

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

**( YÜKSEK LİSANS TEZİ )**

**TROKSERUTİN VE KARBAZOKROMUN YÜKSEK  
PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİ  
İLE FARMASÖTİK PREPARATLARDAN MİKTAR  
TAYİNİ**

**MERVE KEŞKEK**

**DANIŞMAN  
PROF.DR. DURİŞEHVAR ÖZER ÜNAL**

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI  
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI**

**İSTANBUL-2016**

## YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programında Yüksek Lisans öğrencisi Merve Keşkek tarafından Prof. Dr. Durişehvar Özer Ünal'ın danışmanlığında hazırlanan "TROKSERUTİN VE KARBAZOKROMUN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİ İLE FARMASÖTİK PREPARATLARDAN MİKTAR TAYİNİ." başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 09/11/2016 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 Özer Ünal  
İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi  
Analitik Kimya Anabilim Dalı



### Jüri

Yrd. Doç. Dr. Ebru Türköz Acar  
Yeditepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi  
Analitik Kimya Anabilim Dalı

**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.

Merve KEŞKEK



## İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.



## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılmasına olanak sağlayan, desteğini hiç esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Serap Sağlık Aslan'a

Araştırma ve çalışmalarım sırasında bana yol gösteren gerek bilgi gerek laboratuvar imkanları açısından her zaman destek veren değerli danışman hocam Prof. Dr. Durişehvar Özer Ünal'a

Manevi desteklerini hep hissettiğim aileme ve değerli İlaç Araştırma ve Uygulama Merkezi ekibine teşekkür etmeyi bir borç bilirim.



Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2955

## İÇİNDEKİLER

<b>TEZ ONAYI</b> .....	<b>ii</b>
<b>BEYAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>İTHAF</b> .....	<b>iv</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>v</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>vi</b>
<b>TABLolar LİSTESİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b> .....	<b>xi</b>
<b>SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ</b> .....	<b>xii</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xv</b>
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>2</b>
2.1. Çalışılan Etken Maddeler.....	2
2.1.1. Trokserutin Kimyasal ve Farmakokinetik Özellikleri .....	2
2.1.2. Trokserutin Miktar Analiziyle İlgili Literatür Çalışması.....	3
2.1.2.1. LC-MS/MS ve LC-MS Yöntemi ile Çalışmalar .....	3
2.1.2.2. HPLC Yöntemi ile Yapılan Çalışmalar .....	4
2.1.2.3. Spektrofotometrik ve Spektrofluorometrik Yöntemler ile Yapılan Çalışmalar.....	5
2.1.2.4. Diğer Yöntemler .....	6
2.1.3. Karbazokromun Kimyasal ve Farmakokinetik Özellikleri .....	7
2.1.4. Karbazokromun Miktar Analiziyle İlgili Literatür Çalışması .....	8
2.1.4.1. LC-MS/MS ve LC-MS Yöntemi ile Çalışmalar .....	8
2.1.4.2. HPLC Yöntemi ile Yapılan Çalışmalar .....	8
2.1.4.3. Spektrofotometrik ve Spektrofluorometrik Yöntemler ile Yapılan Çalışmalar.....	9
2.1.4.4. Diğer Yöntemler .....	10
2.2. Kromatografi.....	11
2.2.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	12
2.2.1.1. HPLC Sisteminin Parçaları .....	13
2.2.1.1.1. Hareketli Faz Hazneleri ve Çözücü Muamele Sistemleri .....	13
2.2.1.1.2. Pompa. ....	13
2.2.1.1.3. Enjeksiyon Sistemleri .....	14
2.2.1.1.4. Kolon ve Kolon Dolgu Maddesi Tipleri .....	14

2.2.1.1.4.1.Core-Shell Teknolojili Pentaflorafenil Propil Polar Kolanlar .....	15
2.2.1.1.5. Dedektör .....	16
2.2.1.1.5.1.UV Dedektörler.....	16
2.3.Sistem Uygunluk Testi .....	17
2.4.Validasyon .....	19
<b>3.GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>21</b>
3.1.Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler.....	21
3.1.1.Kimyasal Maddeler ve Çözücüler .....	21
3.1.2.Çözeltiler.....	21
3.1.2.1.Mobil Faz Çözeltisi.....	21
3.1.2.2.Trokserutin Çözeltileri.....	22
3.1.2.3.Karbazokrom Çözeltileri .....	23
3.2.Aletler ve Gereçler.....	24
3.3. Analizin Gerçekleştirilmesi .....	25
3.4.Trokserutin ve Karbazokromun Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC-UV) ile Yöntem Geliştirme .....	26
3.4.1.Dedektör Dalga Boyu Seçimi .....	26
3.4.2.Mobil Faz Seçimi.....	27
3.4.3.Kolon Seçimi .....	27
3.4.4.Kalibrasyon Eğrisinin Seçimi .....	27
3.5.Sistem Uygunluk Testi .....	28
3.6.Geliştirilen Yöntemin Validasyonu .....	28
3.6.1.Spesifiklik ve Seçicilik .....	28
3.6.2.Doğrusallık .....	28
3.6.3.Doğruluk .....	29
3.6.4.Kesinlik.....	29
3.6.5.Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ) .....	29
3.6.6.Validasyon Serisinin Hazırlanması .....	30
3.7.Tabletlerde Trokserutin ve Karbazokrom Analizi .....	31
3.7.1. Tabletlerin ve Tablet Çözeltilerinin Hazırlanması .....	31
<b>4.BULGULAR.....</b>	<b>32</b>
4.1.Kromatografik Koşullar .....	32
4.2. Sistem Uygunluk Testi.....	33

4.3.Yöntem Validasyonu .....	34
4.3.1. Seçicilik .....	34
4.3.2.Doğrusallık.....	34
4.3.3.Doğruluk ve Kesinlik.....	37
4.3.4.Teşhis (LOD) ve Tayin (LOQ) Sınırları .....	41
4.4.Tabletlerde Trokserutin ve Karbazokrom Analizi .....	42
<b>5.TARTIŞMA.....</b>	<b>43</b>
<b>6.KAYNAKLAR.....</b>	<b>46</b>
<b>7.ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>52</b>





## TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2 1: FDA kılavuzu sistem uygunluk testi için başlangıç kabul kriterleri.....	18
Tablo 3 1:Referans standart.....	21
Tablo 3 2: Kimyasallar.....	21
Tablo 3 3: Trokserutin için kalibrasyon standartlarının hazırlanışı.....	22
Tablo 3 4: Trokserutin kalite kontrol örneklerinin hazırlanışı.....	22
Tablo 3-5: Karbazokrom için kalibrasyon standartlarının hazırlanışı.....	23
Tablo 3-6:Karbazokromun kalite kontrol örneklerinin hazırlanışı.....	23
Tablo 3-7:Ekipmanlar.....	24
Tablo 3-8:Destek ekipmanlar.....	24
Tablo 3-9 : Cam Malzemeler.....	24
Tablo 3-10: Validasyon Serisi.....	30
Tablo 4-1:Trokserutin sistem uygunluk parametreleri.....	33
Tablo 4-2:Karbazokromun sistem uygunluk parametreleri.....	33
Tablo 4-3: Trokserutin validasyon serilerinden elde edilen doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları.....	35
Tablo 4-4: Karbazokromun validasyon serilerinden elde edilen doğru denklemleri ve ilgilendirme katsayıları .....	36
Tablo 4-5: Bir Nolu Validasyon Serisi Kalite Kontrol Örneklerinde Trokserutin Gün İçi Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları.....	37
Tablo 4-6: Bir Nolu Validasyon Serisi Kalite Kontrol Örneklerinde Karbazokromun Gün İçi Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları.....	37
Tablo 4-7: İki Nolu Validasyon Serisi Kalite Kontrol Örneklerinde Trokserutin Gün İçi Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları.....	38
Tablo 4-8: İki Nolu Validasyon Serisi Kalite Kontrol Örneklerinde Karbazokromun Gün İçi Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları.....	38
Tablo 4-9: Üç Nolu Validasyon Serisi Kalite Kontrol Örneklerinde Trokserutin Gün İçi Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları.....	38
Tablo 4-10: Üç Nolu Validasyon Serisi Kalite Kontrol Örneklerinde Karbazokromun Gün İçi Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları.....	39
Tablo 4-11: Validasyon Serilerinde Kalite Kontrol Örneklerinde Trokserutin Günler Arası Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları.....	39

Tablo 4-12: Validasyon Serilerinde Kalite Kontrol Örneklerinde Karbazokromun Günler Arası Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları.....	39
Tablo 4-13: Trokserutin kalibrasyon standartlarının günler arası doğruluk ve kesinlik hesaplamaları.....	40
Tablo 4-14: Karbazokrom kalibrasyon standartlarının günler arası doğruluk ve kesinlik hesaplamaları.....	40



