo 3-5: Kalite kontrol numunelerinin hazırlanışı

Standart Adı	Analit	Konsantrasyon ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	KPS-SÇ1’den Alınan Hacim (KPS-SÇ1:100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	Final Hacim (Metanol)
KK1	KPS	5	250 μL	5mL
KK2	KPS	25	1250 μL	5mL
KK3	KPS	50	2500 μL	5mL

3.3. Aletler ve Gereçler

Agilent Technologies (ABD) GC-MS sistemi analitik çalışmalarda kullanılmıştır (Tablo 3-6).

Tablo 3-6: Ekipmanlar

GC-MS Sistemi	Marka - Model
GC	Agilent Technologies 7890B
MS	Agilent Technologies 5977A
Otoörnekleyici	Agilent Technologies 7693
Analitik Kolon	Agilent Technologies HP-5MS UI 30m x 0,25mm 0,25 micron
Liner	Agilent Technologies 5183-4647:870 µL Split
Yazılım	Enhanced Mass Hunter

Validasyon çalışması sırasında kullanılan destek ekipmanlar Tablo 3-7’de belirtilmiştir.

Tablo 3-7: Destek ekipmanlar

Destek Ekipmanlar	Marka - Model
Otomatik Pipetler	Eppendorf 100-1000 µL
Pipet Uçları	Eppendorf 1000µL
Analitik Terazi	Ohaus Explorer 220g x 0,0001g
Otoörnekleyici Vialleri	Agilent Technologies
Vial Kapakları	Agilent Technologies
Balon Jojeler	Isolab 5mL ve 50mL
Vorteks	IKA

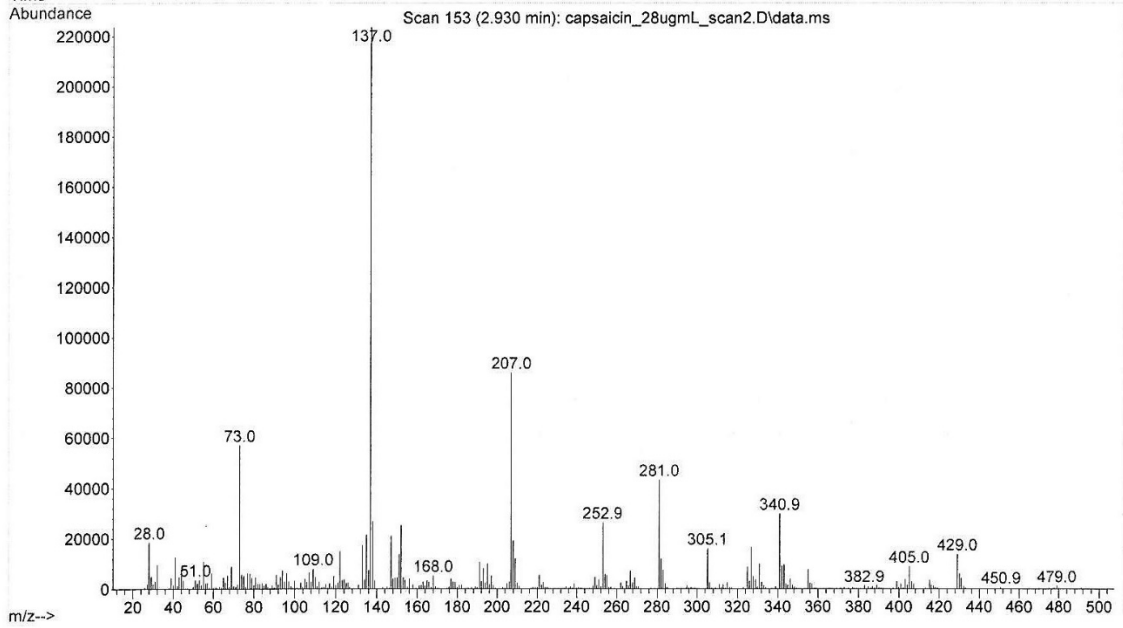
3.4. Analizin Gerçekleştirilmesi

1. GC-MS de kullanılan helyum gaz tüpünün ana vanası açılır ve 5 bar basınca regülatörden ayarlanır.
2. Sistemin bilgisayar  açılır. Gaz kromatografi cihazının açma-kapama düğmesine basılır.
3. MS cihazının yan kapağı açılır ve vent vanasının kapalı olduğundan emin olunur. Daha sonra, açma-kapama düğmesinden cihaz açılır. MS'in yan tarafı vakum tutana kadar bastırılır. Vakum tuttuktan sonra MS 'nin yan kapağı takılır.
4. Sistemin bilgisayarından GC işletim programı açılır ve cihaz ve bilgisayar bağlantısı gerçekleşmiş olur.
5. Ana menüden vakum kontrol menüsüne geçilir. Ekranaya gelen menüden Pump Down'a tıklanır. Vakum ve MS sıcaklıklarının gerekli değerlere gelmesi beklenir. Pump down tamamlandıktan sonra enjektör bloğu sıcaklığı, fırın sıcaklığı ve transfer hattı sıcaklığının açılması uyarısı gelir işlemler yapılır.
6. Cihazla çalışmaya başlamadan önce sistemin dengeye gelmesi ve uygun vakumun sağlanması için en az 1 gün beklenir. Daha sonra autotune alınarak parametreler kontrol edilir ve çalışmaya başlanır.
7. Enjeksiyon hacmi 1 L olarak seçilmiştir.
8. Enjektör bloğu sıcaklığı 300  C olarak ayarlanarak split oranı 5:1 olarak ayarlanır.
9. Akış hızı 2 mL/dk olacak şekilde sisteme girilir.
10. Fırın sıcaklık programı olarak başlangıç sıcaklığı 250  C dir dakikada 10  C artışla 275  C'ye gelir. 275  C de 2,5 dakika beklenerek program tamamlanır. Toplamda analiz süresi 5 dk'dır.
11. GC-MS transfer hattı sıcaklığı 300  C dir.
12. Kütle kısmında SIM modda çalışılmıştır seçilen iyon 137 dir.

3.5. Kapsaisinın Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi (GC-MS) ile Analizi

3.5.1. SIM Modda İyon Seçimi

Kapsaisin standart maddesinin hazırlanan çözeltilisinden scan modda GC-MS ile analiz edilmesi sonucunda elde edilen spektrumundan kütüphanede karşılaştırılmasıyla kararlı ve çokluğu dikkate alınarak 137 iyonu seçilmiştir (Şekil 3-1).