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1:Trokserutin Molekül Şekli.....	2
Şekil 2-2:Karbazokromun Molekül Şekli.....	7
Şekil 2-3: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Sistemi (HPLC ).....	12
Şekil 2-4: core-shell partikülle tamamı gözenekli partikülün karşılaştırılması.....	15
Şekil 2-5: Pentaflorofenil propil ligantı.....	15
Şekil 2-6: Sistem Uygunluk Terimlerinin Kromatogram Üzerinden Gösterimi.....	17
Şekil 3-1: Trokserutin 20 µg/mL konsantrasyonda metanolde 200-600 nm aralığında alınmış UV spektrumu.....	26
Şekil 3-2: Karbazokrom'un 20 µg/mL konsantrasyonda metanolde 200-400 nm aralığında alınmış UV Spektrumu.....	26
Şekil 4-1: 3 µg/mL trokserutin-0,3 µg/mL karbazokrom karışımına ait örnek kromatogram.....	32
Şekil 4-2:Trokserutin Piki.....	33
Şekil 4-3:Karbazokrom Piki.....	33
Şekil 4-4: Mobil faz enjeksiyonuna ait bir kromatogram.....	34
Şekil 4-5: Trokserutin 1,00-20,00 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi.....	35
Şekil 4-6: Karbazokromun 0,05-1,00 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi.....	36
Şekil 4-7: 1,00 µg/mL trokserutin ve 0,05 µg/mL karbazokrom karışımına ait örnek kromatogram.....	41
Şekil 4-8: Tabletteki analizlere ait bir kromatogram.....	42

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

HPLC : Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography)

MS : Kütle spektrometrisi

HPLC/MS/MS : Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi –Tandem Kütle Spektrometrisi (High Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry)

UPLC/MS-MS : Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi –Tandem Kütle Spektrometrisi (Ultra Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry)

LC–MS: Kütle Spektrumlu Sıvı Kromatografisi

LC–MS/MS: Sıralı Kütle spektrumlu Sıvı Kromatografisi

LC-ESI-MS/MS: Elektrosprey İyonizasyon Sıralı Kütle Spektrumlu Sıvı Kromatografisi

NSAİİ: Non Steroidal Anti Enflamatuvar

ICH: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı

FDA : Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (U.S Food and Drug Administration)

UV : Ultraviyole

HAc: Asetik Asit

ACN : Asetonitril

MeOH : Metanol

HILIC: Hydrophilic interaction chromatography

mM : miliMolar

N : normalite

v : hacim

g : gram

mg : miligram

µg : mikrogram

ng : nanogram

mL : mililitre

$\mu$ L : mikrolitre

nm : nanometre

C : konsantrasyon

C<sub>max</sub>: Plazmadaki maksimum konsantrasyon

(t<sub>1/2</sub>): plazmada eliminasyon yarı ömrü

$\bar{A}$  : pik alanları ortalaması

A : pik alanı

SD : Standart sapma

RSD : Bağıl standart sapma

%CV: Varyasyon katsayısı (Coefficient of variation)

LOD : Teşhis sınırı

LOQ : Tayin sınırı

$\sigma$ : İnterseptin standart sapması

S: Eğim

TROX : Trokserutin

CARB : Karbazokrom

KK : Kalite kontrol

## ÖZET

(Keşkek, M. (2016). Trokserutin ve Karbazokromun Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi ile Yanyana Analizi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul

Trokserutin gibi flavonoidler, kronik venöz yetmezliğin tedavisinde etkili ve güvenilir ajanlardır. Trokserutin ve karbazokromun birleştirilmiş kombinasyonu, akut komplikasyonsuz hemoroidli cerrahi işlemsiz hastalarda iyi bir etkiye ve güvenilir bir profile sahiptir. Bu yüzden bu iki ilacın bir arada incelendiği bir analiz yöntemi geliştirmek önemlidir.

Bu çalışmada, tablet formundaki trokserutin ve karbazokromun birlikte analizi için basit ve seçici bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Yöntem core-shell Pentaflorofenil Propil polar kolon; (MeOH; %5'lik HAc),(99,5:0,5-V/V) mobil fazı ile 0.25 mL/dak akış hızında maddelerin ayrılması esasına dayanmaktadır. Dedeksiyon dalga boyu 350 nm olarak seçilmiştir. Maddelerin doğrusallık aralıkları trokserutin için 1,00-20,00 µg/mL ve karbazokrom için 0,05-1,00 µg/mL olarak bulunmuştur. Teşhis (LOD) ve tayin sınırları (LOQ) ise sırası ile trokserutin için 0,65 µg/mL ve 1,00 µg/mL; karbazokrom için 0,01 µg/mL ve 0,05 µg/mL' dir. Geliştirilen yöntem valide edilip , bu iki ilaç etken maddesinin tabletlerdeki analizine uygulanmıştır. Bu yöntem kolay ve tekrarlanabilir olup tablet analizlerinde güvenle kullanılabilir niteliktedir.

## ABSTRACT

Keşkek, M. (2016) Simultaneous Determination of Troxerutin and Carbazochrome by High-Performance Liquid Chromatographic Method, Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Analytical Chemistry. Master Thesis. Istanbul.

Flavonoids, such as troxerutin, are safe and effective agents for the treatment of chronic venous insufficiency. The fixed combination between troxerutin and carbazochrome has a good efficacy and safety profile in non-surgical patients with acute uncomplicated hemorrhoids. Therefore it is important to develop simultaneous analysis method of those drug substances.

In this study, a simple and selective HPLC method was developed for the analysis of troxerutin and carbazochrome in tablets. The method was based on separation by using a mobile phase (MeOH; %5'lik HAc),(99,5:0,5-V/V) and core-shell Pentafluorophenyl Propyl polar column. The mobile phase flow rate was 0.25mL/min. The substances were detected at 350 nm. The linearity ranges were found as 1.00-20.00 µg/mL for troxerutin and, 0.05-1.00 µg/mL for carbazochrome. The limits of detection and quantification were found to be 0.65 µg/mL and 1.00 µg/mL for troxerutin and ;0.05 µg/mL and 0.01 µg/mL for carbazochrome, respectively. The proposed method was successfully validated and applied for the determination of tablets. This method is simple, reproducible and can be used safely simultaneous analysis of troxerutin and carbazochrome in tablets.

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Basur veya hemoroid ayrıca halk arasında bilinen adıyla mayasıl, damar yumağı yapısında olan ve anüsün çıkışında yastıkçık görevi gören bir dokudur. Bunlar şiştiği veya iltihaplandığında patolojik hale gelmektedir.

Hemoroid, hemoroid venöz pleksusun patolojik dilatasyonu, ilk çağların başından beri insanoğlunun muzdarip olduğu, toplumun yaklaşık %50'sinde görüldüğü tahmin edilen klinik bir problemdir (1,2). Hemoroidin bir tipi olan venöz yetmezliği endüstrileşmiş ülkelerde küçümsemeyecek kadar ciddi bir halk sağlığı problemidir ve hastaların yaşam kalitesine de ciddi olumsuz etkisi vardır.

Anorektal hastalıkların fitil, dağlama ve eksizyon yoluyla tedavileri ilk olarak Hipokrat tarafından bildirilmiştir. Binlerce yıl geçmesine rağmen tedavinin temel prensipleri benzerdir. Cerrahlar, hemoroid hastalarının %75'ine bandajlama, %56'sına skleroterapi, %47'sine hemoroidektomi, %9'una submukozal diatermi ve %2'sine longo usulü stapler hemoroidopeksi tedavi yöntemlerini uygulamaktadır. Modern tedavi yöntemleri ise, bunların yanı sıra çeşitli medikal (cerrahi olmayan) ve cerrahi seçenekler içermektedir.

Son zamanlarda, hemeroid tedavisinde etkili olduğu bulunan bazı ilaçların gelişimi büyük ilgi uyandırmaktadır (3). Hemoroid altında yatan sebeplerin lokal damar kapileritisini geliştiren venötik ajanlarla tedavi edilebileceği saptanmıştır. Bu ilaçların damarların kapiler yapısındaki etkisi (geçirgenliği azaltıp dayanıklılığı arttırması), lokal lenf sistemi üzerindeki anti-inflamatuar etkisi, reaktif oksijen radikalleri üzerindeki inhibitör aktivitesi ve kan viskozitesini azaltma kabiliyeti, onları hemoroid tedavisinde kullanılabilir cazip ajanlar yapmaktadır.

Flavonoidlerin kronik venöz yetmezliğinin tedavisinde kullanılabilir güvenilir ve etkili venötik ajanlar olduğu gözlemlenmiştir. Bir flavonoid türü olan trokserutin venöz duvarlarıyla belirgin bir afinitesi olduğu saptanmıştır. Trokserutin, hücre dışı matriksine trombositlerin yapışmasını önemli derece inhibe eder; bu durum eritrosit topaklanmasını engelleme gibi bir etki yaratır ve kan-fibrinolotik sistem üzerine olumlu bir şekilde etki etmektedir. Son zamanlarda parenteral trokserutin İtalya'da karbazokrom kombinasyonu ile birlikte pazarlanmaktadır. Krabazokrom, mikrosirkülasyon gücünü arttıran adrenalinin bir oksidasyon ürünüdür.

Baile ve ark. , bu iki aktif maddenin kombinasyonunun Faz IV çalışmasını çift kör ve plosebo kontrollü olarak yürütmüşlerdir. Çalışma sonunda hiç bir yan etkinin gözlemlenmediği ve ilacın etkili olduğu kayda geçirilmiştir (2).

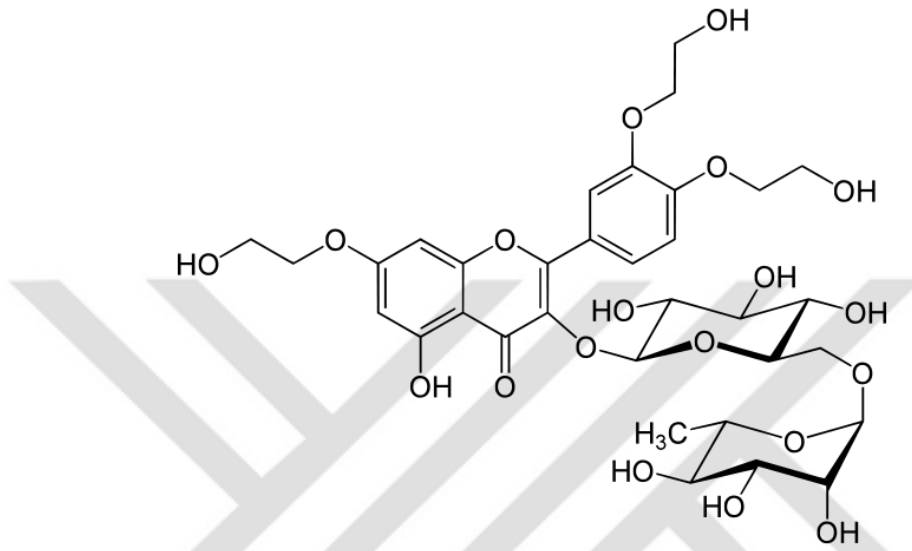
Hastalığın yaygınlığı ve yaşam kalitesini ciddi şekilde etkilediğini düşünürsek bu ilacın üretimi ve kullanımı söz konusudur. Bu anlamda ilaç sanayinin bu ilacı sağlıklı bir şekilde analiz edip üretime sunabilmesi için etkili ve güvenilir bir kantitatif yöntemin geliştirilmesi önemlidir. Bu ihtiyaca cevap vermek için bu iki maddenin analizi yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemiyle F5 Core-Shell kolon desteğiyle tabletlerden analizini sağlayacak özgün, seçici bir yöntem oluşturulmuştur. Yöntem valide edilip tabletlere uygulama yapılmıştır.



## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. Çalışılan Etken Maddeler

#### 2.1.1. Trokserutin Kimyasal ve Farmakokinetik Özellikleri



**Şekil 2-1:Trokserutin Molekül Şekli**

1930'larda portakaldan yeni bir bileşik izole edilmiş ve vitamin P olarak vitaminlerin yeni bir sınıfı olduğuna inanılmıştır. Daha sonra bu maddenin bir flavonoid (rutin) olduğu netlik kazanmış ve şimdiye kadar bu maddeyle birlikte 4000 flavonoid türü keşfedilmiştir (5).

Flavonoidler, geniş polifenolik gruplara ve benzopiron yapısına sahip pek çok bitkinin bünyesinde bulunabilen bileşiklerdir (4). Trokserutin de çeşitli sebze ve meyve türlerinde, tahıl tanelerinde, kahvede bulunan ,vitamin P4 olarak bilinen bir flavonoid (rutin) türevidir (5). Kimyasal olarak - [3,4-bis (2-hidroksietoksi) fenil] -5-hidroksi-7- (2-hidroksietoksi)-4-okso-4H-kromen-3-il 6-O-(6-deoksi-B-D-manopiranosil)-B-D-glukopiranosid şeklindedir (Şekil 2-1) (6). Molekül formülü  $C_{33}H_{42}O_{19}$  olup 742,67 g/mol molekül ağırlığına sahiptir. pKa'sı 8,34'dür. Suda çözünebilirken organik solventlerde çözünmemektedir (7).

Antitrombatik, antieritrosit, fibrinolitik, ödem koruyucu ve reolojik etkinliğe sahiptir. Kronik venöz yetmezliği, varis ve hemeroid tedavisinde kullanılır (5). Bunun yanında, pek çok flavonoid gibi trokserutin de antioksidan özelliği vardır; ağır metallerle bağlanarak onların toksik etkilerini giderebilir (8).

Cui ve ark. 2010 yılında trokserutin'in klinik çalışmasını 18 Çinli gönüllüde 300 mg'lık trokserutin'in terapötik dozu oral yolla uygulayarak gerçekleştirmişlerdir. Uygulamadan sonrasını takip eden plazmadaki doz aralığının pg/ml düzeyinde olduğu tespit edilmiştir. Çalışmaya göre trokserutin'in plazmadaki max. konsantrasyonu ( $C_{max}$ ),  $(0,75 \pm 0,31)$  ng/ml, plazmada eliminasyon yarı ömrü ( $t_{1/2}$ )  $(2,35 \pm 1,14)$  saat ve plazmadaki konsantrasyonla zaman aralığı arasındaki eğrinin altı  $(3,60 \pm 1,76)$  ng.s/ml'dir (5).

## 2.1.2. Trokserutin'in Miktar Analiziyle İlgili Literatür Çalışması

### 2.1.2.1. LC-MS/MS ve LC-MS Yöntemi ile Çalışmalar

Juan-juan ve ark., fare plazmasında CTN986, rutin ve tokserutini LC-MS/MS yöntemi kullanarak miktar tayini yapmışlardır. C18 katı faz ekstraksiyon işlemi ardından C18 (250 mm\*4.6 mm, 5µm) kolonlu ve (metanol:izopropanol:su:formik asit), (36:8:56:0.1, V/V/V/V) mobil fazlı izokratik kromatografide etken maddelerin ayrılmasını gerçekleştirmişlerdir. Yöntemin LOQ'su 4 ng/ml olup kalibrasyon aralığı 4ng/ml-800ng/ml'dir. Geliştirilen yöntem farmakokinetik çalışmaya uygulanmıştır (9).

Mei ve ark. köpek plazmasını kullanarak LC-MS/MS metoduyla miktar çalışması yapmışlardır. 80 derecelik suda asidik hidrolizin ardından 5 ml'lik etil asetat ile ekstraksiyon işlemi gerçekleştirmişlerdir. LC-MS/MS analizini ODS C18 Shim-pack (250 mm×2.0 mm, 5 um) kolonda (Metanol:%0,02'lik amonyak çözeltisi) (70:30 ,V/V) mobil fazı ile yürütmüşlerdir. LOQ 1µg/ml olup kalibrasyon eğrisi 1-100µg/ml aralığındadır. Geliştirdikleri yöntem ile trokserutin'in plazmadaki stabilite çalışmasını yapmışlar ve oda sıcaklığında 24 saat içerisinde oldukça stabil olduğunu göstermişlerdir (10).

Jianshe ve ark. LC-ESI-MS analiz yöntemiyle trokserutini tavşan plazmasında analizini yapıp farmakokinetik incelemesini yapmışlardır. İnternal standart olarak paeoniflorini seçmişlerdir ve, (metanol: asetonitril) (3:1,V/V) ile protein çöktürmeyle numuneleri kromatografik koşula hazırlamışlardır. Kromatografik ayrılma Allure (TM) PFP Propil (2.1 mm × 100 mm, 5 µm) kolonda (metonol-su) ile yapılan gradient elüsyon yöntemiyle sağlanmıştır. Yönteme göre trokserutin'in LOQ değeri 10ng/ml olup kalibrasyon aralığı 10-5000ng/ml'dir (11).