Şekil 3-1: Kapsaisinın GC-MS de 28 µg/mL konsantrasyonda alınmış spektrumu

3.5.2. Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

Hazırlanan 100 µg/mL konsantrasyondaki kapsaisin çözeltilisinden 5, 10, 20, 40 ve 50 µg/mL konsantrasyonlarında 5 mL'lik balon jöjelerde hazırlandı, 10 saniye vortekslendi.

1 µL enjeksiyon yapılarak alanlar hesaplandı. Elde edilen pik alanlarından kalibrasyon eğrisi çizildi.

3.6. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

Validasyon, metodun performans kriterlerine uygunluğunun saptanması için parametrelerinin belirlenip incelendiği bir geçerlilik çalışmasıdır (32).

İlaç uygulamaları için Uluslararası Harmonizasyon Konferansı (ICH, International Conference Harmonization Q2(R1) kılavuza göre validasyon yapıldı (33).

3.6.1. Spesiflik ve seçicilik

Yöntemin seçiciliğinin tayini amacıyla, boş enjeksiyon yapıldı. Ayrıca farmasötik preparat ve standartlarla yapılan enjeksiyonlar karşılaştırılıp girişimin olup olmadığına bakıldı. 137 m/z değeri kapsaisin ve benzer türevlerine ait olmasında seçiciliği artırmıştır.

3.6.2. Doğrusalık

Kalibrasyon eğrisini oluşturmak için beş konsantrasyon seçildi. Kapsaisin için stoğundan 5 (ST1); 10 (ST2); 20 (ST3); 40 (ST4); 50 (ST5) µg/mL konsantrasyonlarda kapsaisin ihtiva eden karışım çözeltileri hazırlandı, analiz edildi ve elde edilen verilerle kalibrasyon eğrisi çizildi. Hazırlanan kalibrasyon eğrisinde, analitik seyreltmelerle azalan konsantrasyonlarda dedektör cevabının doğrusal olması araştırıldı. Analitin değişen konsantrasyonları ile elde edilen verilerden oluşan eğrinin korelasyon katsayısı hesaplandı. Korelasyon katsayısının yanı sıra eğrinin denklemi ve eğimi de bulundu.

3.6.3. Doğruluk

Analitin en düşük, orta ve en yüksek konsantrasyonları içeren 3 konsantrasyon seçilmiştir. Kapsaisin için sırasıyla 5 (KK1); 25 (KK2); 50 (KK3); µg/mL konsantrasyonlarda kalite kontrol numuneleri hazırlandı ve analiz edildi. Elde edilen analiz sonuçlarının yüzde ortalaması alınarak doğrulukları hesaplandı ve, hesaplamaların LOQ için %± 20, diğer noktalar için %±15 kabul limitleri aralığında seri kabul edildi.

3.6.4. Kesinlik

Analitin en düşük, orta ve en yüksek konsantrasyonları içeren 3 konsantrasyon seçilmiştir. Kapsaisin için sırasıyla 5 (KK1); 25 (KK2); 50 (KK3); µg/mL konsantrasyonlarda; kalite kontrol numuneleri hazırlandı ve analiz edildi. Elde edilen analiz sonuçlarının standart sapmaları ve ortalamaları hesaplandı. Bulunan veriler formülde yerine konularak %CV (varyasyon katsayısı) hesaplandı ve hesaplamaların LOQ için %± 20, diğer noktalar için %±15 kabul limitleri aralığında seri kabul edildi.

3.6.5. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)

Teşhis sınırı tayin edilebilen en düşük düzeydir. Farklı yollarla belirlenebilir.

a) Sinyal/gürültü oranı: dedeksiyon limiti için sinyal/gürültü oranı 3'den büyük kabul edilebilirdir.

b) Cevap ve eğrinin standart sapmasına bağlı olarak da hesaplanabilir.

$$LOD = 3 \sigma / S$$

σ : Cevabın standart sapması

S: Kalibrasyon eğrisinin eğimi.

σ regresyon eğrisinin y kesim noktasının standart sapması cevabın standart sapması olarak kullanılabilir.

Tayin sınırı En düşük analiz edilebilen miktardır. Farklı yöntemlerle tayin edilebilir.

a) Sinyal/gürültü oranı: en düşük tayin limiti için S/N oranı 10'dan büyük olmalıdır.

b) Ya da kalibrasyon eğrisinin eğiminden hesaplanır.

$$LOQ = 10 \times \sigma / S$$

σ : Cevabın standart sapması

S: Kalibrasyon eğrisinin eğimi.

3.6.6. Validasyon Serisinin Hazırlanması

Validasyon serisi boş, kalibrasyon eğrisi ve kalite kontrol örnekleri olarak hazırlandı. Boş viallere çözücü, kalibrasyon eğrisi için konsantrasyonlar, 5, 10, 20, 40, 50 $\mu\text{g/mL}$ kalite kontrol örnekleri ise 5, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$ olarak seçildi. Hazırlanan validasyon serisi Tablo 3-8'deki gibidir.