Cui ve ark. trokserutini insan plazmasında tramadol iç standartı kullanarak LC-MS/MS yöntemiyle çalışmışlardır. (Etil asetat: izopropanol) (95:5, V/V) ile gerçekleştirilen sıvı-sıvı ekstraksiyon işleminin ardından 10mM'lik amonyum asetat ,% 0,1'lik formik asit ve metanolden oluşan mobil faz sistemiyle gradient elüsyon işlemi uygulanmıştır. Doğrusallık aralığını 0,01-10 ng/ml olarak bulmuşlar ve geliştirilen yöntemi farmakokinetik çalışmaya uygulamışlardır (5).

Qinghua ve ark., trokserutin'in insan plazmasındaki konsantrasyonun ölçüm belirsizliğini değerlendirmişlerdir. Trokserutin'in konsantrasyonunu LC-MS/MS yöntemiyle tayin etmişlerdir (12).

Fei ve ark. trokserutinini insan plazmasında kantitatif tayinini çalışmışlardır. Kolon olarak Phenomenex Synergi Fusion RP , mobil faz olarak (asetonitril:%0,1'lik formik asit) (80:20, V/V) kullanarak kromatografik koşulları belirlemişler ve LC-MS/MS yöntemini pozitif modda kullanarak geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntemi, 18 sağlıklı gönüllüye uygulanan 300 mg 'lık trokserutinini farmakokinetik çalışmasına uygulamışlardır (13).

### 2.1.2.2. HPLC Yöntemi ile Yapılan Çalışmalar

Hepsebah ve ark. tabletten trokserutini kalsiyum dobisilat ile birlikte farmasötik preparattan ters faz sıvı kromatografisi yöntemiyle analiz etmişlerdir. Geliştirdikleri yöntemde Enable C18G (250 × 4.6 mm; 5µ) kolon ve (ACN:MeOH:0,02M potasyum dihidrojen fosfat-pH:4) (25:10:65, V/V/V) mobil fazını 0,5 ml/dk akışta kullanmışlardır. Trokserutin için LOQ değerini 1 µg/ml ve LOD değerini 0,5 µg/ml bulup kalibrasyon eğrisi 62,5-250 µg/ml aralığındadır (14).

Jie-ming ve ark. trokserutin ve kumarini tabletlerden ters faz gradient elüsyon yöntemiyle analiz etmeye çalışmışlardır. Etken meddelerin dedeksiyonu Venusil C18 kolonda, pH4,4 0,1 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve ACN mobil faz kombinasyonu ile gerçekleştirmişlerdir. Çalışılan dalga boyu 276 nm ve belirledikleri lineer kalibrasyon aralığı trokserutin için 1,00-200,98 µg/ml'dir. Geliştirilen yöntemi trokserutin-kaumarin tabletlerine uygulamışlardır (15).

Morugina ve ark. farmasötik preparatlardan trokserutin, dekspentanol, benzokaine ve metil parahidroksibenzoat etken maddelerinin HPLC yöntemiyle eş zamanlı analizi için yöntem geliştirmişlerdir. Kromatografik ayrılma, C18 kolonda (50×2.0 mm, 2 µm ya da 150×4.6 mm, 5 µm) %0,05'lik H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ve ACN ile gradient elüsyonda gerçekleşmiştir. 206, 256, 288 nm olmak üzere üç farklı dalga boyu kullanmışlardır. (16).

Shuiwang, trokserutinini enjeksiyon preparatlardan HPLC ile miktar tayinini yapmıştır. LiChrospher 100 RP-18e (5 µm, 4.0 mm X 250 mm) kolonu ve (ACN:tetrahidrofuran: pH3,5 0,01M'lık NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (14:6:80, V/V/V) mobil fazını kullanmıştır. Dedeksiyon dalga boyu olarak 254 nm'yi seçmiştir. Lineer kalibrasyon aralığını 47- 330 µg/ml olarak bulmuştur (17).

Zheng ve ark. trokserutini plazma matriksinde RP-HPLC metodunu kullanarak çalışmışlardır. Kolon olarak Hipersoil BDS-C<sub>18</sub> kolon, mobil faz olarak (MeOH:Su:Asetik asit) (40:60:5, V/V/V) kullanmışlar ve UV dalga boyunu 254nm olarak seçmişlerdir. LOD değerini 50 ng/ml ve doğrusallık aralığını 1,0-50,0 µg/ml olarak bulmuşlardır (18).

Gong-Jun ve ark. fare ve civciv plazmasında aynı anda altı flavonoid ve trokserutin tayini için UV-HPLC metodunu kullanmışlardır. Kromatografik ayrılma, VP-ODS kolon (150 mm × 4.6 mm, 5.0 µm) ve (Su:MeOH:Asetik asit) (57:43:1, V/V/V,pH3) mobil fazını 0,8 ml/dk akışta uygulayarak gerçekleştirmişlerdir. Trokserutin için lineer kalibrasyon aralığı 0,50-350,00 µg/ml 'dir (19).

Hui ve ark. atsidum benzoikunu iç standart olarak kullanarak trokserutini plazmada RP-HPLC yöntemi ile analiz etmişlerdir. Sistemde mobil faz (MeOH:Su:Asetik asit) (40:60:5, V/V/V); kolon sıcaklığı 30°, akış hızı 0,8ml/dk ve dalga boyu 254nm'dir. LOQ değeri 1ng/ml olup lineer kalibrasyon eğrisi 1-50ng/ml arasındadır (20).

Zhensheng trokserutini türevleyerek floresans dedektörlü HPLC'yle insan plazmasında analiz etmiş ve farmakokinetik çalışmalar için önermiştir. LOQ 'yu 1ng/ml olarak bulup kalibrasyon eğrisi aralığı 1,25-40 ng/ml'dir (21).

Dittrich ve ark. insan plazmasında ve idrarında 3'-4',7- tri-O-(beta-hidroksi-etil) rutosid'inin (trokserutin) analizini gerçekleştirmişlerdir. Bunun için XAD-2-trihidroksietilrutosid ayrılıp tetrahidroksietilrutosid floresans dedeksiyonla tayini yapılmıştır. İlacın insana oral olarak uygulanmasından sonra farmakokinetiği ölçülmüştür (22).

### 2.1.2.3.Spektrofotometrik ve Spektroflorometrik Yöntemler ile Yapılan Çalışmalar

Khattab ve ark., trokserutin ve karbazokromu enjeksiyon preparatlardan tayini için çeşitli spektrofotometrik metotlar geliştirmişlerdir. Trokserutin için kalibrasyon eğrisi aralığını 5,00-50,00µg/ml olarak bulurken, karbazokrom için ise 0,50-10,00 µg/ml olarak bulmuşlardır (6).

Ya Hong ve ark. , trokserutinün farmasötik preparatlardan tayini için hızlı ve hassas spektrofotometrik ve spektroflorometrik metotlar geliştirmişlerdir. Yöntem, florojenik reaksiyon ürünü veren hemoglobinin hidrojen peroksit üzerindeki aktivitesini trokserutinün inhibe etmesine dayanmaktadır. Reaksiyon ürününün eksitasyon dalga boyu 550nm , emisyon dalga boyu 575nm'dir. İnhibasyonun konsantrasyonla doğru orantılı olduğunu bulmuşlar ve 0,04-1,5 µg/ml aralığında çalışmışlardır (23).

Suhua ve ark. , trokserutinün miktar analizi için spektrofotometrik bir metot önermişlerdir. Yöntem, bazık boraks solüsyonunda potasyum ferrisiyanid oksidasyonundan sonra 4-aminoantipirininle olan kromojenik bir reaksiyona dayanmaktadır. Önerilen yöntemin  $1.6 \times 10^{-5}$ -  $2.4 \times 10^{-4}$  mol/L<sup>-1</sup> aralığında lineer aralığa sahip olduğunu bulmuşlardır (24).

Hong ve ark. trokserutin tabletlerinde hem trokserutin hem de rutin kalıntılarını analiz edebilen çift ışık yollu UV spektrometre yöntemini geliştirmişlerdir. Trokserutin için lineer kalibrasyon aralığını 0,00-43,04 µg/ml olarak bulmuşlardır (25).