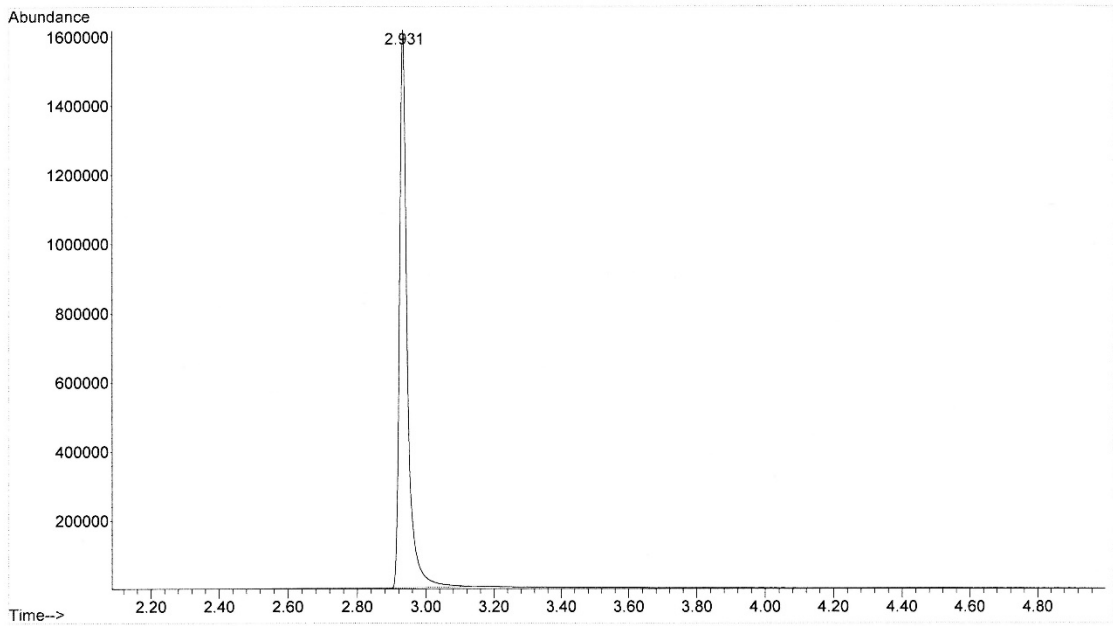
Tablo 3-8: Hazırlanan validasyon serisi

Numune	Analiz Sırası	Numune	Analiz Sırası
BOŞ	1	KK2-4	18
ST1-1	2	KK2-5	19
ST2-1	3	KK2-6	20
ST3-1	4	BOŞ	21
ST4-1	5	KK3-1	22
ST5-1	6	KK3-2	23
BOŞ	7	KK3-3	24
KK1-1	8	KK3-4	25
KK1-2	9	KK3-5	26
KK1-3	10	KK3-6	27
KK1-4	11	BOŞ	28
KK1-5	12	ST1-2	29
KK1-6	13	ST2-2	30
BOŞ	14	ST3-2	31
KK2-1	15	ST4-2	32
KK2-2	16	ST5-2	33
KK2-3	17		

4. BULGULAR

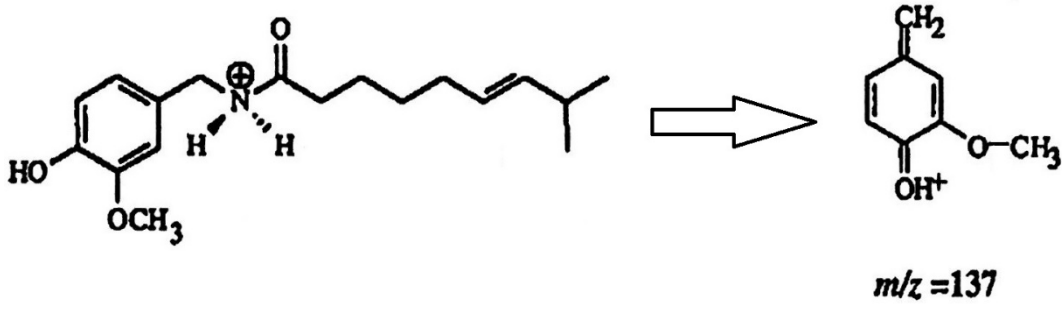
4.1. Kromatografik Koşullar

0,25 micron 30m x 0,25mm boyutlarında HP-5MS UI kolonda, taşıyıcı gaz olarak yüksek saflıkta helyum kullanılmış ve akış 2mL/dk olarak ayarlanmıştır. Enjeksiyon hacmi 1µL olup split modda çalışılarak split oranı 5:1 olarak ayarlanmıştır. Enjektör bloğu sıcaklığı 300 °C ve transfer hattı sıcaklığı 300 °C dir. Fırın sıcaklık programı 250 °C den başlayıp dakikada 10 °C artarak 275 °C ye ulaşır bu sıcaklıkta 2,5 dakika bekleyecek şekilde ayarlanmıştır. Toplamda analiz süresi 5 dk'dır. Analizler SIM modda gerçekleştirilip seçilen iyon 137 dir.. Kapsaisin için alıkonma zamanı 2,9 dakikadır. Örnek kromatogram Şekil 4-1'de verilmiştir.



Şekil 4-1: 50 µg/mL kapsaisine ait örnek kromatogram

Kapsaisin molekülün 137 olan seçici iyonunun molekülde parçalanma ürünü olarak gösterimi Şekil 4-2'de gösterilmektedir



Şekil 4-2: Kapsaisinın parçalanma ürünü

4.2. Autotune Değerlendirmesi

Analize başlamadan önce ve periyodik aralıklarla kütle spektrometresi uçuculuğu yüksek ve kararlı bileşikler kullanılarak ayarlanması gerekir. Cihazda bu işlem “Autotune” denilen ayarlama kullanılarak yapılır. Ayarlama çözeltisi olarak sistemimizde perflorotributilamin (PFTBA) mevcuttur. Bu maddeye özgü 69, 219, 502 m/z pikleri temel alınmıştır.

Cihazın autotune sonuç raporu Şekil 4-3’de gösterilmektedir. Ayarlama sonucunda beklenen kütleler, bağıl çoklukları ve izotop oranları tablo 4-1’de verilmiştir. Bu sonuçlar autotune de elde edilmeden analize başlanmamıştır. Autotune de bulunan H₂O, N₂, O₂ ve CO₂ sonuçları %5 den fazla olduğu takdirde sistemde kaçak veya kirlilik olduğu anlamına gelir bu durumda kaçaklar engellenip sistem temizlenmeden analize başlanmamalıdır.

Tablo 4-1: Ayarlama sonucunda beklenen kütleler, bağıl çoklukları ve izotop oranları

Kütle	Bağıl Çokluk %	İzotop Kütle	İzotop Oranı %
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

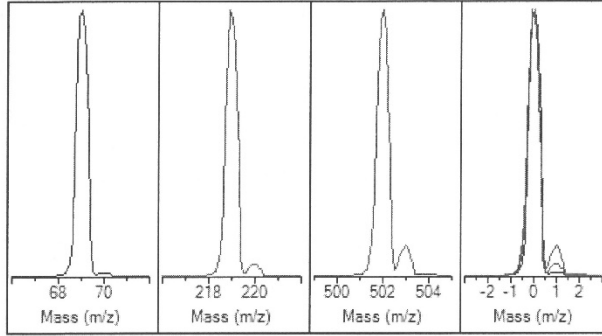
Autotune - 5977

4/13/2017 10:03:42 AM (UTC+2:00)