Prodromos ve Pantelis, submikromolar konsantrasyonlarda trokserutinün spektrofotometrik dedeksiyonunu Ce(IV) - Arsenezo III birleştirilmiş redoks kompleksleşme reaksiyonu yardımıyla başarmışlardır. Kompleksin max. absorpsiyonu 615 nm ve 655nm dalga boylarındadır. Trokserutin için lineer kalibrasyon aralığını 0,1-0,8 µg/ml olarak bulmuşlardır. Prodromos'un diğer bir çalışmasında da oksidatif 3-metilbenzodiazolin-2-1-hidrazon reaksiyonu temel alınarak trokserutinün bulk ve farmasötikte tayinini gerçekleştirmişlerdir. Reaksiyon ürününün max. absorpsiyonu 540nm'dir. Lineer kalibrasyon aralığını 2-30 µg/ml olarak bulmuşlardır. Her iki metodun

analiz sonuçlarını t-testi ve f-testi uygulayarak karşılaştırmışlar ve arada önemli bir farkın olmadığını göstermişlerdir (26-27).

Poctova ve Kakac, borik ve okzalik asitli iyotla form bulmuş üçlü kompleksin floresans yoğunluğunu kullanarak trokserutin için hassas bir analitik metot geliştirmişlerdir. Kompleksin asetonitril solüsyonundaki eksitasyon dalga boyu 450 nm, emisyon dalga boyu 503 nm'dir. Doğrusallık aralığını 0.02 µg-1.0 µg/mL olarak bulmuşlardır (28).

#### 2.1.2.4. Diğer Yöntemler

Xiao-li ve ark., trokserutin tayini için, alkali ortamda  $K_2S_2O_8$  ile luminol kemilüminesansının trokserutin tarafından inhibe edildiği yönteme dayanan bir akış enjeksiyon kemilüminesans yöntemi geliştirmişlerdir. Bulunan LOD değeri  $8.0 \times 10^8$  mol/L olup lineer aralık  $1.0 \times 10^{-7}$ -  $6.6 \times 10^{-5}$  mol/L'dir. Geliştirilen yöntemi trokserutin tablet formuna uygulamışlardır (29). Xiao-li ve ark.'larının trokserutin tayini için geliştirdiği diğer bir kemilüminesans yöntemini,  $MnSO_4$  ve  $KIO_4$  sistemiyle gerçekleştirmişlerdir. Optimum koşullar altında trokserutin LOD değerini  $7 \times 10^{-8}$  g/mL, kalibrasyon lineer aralığını  $2.0 \times 10^{-7}$  g/mL- $8.0 \times 10^{-5}$  g/mL olarak bulmuşlardır (30).

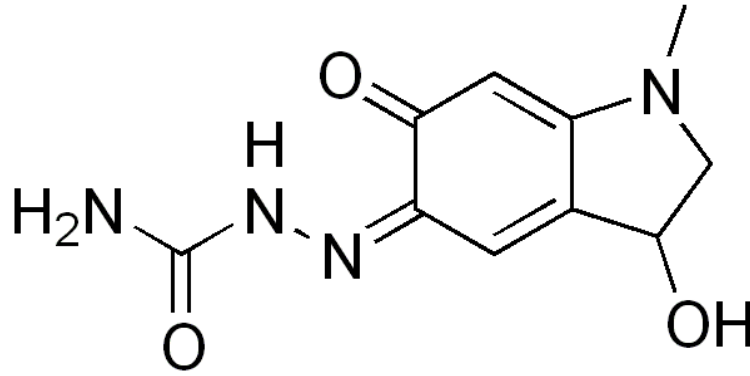
Shu-hua ve ark. trokserutin enjeksiyon ve tabletlerde tayini için, rhodamin 6G varlığında sodyum hidrosit ortamında trokserutinle ferrisiyanidin kemilüminesans reaksiyonuna dayanan bir akış enjeksiyon kemilüminesans yöntemi uygulamışlardır (31).

Huaizhong ve ark. , Venoruton enjeksiyonları ve Venoruton tabletlerinde trokserutin tayini için short kapiler zone elektroforez metodu geliştirmişlerdir. Kalibrasyon eğrisinin 0,1-0,7mg/ml olarak bulmuşlardır. Huaizhong ve ark., trokserutin tabletlerinden trokserutin tayini için geliştirdiği diğer bir önemli metot da monolitik kapiler elektroforez yöntemidir. LOD değeri  $2.2 \mu\text{g/mL}^{-1}$  , LOQ değeri  $7.3 \mu\text{g/mL}^{-1}$  ve kalibrasyon eğrisi aralığı 0.2022-0.8088 mg/mL'dir (32-33).

Silvestri, bromofenindion, trihidroksietilrutosid (trokserutin), glibenklamid ,koenzim A, doksisisiklin içeren farmasötiksel ürünlerde polagrafik tayin yönüyle kantitatif analiz yapmıştır (34).

Deppeler ve Becker, pridoksin (vitamin B6), trokserutin (vitamin P4) , pridoksal ve pridoksamin ve 5-kloro-7-iodo-8-kuinolinol için farmasötiksel karışımlarda kağıt kromatografisi yöntemi kullanarak tayin yapmışlardır (35).

### 2.1.3 Karbazokromun Kimyasal ve Farmakokinetik Özellikleri



**Şekil 2-2:Karbazokromun Molekül Şekli**

Adrenokrom, adrenalinin (epinefrin) bir oksidasyon ürünüdür. Stabil değildir fakat; Braconier (1943) adrenokromu, monosemikarbazon ile kombine ettiği zaman stabil olan adrenokrom monosemikarbazidi(karbazokrom) bulmuştur. Çözünürlüğü çok zayıf olan bu maddenin sodyum salisilat veya sodyum sülfonatla kompleks halindeyken çözünürlüğü artmakta ve böylece, kas içi enjeksiyonla veya oral yolla verilebilir hale gelmektedir (36).

Bir adrenokrom türevidir olan karbazokrom sodyum sülfonat kimyasal olarak 1-metil-6-okso-2,3,5,6-tetrahidroindol 5-semikarbazon-2-sülfonik asit sodyum tuzu, üç hidrat şeklindedir (Şekil 2-2). Molekül formülü  $C_{10}H_{11}N_4NaO_5S$  olup 322,27 g/mol molekül ağırlığına sahiptir. pKa'sı 7,43'dür. Suda 5mM'a ,dimetilsülfoksitte 100mM'a kadar çözünmektedir (37).

Karbazokrom, kılcal damarların hassaslığından kaynaklanan kanamaların tedavisinde sıkça kullanılır. Literatürde damar içi kullanıldığında akciğer fonksiyon bozukluğunu hafiflettiği ve vasküler geçirgenliği azalttığı rapor edilmiştir. Ayrıca, endotelial bariyer fonksiyon bozukluğunu, Ca (2+) iyonoforlar tarafından zengin endotelial geçirgenliği etkilemeden tersine çevirebildiğinden de bahsedilmektedir (38).

Funahara ve ark.'nın , ikinci dereceden Dang kanamalı ateşi ( Dang Humma) tanısı konmuş hastalarda karbazokrom sodyum sülfonatin etkisini incelemişlerdir. Şiddetli kanamayı ve şok riskini elimine etmede kullanışlı olabileceğini göstermişlerdir.

Min ve ark. yirmi dört sağlıklı Çinli erkek gönüllüye 90mg'lık karbazokrom sodyum sülfonatu oral olarak vererek farmokinetik çalışmasını yapmışlar ve  $C_{max}$ 'ı (21,0 ± 8,4) ng/ml ,  $t_{max}$ 'ı (1,2 ± 0,5) saat olarak belirlemişlerdir. Yarılanma ömrü ( $t_{1/2}$ ) ve konsantrasyon zaman eğrisi altında kalan alan , sırasıyla (2,5 ± 0,9) s ve (65,9 ± 25,3) s.ng/ml olarak bulunmuştur (38).

## 2.1.4. Karbazokromun Miktar Analiziyle İlgili Literatür Çalışması

### 2.1.4.1. LC-MS/MS ve LC-MS Yöntemi ile Çalışmalar

Min ve ark., insan plazmasında karbazokrom sodyum sülfonat tayini için atmosferik basınç iyonizasyonlu LC-MS/MS yöntemi geliştirip valide etmiş, farmakokinetik uygulamasını gerçekleştirmişlerdir. İnternal standart olarak amilorid hidroklorid seçilmiş, %14'lük perklorik asitle protein çöktürme işlemini gerçekleştirmişlerdir. Analitler, Hypersil ODS-2 kolonda, %0,2'lik formik asit ve metanolden oluşan çok basamaklı gradient elüsyonla ayrılmıştır. LOQ değeri 0,5 ng/ml olarak bulunmuş ve 0,5-50 ng/ml konsantasyon aralığında yöntem valide edilmiştir (38).

Xingjang ve ark., insan plazmasında karbazokrom sodyum sülfonat kantitatif tayini için katı-faz ekstraksiyon ve elektrospray iyonizasyonlu LC-MS/MS sistemini optimize edip validasyonunu yapmışlardır. Kromatografik ayrılma Zorbax SB-Aq (4.6×250mm, 5µm) kolonda izokratik koşullar altında gerçekleşmiştir. Lineer aralık 0,189-37,8 ng/ml'dir. Geliştirdikleri yöntemi, biyoeşdeğerlilik çalışmasına başarıyla uygulamışlardır (39).

### 2.1.4.2. HPLC Yöntemi ile Yapılan Çalışmalar

Ronggui ve ark., karbazokrom sodyum sülfonatın enjeksiyon preparatlardan tayini amacıyla HPLC metodunu geliştirmişlerdir. Yöntem için C<sub>18</sub> kolon ve mobil faz olarak da asetik asit-sodyum asetat tamponuyla metanol (90:10, V/V) sistemi seçilmiştir. Dedeksiyon dalga boyu 363 nm'dir (40).

Biao ve ark., enjeksiyondan karbazokrom ve ilgili maddelerin HPLC'de analiz metodunu geliştirerek valide etmişlerdir. pH3,0 0,01M NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-etanol (10:1,V/V) mobil fazıyla birlikte Diamonsil C<sub>18</sub> kolon (200 mm × 4.6 mm, 5 µm) kullanmışlardır. Dedeksiyon dalga boyu 360 nm, akış hızı 1,2 ml/dk'dır. Kalibrasyon eğrisi 50-250 mg/ml arasında doğrusaldır (41).

Ying-heng ve ark., karbazokrom tabletlerinden karbazokrom tayini için HPLC metodunu kullanmışlardır. HPLC koşulları; Nucleodur C<sub>18</sub> kolon, mobil faz olarak metanol-su (15:85, V/V) karışımı ve dalga boyu 355 nm'dir. 20-200µg/ml konsantrasyon aralığında iyi sonuçlar elde etmişlerdir (42).

Lan-lan ve ark., karbazokromu enjeksiyon preparatlardan HP-ODS Hypersil kolonda HPLC gradient elüsyon yöntemini kullanarak analiz etmişlerdir. pH 3,0 0,01M fosfat tamponu ve asetonitril mobil faz karışımını kullanmışlar ve dedeksiyon dalga boyunu 220nm'ye ayarlamışlardır. Karbazokromu; asit, baz, ısı ve oksidasyon gibi koşullarla muamele ederek bozunma ürünlerinin analizini yapmışlardır (43).

Xiaoyan ve Fei, karbazokrom sodyum sülfonatu enjeksiyon preparatlarında HPLC metodunu kullanarak çalışmışlardır. Lichrospher C<sub>18</sub> kolonu (4.6 mm × 250 mm, 5 µm) kullanmışlardır. Mobil faz 0,15 mol/L amonyum asetat- metanol ( 90:10, V/V), akış hızı

1,0ml/dk ve dedeksiyon dalga boyu 363nm'dir. Yöntemin çalışma aralığı 9,96-89,60mg/L'dir (44).

Shun-wang ve ark., karbazokrom ve glukoz enjeksiyonlarının analizi için HPLC metodunu C<sub>18</sub> kolonda geliştirmişlerdir. Mobil faz (%0,12'lik NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:ACN), (91:9, V/V)'dan oluşmaktadır. Akış hızı 1,0ml/dk ve dedeksiyon dalga boyu 363nm'dir. Yöntemin 11,65-58,25 mg/ml arasında lineer olduğunu göstermişlerdir (45).

Jie ve ark., enjeksiyon preparatlarında karbazokrom ve bozunma ürünlerinin tayinini HPLC yöntemini kullanarak yürütmüşlerdir. Analiz için 355nm dalga boyu, kolon olarak Diamonsil C18 ve mobil faz olarak %0,1'lik trietilamin içeren pH 3,8 MeOH-0,01M'lık KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (25:75) kullanmışlardır (46).

### **2.1.4.3. Spektrofotometrik ve Spektroflorometrik Yöntemler ile Yapılan Çalışmalar**

Xioujuan ve ark., biyolojik sıvılarda karbazokrom tayini için karbazokromun eosin ya da floksinle asidik ortamda reaksiyonuna dayanan hassas ve hızlı spektrofloresans metodu geliştirmişlerdir. Sırasıyla eksitasyon dalga boyları, 301nm ve 305 nm; emisyon dalga boyları 545 nm ve 565 nm'dir. Eosinli sistemin LOD değeri 9,1ng/ml ve kalibrasyon aralığı 0,03-1,5 µg/ml'dir. Floksinli sistemin ise LOD değeri 22,7 ng/ml ve kalibrasyon aralığı 0,08-1,25 µg/ml'dir. Yine karbazokromun florometri yöntemiyle tayini için, Britton-Robinson tamponu ortamında karbazokromu dikloroflorosein , dibromoflorosein ya da diiodoflorosein ile türevi haline getirmişlerdir. Diklorofloroseinli sistemde max. emisyon dalga boyu 536nm ve LOD değeri 5,7ng/ml; dibromoflorosein sistemde max. emisyon dalga boyu 536nm ve LOD değeri 5,7ng/ml; diiodofloroseinli sistemde max. emisyon dalga boyu 560nm ve LOD değeri 129,6 ng/ml'dir. Yöntem serum ve idrarda karbazokrom bulmak için kullanılmıştır. Britton-Robinson tamponu kullandıkları diğer bir çalışmalarında ise karbazokromu , triptofan, tirozin ve fenilalanin gibi bazı aromatik amino asitlerle reaksiyona sokup spektrofloremetrik yöntemini geliştirmişlerdir. Triptofanlı sistemde max. emisyon dalga boyu 352 nm ve LOD değeri 31,3ng/ml; Tirozinli sistemde max. emisyon dalga boyu 303 nm ve LOD değeri 44,6ng/ml; Fenilalaninli sistemde max. emisyon dalga boyu 284 nm ve LOD değeri 315ng/ml'dir. Bu yöntemi kan ve idrarda karbazokrom bakmak için kullanmışlardır (47,48,49).

Binbin ve ark., karbazokrom tabletlerinin içerik tayini için hızlı ve doğruluğu yüksek spektrofotometri yöntemi geliştirmişleridir (50).

Hong-fu ve Fang enjeksiyon preparatlarından karbazokrom tayini için spektrofotometri metodunu geliştirip kullanmışlardır. UV deteksiyon dalga boyu 363 nm'dir. Standart eğri 3,2-12,8mg/L arasında doğrusaldır (51).



#### 2.1.4.4. Diğer Yöntemler

Lin ve ark., asidik potasyum permanganatta karbazokromu oksidasyona uğratarak kemilüminesans oluşumuna dayalı bir yöntem oluşturmuşlardır. LOD değeri  $2.0 \times 1.0^{10} \mu\text{g mL}^{-1}$  ve doğrusal aralık  $7.0 \times 1.0^{-10} - 1.0 \times 1.0^{-7} \mu\text{g/mL}$ 'dir. Bu metodun ilaç kalite kontrolü analizlerine uygun olduğunu belirtmişlerdir (52).

Feng ve ark., sodyum-periodat-karbazokrom salisilat sistemlerde, karbazokrom salisilatı kemilüminesans ile tayin etmişlerdir. Bulunan LOD değeri  $2.7 \times 10^{-9} \text{ g/mL}$  ve çalışma eğrisinin lineer aralığı  $8.0 \times 10^{-9} - 1.0 \times 10^{-6} \text{ g/mL}$ 'dir (53).

Zhao-zhong karbazokromu, doğrusal tarama salınım poligrafisi ile analiz etmek için yöntem geliştirmiş ve valide etmişlerdir (54).

C.Suresh ve ark., tabletlerde karbazokrom kantitatif tayini için basit ve doğru polagrafik yöntem geliştirmişlerdir. Yöntemin  $0,4 - 10,0 \mu\text{g/mL}$  konsantrasyonları arasında kalibrasyon eğrisinin lineer olduğu görülmüştür. Bulunan LOD değeri  $0,18 \mu\text{g/mL}$ 'dir (55).

Boting ve ark. , karbazokrom sodyum sülfonat miktar tayini için katyon değiştirici reçine yöntemini kullanmışlardır (56).

## 2.2. Kromatografi

Ayırma işleminde, analitin bulunduğu ortamdan kantitatif olarak alınırken, matrikteki diğer maddelerin kantitatif olarak buldukları ortamda kalması istenir. Bu şartları yerine getiren bir ayırmaya seçici veya spesifik ayırma denir. Böyle ayırmalara imkan veren metotların başında kromatografi gelmektedir.