GCMS

D:\MASSHUNTER\GCMS\1\5977\atune.u

US1440L420



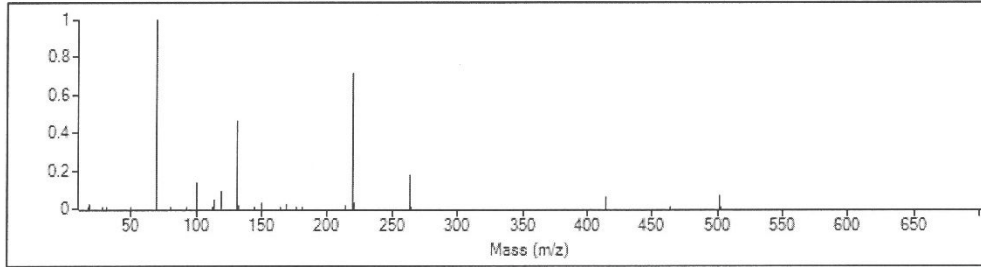
Ion Polarity	Pos	Mass Gain	-515
Emission	34.6	Mass Offset	-33
Electron Energy	70.0	Amu Gain	1221
Filament	1	Amu Offset	123.50
Repeller	33.50	Width219	-0.021
Ion Focus	90.3	DC Polarity	Pos
Entrance Lens	17.6	HED Enable	On
Ent Lens Offset	14.44	EM Volts	1576.5
Ion Body	0.00	Extractor Lens	0.00
		Scan Speed	3
		Averages	3
PFTBA	Open	Step Size	0.10

Actual m/z	Abund	Rel Abund	Pw50
69.00	413,566	100.0%	0.60
218.90	301,047	72.8%	0.60
502.00	29,356	7.1%	0.60

Temperatures and Pressures

MS Source	230 Turbo Speed	100.0
MS Quad	150 Hi Vac	N/C

Low	High	Step	Speed	Threshold	Peaks	Base	Abundance	Total Ion
10.00	701.00	0.10	3	100	105	69.00	399,296	1,222,613



Target m/z	Actual m/z	Abund	Rel Abund	Iso m/z	Iso Abund	Iso Ratio
69.00	69.00	399,296	100.0%	70.00	4,503	1.1%
219.00	219.00	284,224	71.2%	220.00	12,325	4.3%
502.00	502.00	27,520	6.9%	503.00	2,847	10.3%

Air/Water Check: H2O ~2.1% N2 ~0.6% O2 ~0.3% CO2 ~0.2% N2/H2O ~29.0%

Column(1) Flow: 0.30 Column(2): 0.00 ml/min Interface Temp: 280

Ramp Criteria:

Ion Focus maximum 90 volts using ion 502; Electron Multiplier Gain 28870.486

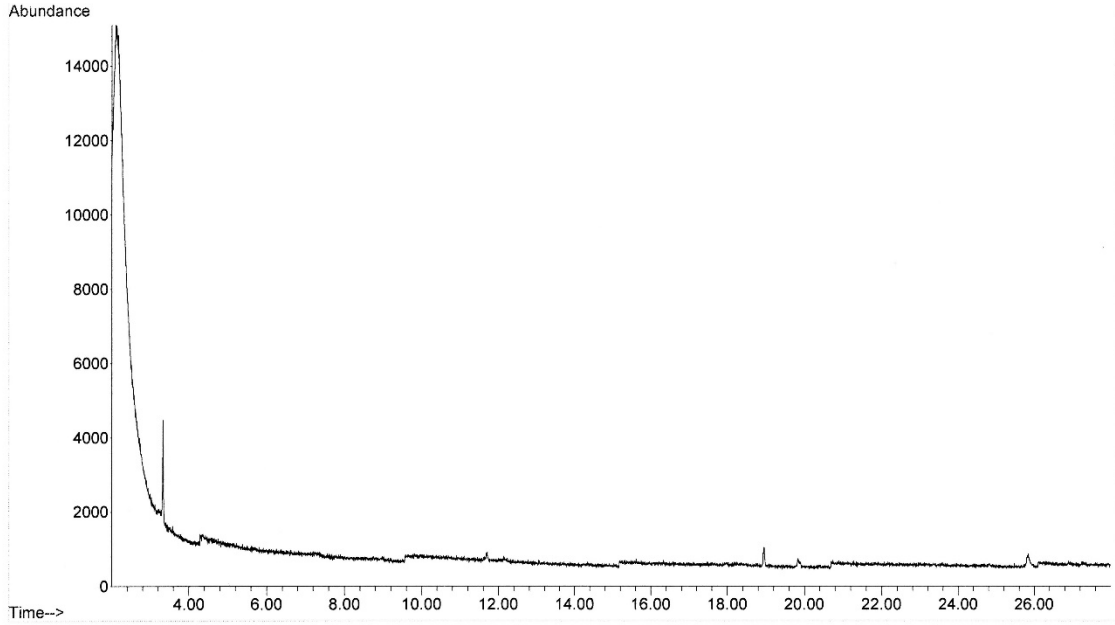
Repeller maximum 35 volts using ion 219; Gain Factor 0.2887

Mass Gain Values(Scan Speed): -509(3) -505(2) -490(1) -472(0) -419(FS1) -418(FS2)

TARGET MASS:	50	69	131	219	414	502	1050
Amu Offset		123.5	123.5	123.5	123.5	123.5	123.5
Entrance Lens Offset		14.4	14.4	14.4	14.4	14.4	14.4

Şekil 4-3: Cihaza ait autotune sonuc raporu

Kapsaisin için % 100 dimetil polisiloksan (HP-1MS) kolon ile çeşitli sıcaklık programlarıyla denemeler yapılmıştır. Fakat gerekli alıkonma gözlenememiştir. Bu analizlere ait örnek bir kromatogram Şekil 4-4'de verilmiştir.

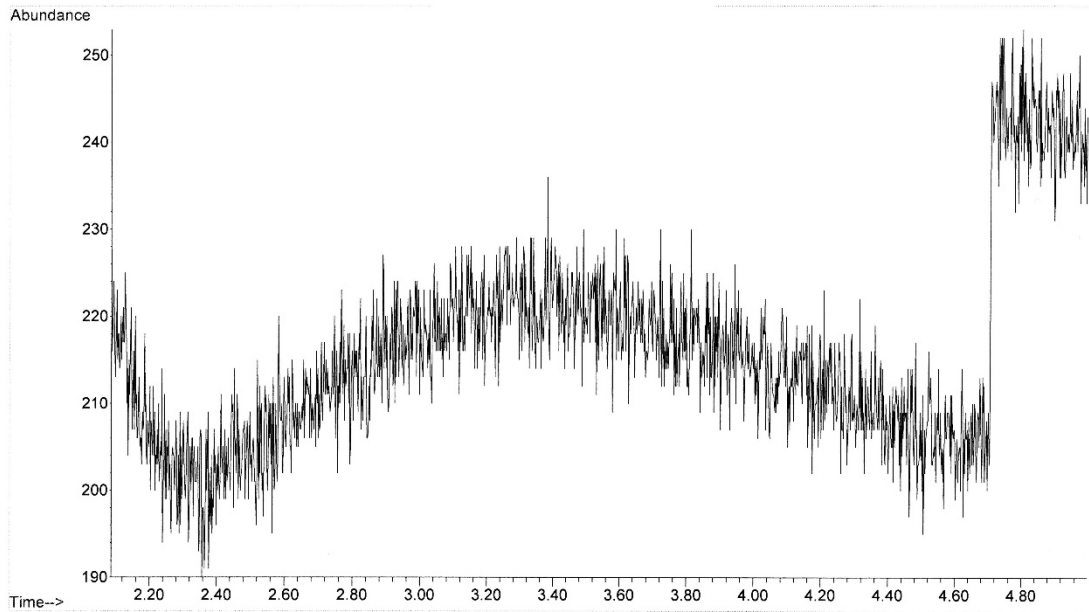


Şekil 4-4: Farklı kolonlarda yapılmış denemelere ait bir kromatogram

4.3. Yöntem Validasyonu

4.3.1. Seçicilik

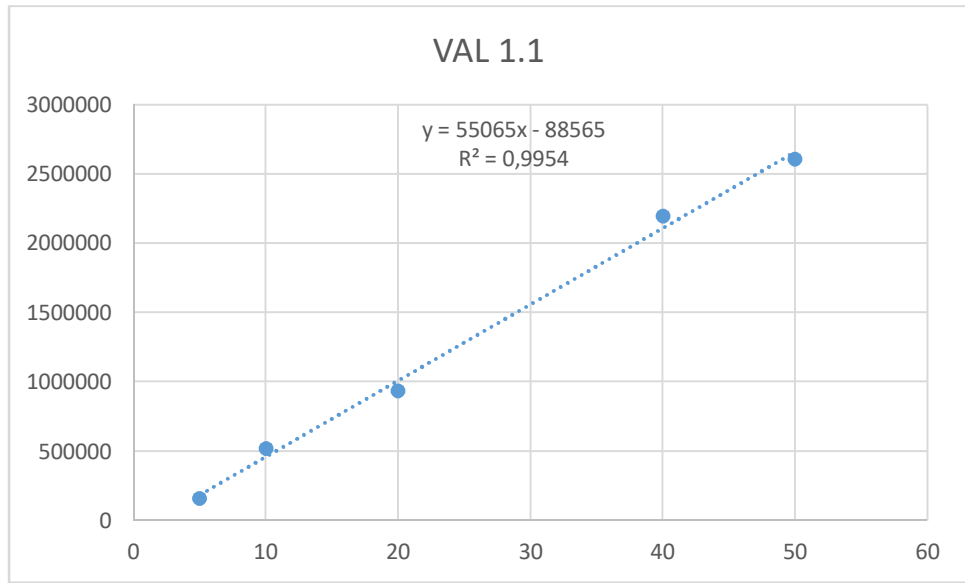
Yöntemin seçiciliği için; boş enjeksiyonuna ait kromatogram Şekil 4-5'deki gibidir. Görüldüğü üzere analitin alıkonma zamanını ve alanını etkileyen her hangi bir girişim tespit edilmemiştir.



Şekil 4-5: Boş enjeksiyonuna ait kromatogram

4.3.2. Doğrusallık

Hazırlanan kalibrasyon standartlarının analizi neticesinde elde edilen pik alanlarıyla konsantrasyon verileri grafiğe geçildi ve kalibrasyon eğrisi çizildi. 3 farklı validasyon serisinde 2'şer adet kalibrasyon eğrisinden toplam 6 adet kalibrasyon eğrisi vardır. Her kalibrasyon eğrisi 5, 10, 20, 40, 50 µg/mL noktalarından oluşur. Kalibrasyon eğrileri korelasyon katsayıları kabul edilebilir sınırlardadır. Örnek kalibrasyon eğrisi Şekil 4-6'de Doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları Tablo 4-2' de verilmiştir.



Şekil 4-6: 1. Validasyon serisinin 1. Kalibrasyon eğrisi.

Tablo 4-2: Validasyon serlerinden elde edilen doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları

Validasyon Seri no	Korelasyon Katsayısı	Doğru Denklemi
VAL 1.1	0.9954	$y = 55065x - 88565$
VAL 1.2	0.9944	$y = 65905x - 108990$
VAL 2.1	0.9905	$y = 80559x - 286058$
VAL 2.2	0.9973	$y = 56158x - 141036$
VAL 3.1	0.9913	$y = 70771x - 196036$
VAL 3.2	0.9917	$y = 88948x - 414123$

4.3.3. Doğruluk ve Kesinlik

Düşük , orta ve yüksek konsantrasyonlarda seçilen kalite kontrol örnekleri gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri Tablo 4-3, 4-4, 4-5 ve 4-6'da verilmiştir. Ayrıca kalibrasyon standartlarının da günler arası kesinlik ve doğruluğu hesaplandı. Değerler Tablo 4-7'de verilmiştir. Bulunan değerlere göre yöntemin doğruluğu ve kesinliği uygun bulundu. Bu değerlerle yöntemin tekrarlanabilir olduğu da görülmektedir.

Tablo 4-3: Birinci validasyon serisinin gün içi hesaplamaları

Numune	Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	Ortalama	%Ort	Sapma(SD)	%CV	n
KK1	5	5,1526	103,0526	0,5310	10,3048	6
KK2	25	23,6233	94,4933	2,3606	9,9925	6
KK3	50	49,3284	98,6567	3,4207	6,9345	6

Tablo 4-4: İkinci validasyon serisinin gün içi hesaplamaları

Numune	Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	Ortalama	%Ort	Sapma(SD)	%CV	n
KK1	5	5,5547	111,0934	0,1914	3,4458	6
KK2	25	22,8733	91,4932	1,8400	8,0445	6
KK3	50	50,3633	100,7226	3,8383	7,6215	6

Tablo 4-5: Üçüncü validasyon serisinin gün içi hesaplamaları

Numune	Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama	%Ort	Sapma(SD)	%CV	n
KK1	5	5,4790	109,5801	0,3191	5,8237	6
KK2	25	24,1378	96,5513	2,0638	8,5501	6
KK3	50	50,3638	100,7276	3,6894	7,3256	6

Tablo 4-6: Validasyon serisinin günler arası hesaplamaları

Numune	Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama	%Ort	Sapma(SD)	%CV	n
KK1	5	5,5369	110,7385	0,2877	5,1963	12
KK2	25	23,3753	93,5012	1,7569	7,5160	12
KK3	50	50,2949	100,5898	2,7037	5,3756	12