Kromatografik ayırmalar, biri sabit öteki hareketli olan iki faz (ortam) arasında gerçekleştirilir. Ayrılması istenen madde veya maddeler çözünmüş halde hareketli faza ilave edilir. Hareketli faz sıvı, gaz veya süper kritik bir akışkan olabilir. Hareketli faz bir kolon içinde, ya normal gravitasyon (yer çekimi) kuvvetiyle ya da basınçla kolondaki sabit faz içinden geçirilir. Bu esnada hareketli fazda çözünmüş halde bulunan maddelerle sabit faz arasında fiziksel veya kimyasal bazı çekim kuvvetleri meydana gelir. Bu çekim kuvvetleri her madde için ayrıdır. Bu yüzden her maddenin tanecikleri kendi aralarında kümeler meydana getirerek kolonda bantlar halinde yol alır ve kolon içindeki hızları farklı olur. Sabit fazla arasındaki çekim kuvveti en az olan kolon içinde en hızlı yol alırken, sabit fazla arasındaki çekim kuvveti en çok olan madde en yavaş yol alır. Böylelikle aynı anda kolona verilen maddeler, kolonun çıkışına farklı zamanlarda ulaşırlar (57).

Yapılacak çalışmanın türüne ve çalışılacak maddenin özelliklerine göre seçilebilecek çeşitli kromatografi tipleri mevcuttur. Kromatografiyi hareketli fazın cinsine göre sınıflarsak (57);

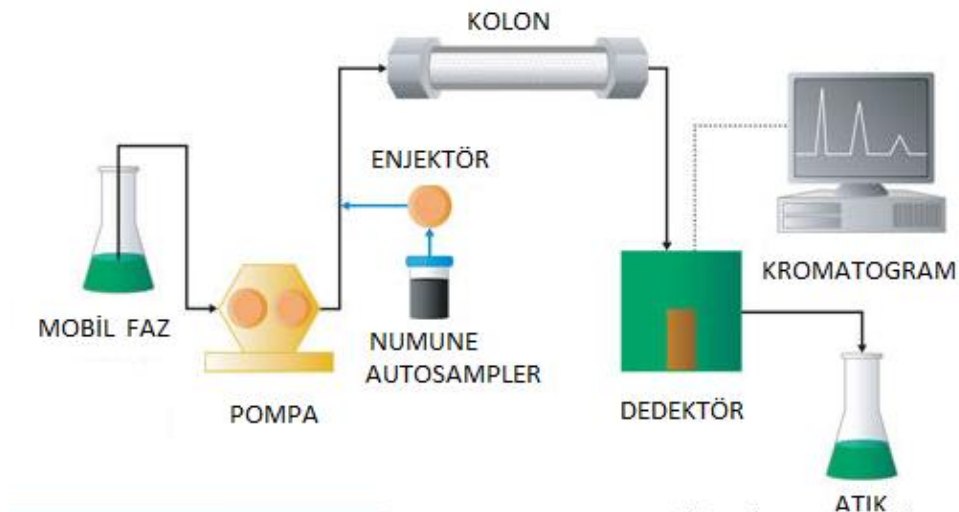
- Süper kritik akışkan kromatografisi
- Gaz kromatografisi
- Sıvı kromatografisi; En yaygın kullanıma sahip kromatografi türüdür. Geleneksel sıvı kromatografisi preparatif çalışmalarda karışımdaki bileşikleri izole edip saflaştırmak için kullanılır. Analitlerin dedeksiyonu ve kantifikasyonu için daha komplike olan yüksek performanslı sıvı kromatografisi sistemleri kullanılır.

### 2.2.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Sıvı kromatografisinin geliştiği ilk yıllarda, bilim adamları, kolon veriminin dolguda kullanılan taneciklerinin boyutunun azaltılması ile önemli ölçüde artacağını farketmişlerdir. Kolonu uygun büyüklükte dolgu maddesiyle doldurup kolonun üstünden yüksek basınç uygulamışlar ve bu yöntem ile daha iyi sonuç elde ettiklerini görmüşlerdir. Böyle yüksek basınç altında küçük dolgu maddeleriyle doldurulmuş bir kolonda yapılan kromatografi türlerine *yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)* denir (57,58).

HPLC, analitik ayırma teknikleri amacı ile en yaygın kullanılan cihazdır. Yaygın kullanılma sebepleri duyarlılığı, kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen bileşiklerin ayrılmasına uygunluğudur. En önemlisi ise sanayinin birçok bilim dalının ve toplumun birinci derecede ilgilendiği maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir. Bu tip bileşiklere örnek olarak amino asitler, proteinler, nükleik asitler, karbonhidratlar, ilaçlar ve pestisitler verilebilir (58).

Modern sıvı kromatografi sistemlerinde genel olarak kullanılan, tanecik boyutu 2 ile 10  $\mu\text{m}$  arasında olan dolgu maddeleri ile uygun sıvı akış hızları elde edebilmek için, yüzlerce atm'lik pompa basınçlarına gerek vardır. Bu yüksek basınçların bir sonucu olarak HPLC için gerekli donanım, diğer tip kromatografi sistemleri dikkate alındığında, daha ince işçilik gerektirir. Tipik bir HPLC'nin önemli parçaları Şekil-2-5'de gösterilmektedir.



Şekil 2-3:Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Sistemi (HPLC )(59)

### 2.2.1.1. HPLC Sisteminin Parçaları

#### 2.2.1.1.1.Hareketli Faz Hazneleri ve Çözücü Sistemleri

Modern bir HPLC cihazı, bir veya daha fazla, her biri 200-1000 ml çözücü içeren camdan veya çelikten yapılmış hazne içermektedir. Bu hazneler çoğu zaman, kolonda ve dedektör sisteminde gaz oluşturarak bozucu etkilere sebep olan çözünmüş gazların (genellikle oksijen ve azot) giderilmesi için bir cihazla donatılmıştır. Bu gaz kabarcıkları bant genişlemesine; ayrıca çoğu zaman dedektörün performansında bozucu etkilere sebep olurlar. Bu sebeple gaz giderici üniteler HPLC'nin önemli bir parçası olmakla birlikte zorunlu bir parçası değildir. Örneğin, çözücüyü hazneye doldurmadan önce uygulanacak uygun bir yol, çözücüyü vakum altındaki bir milipor süzgeçten süzmektir. Bu uygulama süspansiyon halindeki maddeleri uzaklaştırmanın yanı sıra gazları da giderir.

Modern HPLC ekipmanları çoğu zaman, çözücülerin hacimsel oranı zamanla doğrusal olarak değiştirilebilecek şekilde, iki veya daha fazla hazneden aldığı çözücülerini bir karıştırma odasında sürekli olarak değişen hızlarda bir araya getiren sistemlerle donatılmıştır. Bu da izokratik elüsyon yanında gradient elüsyona olanak sağlamaktadır (59).

#### 2.2.1.1.2.Pompa

Temel olarak pompa mobil fazın yüksek basınçla HPLC sistemi içinde hareket etmesini sağlar, degazörden mobil fazı çekip, örnekleme ve kolon ünitesine gönderir, bu işlemi akış hızını ve basınç değerini ayarlayarak gerçekleştirir. Analitik HPLC pompaları genellikle 0.1 – 5mL akış değerleri arasında kullanılır. Mobil faz adedi ve karıştırma kabiliyetlerine görede İzokratik (Tek Kanallı) , Binary Gradient (Çift Kanallı Mikserli) ve Kuarternar Gradient (Dört Kanallı Mikserli-Miksersiz) olarak dizayn edilir. İzokratik çalışmalarda mobil faz önceden karıştırılıp hazırlanır, gradient çalışmalarda karışım değişik zamanlarda değişik oranlarda yapılabilir. Bu sayede analiz kalitesi arttırılıp, analiz süreleri azaltılabilir. Günümüzde Nano ve Ultra Basınçlı pompaların kullanılmaya başlamasıyla, HPLC sistemleri UHPLC ve nHPLC gibi isimlendirilmektedir. Uzun süreli kullanım ve tekrarlanabilir sonuçlar için pompa temizliği ve bakımına dikkat edilmelidir [58].

Kuaternar Pompa; Bir çözücü kabini, bir vakum degazer ve bir dört kanallı gradient pompa içerir. Dört kanallı gradient pompada, yüksek hızlı oranlayıcı valf ve pompa tesisatı bulunmaktadır. Düşük basınç gradient akış üretimi sağlar. Çözücü kabini dört adet birer litrelik şişe için yeterli alan sağlar (60). Çalışılan HPLC sistemi bu pompa türüne sahiptir .