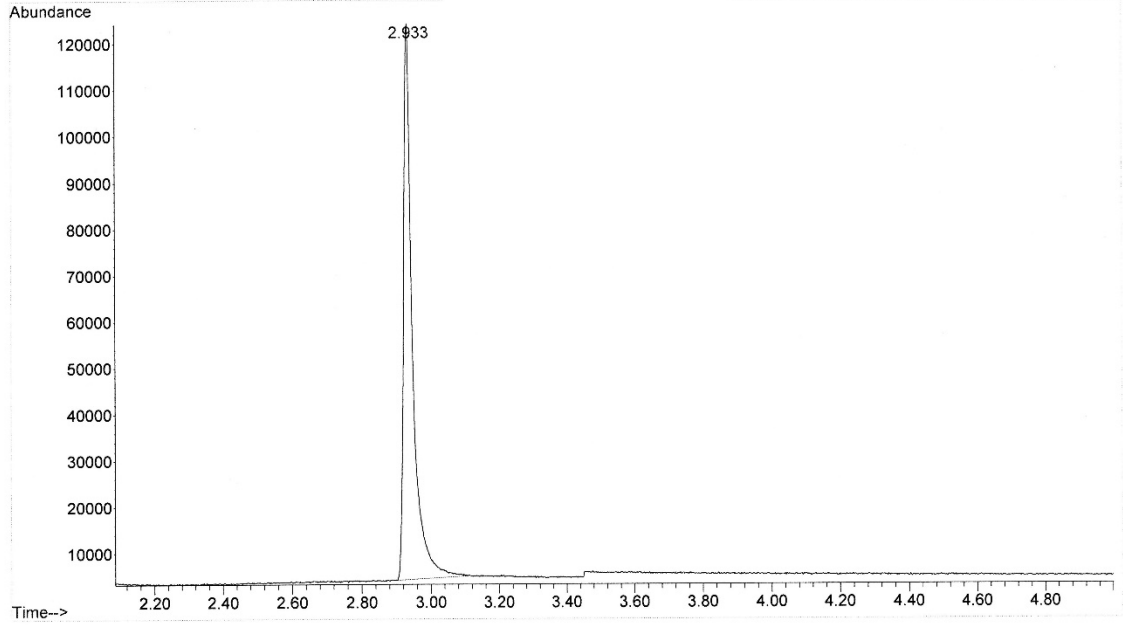
Tablo 4-7: Kapsaisin kalibrasyon standartlarının günler arası doğruluk ve kesinlik hesaplamaları

Numune	Konsantrasyon (µg/mL)	Ortalama	%Ort	Sapma(SD)	%CV	n
ST1	5	5,3714	107,4284	0,5512	10,2618	6
ST2	10	10,4915	104,9148	0,6076	5,7909	6
ST3	20	18,1928	90,9639	0,7249	3,9848	6
ST4	40	40,3155	100,7887	1,3029	3,2317	6
ST5	50	50,3909	100,7818	1,0135	2,0112	6

4.3.4. Teşhis (LOD) ve Tayin (LOQ) Sınırları

Yapılan LOQ belirleme çalışmaları neticesinde bir LOQ değeri belirlendi. Kapsaisin için 5 µg/ml şeklinde belirlenen LOQ noktası kalibrasyon eğrisinin en düşük

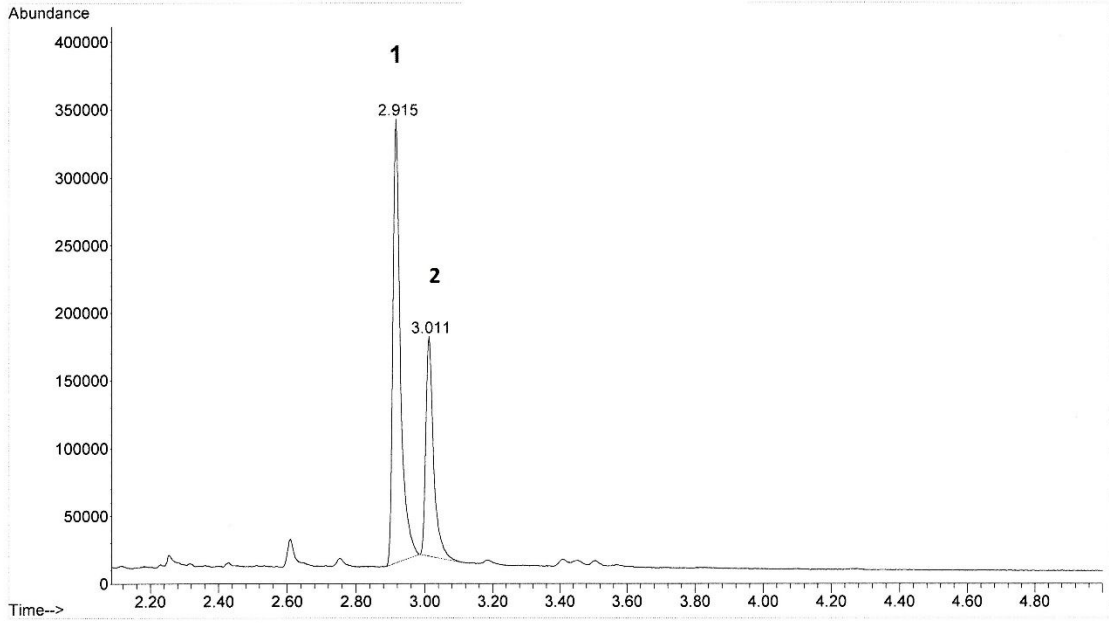
noktası olarak kullanıldı. LOD değeri kalibrasyon eğrisi yardımıyla formülünden hesaplandı ve 3,46 µg/ml şeklinde bulundu. LOQ noktasına ait kromatogram Şekil 4-7'de verildi.



Şekil 4-7: 5 µg/mL kapsaisin enjeksiyonuna ait bir kromatogram

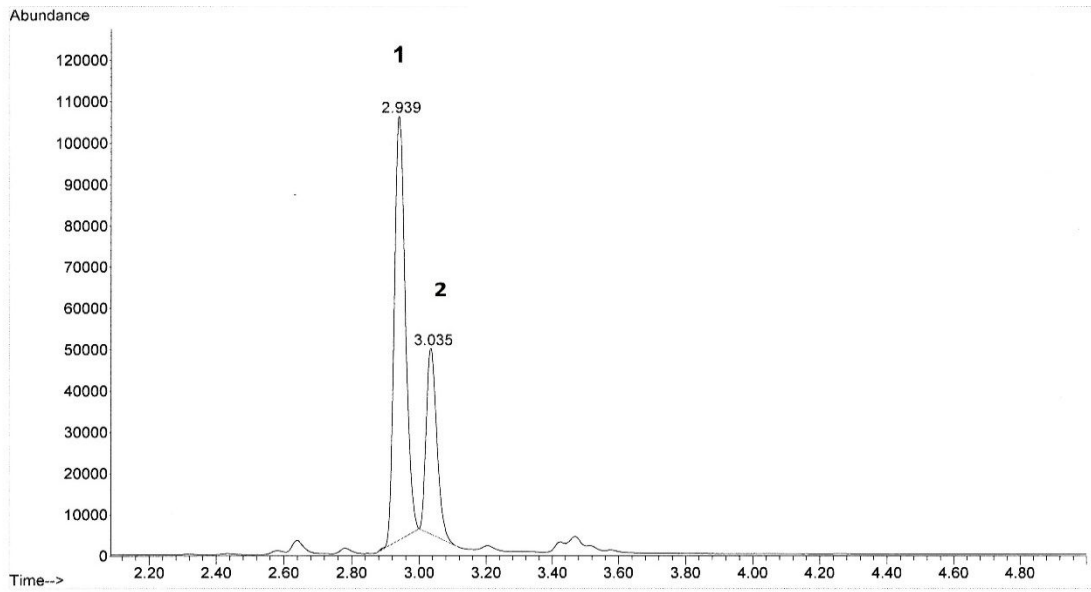
4.3.5. Farmasötik Preparatların Hazırlanması

1 adeti 4,6 mg kapsaisin içerdiği bilinen ticari yakı 4 eşit parçaya bölünerek 50 mL lik tüpe koyularak hacmi metanol ile 50 mL'ye tamamlandı (23µg/mL). 5 saatlik bir çalkalama programından sonra viallenip analiz edildi. Bu analizden geri kazanım % $55,68 \pm 5,95$ (n=4) olarak bulunmuştur. Kapsaisin piki 1 nolu piktir. 2 nolu pik kapsaisin ile aynı seçici iyona sahip dihidrokapsaisin olduğu anlaşılmıştır (Şekil 4-8).



Şekil 4-8: 23 µg/mL yakı enjeksiyonuna ait bir kromatogram

Kapsaisin içeriği %6,6 olduğu bilinen kapsikum oleoresin çözeltisi seyreltme yapılarak 28 µg/mL'lik çözeltisi hazırlandı ve viallenip analiz edildi. Bu analizden geri kazanım $27,99 \pm 1,22$ (n=3) olarak bulunmuştur. Kapsaisin piki 1 nolu piktir. 2 nolu pik kapsaisin ile aynı seçici iyona sahip dihidrokapsaisindir (Şekil 4-9).



Şekil 4-9: 28 µg/mL kapsikum enjeksiyonuna ait bir kromatogram

5. TARTIŞMA

Solanaceae familyasının capsicum türünden olan kırmızı biberin acılığını veren ve kapsaisinoid adı verilen bileşikler içinde kapsaisin harici analjezik özellikli maddedir (4,7). Bu etkiyi ağrı impulslarını periferden santral sinir sistemine taşınmasında görev yapan P maddesinin duyuşal nöronlarda tüketilmesini sağlayarak yapmaktadır. Kapsaisin analjezik etkisi nedeniyle topikal uygulamalarda kullanılmaktadır (7). İnsanda kullanımının yanı sıra atlarda ağrı eşiğini yükseltmek amacıyla doping maddesi olarak da kullanılmaktadır (26). Kapsaisinin farklı türlerdeki acı biberlerde türevleri ile beraber analizleri çeşitli kromatografik yöntemlerle analizleri yapılmıştır. Sıvı kromatografik analizler yanı sıra Gaz kromatografisi ile de analizleri acı biberden yapılmıştır. Lokal ağrılardan kurtulmak için yapılmış olan topikal formülasyonlarda kapsaisinin sıvı kromatografik analizi literatürde rastlanan tek farmasötik preparat analizidir (29). Bu çalışma da kapsaisinin yakılardan analizleri için gaz kromatografik-kütle spektrometrik analiz yöntemi geliştirilerek valide edilmiştir. Kapsaisinin yakılardan analizi ile ilgili literatür çalışmasına rastlanmamıştır. Kapsaisinin uçucu özelliğinden faydalınarak türevlendirmeye gerek duymadan analizi yapılmıştır. Kapsaisinin gaz kromatografik analizlerine başlanmadan önce kütle spektrometrisi "Autotune" ile ayarlamaları yapılmıştır (Şekil 4-3). Ayarlama sonuçları Tablo 4-1 deki kabul limitleri ile değerlendirilerek limit içi değerlerde olduğunda analize başlanmaktadır.

Kolon % 100 dimetil polisiloksan (HP-1MS) nonpolar kolonda tutulmadan düşük alıkonma değerinde çıkmıştır (Şekil 4-4).

Kapsaisin molekülünün en yüksek çokluktaki parçalanma ürünü m/z: 137 piki analizler de Seçilmiş İyon Modunda (SIM) kullanılmıştır (Şekil 3-1, 4-2) . m/z 137 değeri amin azot grubunun ayrılması ile oluşan kararlı yapıdan gelmektedir. Pik çokluğunun yüksek olması ile düşük değerler de analizlere imkan vermektedir. Yakılardaki miktar (1 yakıda 4.6 mg) göz önünde bulundurulurken kalibrasyon eğrisinin aralığı belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrisi 5-50 µg/ml konsantrasyon aralığında çizilmiştir. Yakılarda kapsaisin ve türevi dihidrokapsaisin beraber yer almaktadır. Bu da yakılarda kullanılan Capsicum Oleresin reçinesinden gelmektedir. Bir çok çalışmada kapsaisin ve dihidrokapsaisinin ayrılması için katı faz ekstraksiyonu veya ultrasonik ön

işlemlere gerek duyulurken geliştirilen yöntemde ön işlemlere gerek duyulmadan ayrımları sağlanmıştır (21, 28, 30).

Yakılarda elde edilen geri kazanım değerlerinin düşük olmasına rağmen tekrarlanabilir olması Uluslararası metod validasyonu kılavuzlarında belirtildiği üzere kabul edilmiştir (33).



KAYNAKLAR

- [1] Şener E, Şahin S. Kapsaisin: farmakokinetik, toksikolojik ve farmakolojik özellikleri. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi* 2010; **29**: 149-163.
- [2] European Commission. *Opinion of the Scientific Committee on Food on Capsaicin*. 2002, 26 February. Erişim 02.06.2017, https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com_scf_out120_en.pdf
- [3] Verit A, Yeni E, Ünal D. Tarihten günümüz ürolojisine kırmızı acı biber. *Türk Üroloji Dergisi* 2001; **27(4)**: 399-402.
- [4] Çiçek H, Yılmaz N, Çelik A, Ceylan N Ö, Meram İ. Kapsaisin (Kırmızı Biber) insan sağlığı üzerine etkileri. *Anadolu Tıp Dergisi* 2005; **7(1)**: 31-37.
- [5] *Scoville Acılık Ölçeği*. Erişim 01.06.2017, Wikipedia: https://tr.wikipedia.org/wiki/Scoville_Acılık_Ölçeği
- [6] *Capsaicin*. Erişim 01.06.2017, Wikipedia: <https://en.wikipedia.org/wiki/Capsaicin>
- [7] RxMediapharma 2017, İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı
- [8] Türsen Ü, Türsen B. Dermatolojide yerel kapsaisin. *Dermatoz* 2012; **3(4)**: 153-159.
- [9] Keçeciler T. Androstendionun biyolojik materyalden gaz kromatografisi kütle spektrometrisi ile analizi. *Yüksek lisans tezi* 1999.
- [10] Skoog D A, West D M, Holler F J. *Analitik Kimya Temelleri 2 7.Baskı*. Ankara, Bilim yayıncılık; 1999
- [11] Gündüz T. *İnstrümental Analiz 10.Baskı*. Ankara, Gazi kitapevi; 2007
- [12] Beşergil B. *Gaz sıvı kromatografisi*. Erişim 01.06.2017, Prof.Dr. Bilsen Beşergil e makaleleri: http://www.bayar.edu.tr/besergil/26_BOLUM_9.pdf
- [13] Türkan T. *Su analizlerinde kromatografik yöntemler*. Erişim 06.06.2017, http://suyonetimi.ormansu.gov.tr/Libraries/su/GCGCMS_Uygulamalar%C4%B1.sflb.ashx
- [14] Türkan T. *Laboratuvar cihazları*. Erişim 06.06.2017, http://suyonetimi.ormansu.gov.tr/Libraries/su/Kromatografi_Sistemleri-Agilent.sflb.ashx
- [15] *Fundamentals of Gas Chromatography*. Erişim 07.06.2017, Agilent: http://cn.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G1176-90000_034327.pdf
- [16] Beşergil B. *İyon dedektörleri*. Erişim 02.06.2017, Prof.Dr. Bilsen Beşergil e makaleleri: http://www.bayar.edu.tr/besergil/2_iyon_dedektorleri.pdf

- [17] Beşergil B. *Kromatografi dedektörleri*. Erişim 02.06.2017, Prof.Dr. Bilsen Beşergil e makaleleri: http://www.bayar.edu.tr/besergil/3_kromatografi_dedektorleri.pdf
- [18] Beşergil B. Kütle spektrometresi. Erişim 05.06.2017, Prof.Dr. Bilsen Beşergil e makaleleri: http://www.bayar.edu.tr/besergil/kutle_2.pdf
- [19] Ciulu-Costinescu F, Calina D, Chirigiu L, A L M E, Rosulescu E, Bubulica M V. Identification and quantification of capsaicin from *Capsicum annum* L. by RP-HPLC. *Revista de Chimie* 2015; **66(12)**: 1946-1949.
- [20] Daood H G, Halasz G, Palotas G, Palotas G, Bodai Z, Helyes L. HPLC determination of capsaicinoids with cross-linked C18 column and buffer-free eluent. *Journal of Chromatographic Science* 2015; **53(1)**: 135-143.
- [21] Kuzma M, Fodor K, Boros B, Perjesi P. Development and validation of an HPLC-DAD analysis for pharmacopoeial qualification of industrial *Capsicum* extracts *Journal of Chromatographic Science* 2015; **53(1)**: 16-23.
- [22] Ashwini D, Usha S G, Ajitha A, Rao V U M. Extraction of capsaicin from *Capsicum frutescens*. L and its estimation by RP-HPLC method. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2015; **4(9)**: 839-848.
- [23] Barbero G F, Liazid A, Ferreiro-Gonzalez M, Palma M, Barroso C G. Fast Separation of Capsaicinoids from Peppers by Reversed Phase Ultra-Performance Liquid Chromatography: Comparison with Traditional High-Performance Liquid Chromatography Methods. *International Journal of Food Properties* 2016; **19(5)**: 984-992.
- [24] Zhao P, Lu Y, Tan C, Liang Y, Cui B. Aqueous Two-Phase Extraction Combined with Chromatography: New Strategies for Preparative Separation and Purification of Capsaicin from *Capsicum Oleoresin*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2015; **175(2)**: 1018-1034.
- [25] Hartley T, Stevens B, Ahuja K D K, Ball M J. Development and Experimental Application of an HPLC Procedure for the Determination of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in Serum Samples from Human Subjects *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 2013; **28(4)**: 329-335.
- [26] You Y, Uboh C E, Soma L R, Guan F, Taylor D, Li X, Liu Y, Chen J. Validated UHPLC-MS-MS Method for Rapid Analysis of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in Equine Plasma for Doping Control *Journal of Analytical Toxicology* 2013; **37(2)**: 122-132.

- [27] Bononi M, Tateo F. Determination of capsaicinoids from dried pepper fruits by Fast-gas chromatography. *Italian Journal of Food Science* 2012; **24(1)**: 49-54.
- [28] Pena-Alvarez A, Alvarado L A, Vera-Avila L E. Analysis Of Capsaicin And Dihydrocapsaicin In Hot Peppers By Ultrasound Assisted Extraction Followed By Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Instrumentation Science & Technology* 2012; **40(5)**: 429-440.
- [29] Pauwels J, D'Autry W, Van den Bossche L, Dewever C, Forier M, Vandewaeyenberg S Wolfs K, Hoogmartens J, Van Schepdael A, Adams E. Optimization and validation of liquid chromatography and headspace-gas chromatography based methods for the quantitative determination of capsaicinoids, salicylic acid, glycol monosalicylate, methyl salicylate, ethyl salicylate, camphor and l-menthol in a topical formulation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2012; **60**: 51-58.
- [30] Pena-Alvarez A, Ramirez-Maya E, Alvarado-Suarez L A. Analysis of capsaicin and dihydrocapsaicin in peppers and pepper sauces by solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2009; **1216(14)**: 2843-2847.
- [31] Ha J; Han K, Kim K, Jeong S. Gas chromatographic analysis of capsaicin in Gochujang. *Journal of AOAC International* 2008; **91(2)**: 387-391.
- [32] Yılmaz A. Kimyasal Analizlerde Metod Validasyonu ve Verifikasyonu. Türklab
- [33] *ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology* 2005