### 2.2.1.1.3.Enjeksiyon Sistemleri

Numune enjeksiyonu yüksek basınçta yapılır. Enjekte edilen numune, yüksek basınçta hareket eden hareketli faza (sıvıya) karışır ve kolona hareketli fazda çözünmüş şekilde ulaşır. Bu enjeksiyon işlemi sağlayan sistemler temel olarak iki tiptedir; Manuel (El tipi) ve Oto örnekleyici (Otomatik) modeller. Manuel örnekleyicilerde numune bir şırıngaya çekilip valf yardımıyla sisteme gönderilir. Bu tip sistemlerde enjeksiyon tekrarlanabilirliği hiç iyi değildir. Oto örnekleyicilerde ise bu işlemleri cihaz kendisi yapabilmektedir ve tekrarlanabilirlik çok iyidir. Bu yüzden oto örnekleyiciler, HPLC sistemlerinin vazgeçilmez bir parçası haline gelmiştir. Bazı oto örnekleyicilerin soğutma, ısıtma, seyreltme ve karıştırma özellikleri vardır. 10 vialden 1000 vial kadar değişik kapasitede olanları bulunabilir [61].

### 2.2.1.1.4.Kolon ve Kolon Dolgu Maddesi Tipleri

Bir HPLC sistemin performansı, kolonda gerçekleştirilen ayırma ile yani, doğru kolon tipi ve dolgu maddesinin verimiyle tayin edilir. Kolon verimliliğini doğrudan etkileyen parametreler ise kullanılan kolon dolgu maddesinin fiziksel özellikleri, parçacık boyutu ve kolonun uzunluğudur (62).

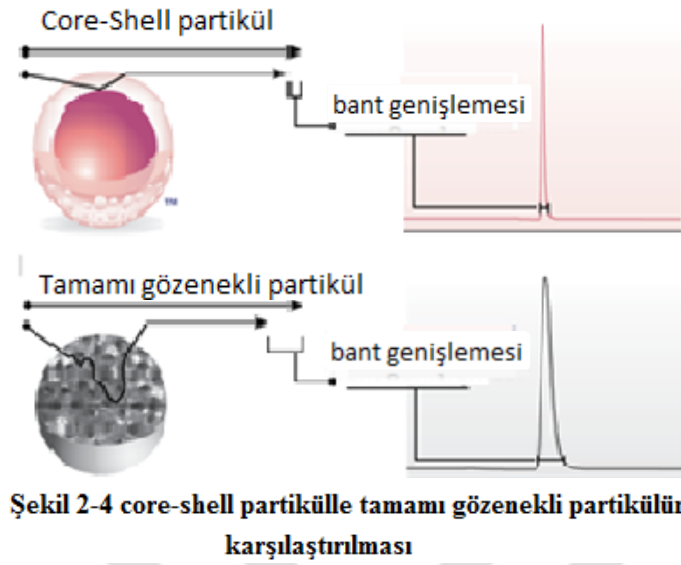
**Kolon Uzunluğu** ; Kullanılan kolonun boyu doğrudan verimliliği etkilemektedir. Kolon boyundaki artış verimliliği arttırmaktadır. Fakat rezolüsyonu arttırmak için kolon boyunu uzatmak iyi bir yol değildir. Kolon boyundaki artış analiz süresinin uzamasına neden olurken, sistem geri basıncını da artırır (62).

**Silika Türü**: Kolon dolgu maddesi olarak seçilen silika türü doğrudan alıkonma zamanı ve pik şekillerini etkilemektedir. Normal silika yüksek oranda ağır metal kalıntıları içerirken, bu ağır metal kalıntıları aminler, heterosiklik yapılar vb. gibi türler ile etkileşime girmektedir. Silika tercihinde önemli olan diğer bir nokta ise silikanın gözenek yapısıdır. Küçük gözenek hacimleri daha yüksek yüzey alanı sağlarken, silika yüzeyine ligandların daha kontrollü şekilde bağlanmasına olanak verir (62).

**Parçacık Boyutu**: Kolon dolgu maddesinin boyutu (dp) genel olarak mikrometre ( $\mu\text{m}$ ) cinsinden ifade edilir. Valide kolonlarda tüm parçacıkların boyutları eşleniktir ve boyutlar üretici firma tarafından kolon sertifikasında belirtilir. Parçacık boyutu ile kolon etkinliği arasında ters ilişki bulunmakta ve kullanılan dolgu maddesinin boyutu küçüldükçe ayırma etkinliği o oranda artmaktadır. Parçacık boyutu küçüldükçe sistem geri basıncı da karesi oranında artmaktadır (62).

**Durgun Fazın Yapısı**: Metot gelişimi için en önemli nokta spesifik kimyasal ligandlar bağlanmış silika destek yapısı yani kolon dolgu maddesinin seçimidir. Ters faz, normal faz ve HILIC sıvı kromatografinin en sık kullanılan türleridir. Ters fazda en sık kullanılan kolonlar silika yüzeyine ODS olarak bilinen C18 gibi alkil grupların bağlanmış olduğu kolonlardır. Normal fazda ise kolon dolgu maddesi olarak saf silika kullanılmaktadır. Kullanılan diğer durgun fazlar ise siyano ve aminodur (62).

### 2.2.1.1.4.1. Core-Shell Teknolojili Pentaflorafenil Propil Polar Kolanlar



Şekil 2-4 core-shell partikülle tamamı gözenekli partikülün karşılaştırılması

partikül operasyon basıncına sahiptir. Core-shell partiküllerin diğer bir avantajı da, küçük gözenek hacminin boyuna difüzyondan kaynaklanan pik genişlemesini azaltmasıdır. Partikül boyutu ve gözenekli kabuk kalınlığı gibi partikül karakterleri ayırma parametrelerini önemli derecede etkiler. Gözenekli kabuğun kalınlığı azaldıkça daha hızlı kütle transferine, hızlı kütle transferi de kolon etkinliğinin ve aynı zamanda elüsyon hızının artmasını sağlar (63).

Kolon etkinliğini arttıran diğer önemli etken ise pentaflorofenil propil bağlı fazın maddeyle olan beş önemli etkileşimidir (64).

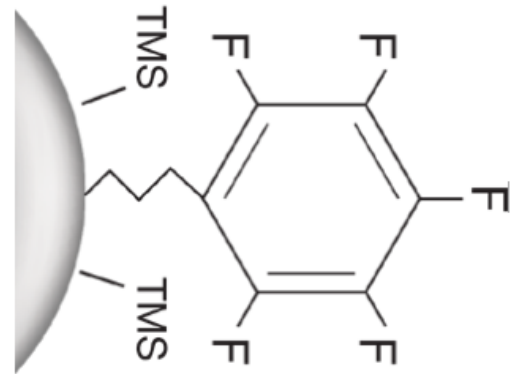
**-Hidrofobik;** Halka ve bağlayıcı karbon iskeleti nötral/hidrofobik alıkonmayı destekler.

**-Aromatik;** Asetonitril olmayan mobil fazlarda, karbon halkasının  $\pi$ - $\pi$  elektronları analitin  $\pi$ - $\pi$  elektronlarıyla etkileşime girer ve retansiyonunu artırır.

**-Elektrostatik;** Florin gruplarının yüksek elektronegatifliği dipol moment yaratır ve polar bileşiklerin retansiyonuna yardım eder.

**-Sterik/Planar;** Sterik etki ile, geleneksel alkil fazlarla ayrılması imkansız olan izomerik ayırmalar gerçekleştirilebilir.

**-Hidrojen bağı;** Elektron alıcı florinin analitin polar grupları ile etkileşime geçmesi etkili bir ayrılma mekanizması sağlar.



Şekil 2-5: Pentaflorofenil propil ligantı

Son zamanlarda, yüksek hızda ve kısmen düşük geri basınçta etkili ayırmalar için, core-shell silika partiküller kullanımı gittikçe artmaktadır. Katı çekirdek artı gözenekli kabuk daha geniş partikül alanı vermekte; bu yüzden daha düşük geri basınç ve daha iyi ayırma olanağı sağlanmaktadır. Örneğin, 2,7 $\mu$ m core-shell yapısındaki silika partiküllerin (1,7  $\mu$ m çekirdek ve 0,5  $\mu$ m gözenekli kabuk) etkisi, 2  $\mu$ m altı mikropartiküllerin etkinliğine neredeyse yakın ve de 3  $\mu$ m

### 2.2.1.1.5. Dedektör

Sıvı kromatografi dedektörleri temel olarak iki tiptir. *Yığın özelliği dedektörleri*, hareketli fazın kırılma indisi, dielektrik sabiti veya yoğunluğu gibi, analit tarafından değiştirilen yığın özelliklerine cevap veren dedektörlerdir. Bunun tersine, analit özelliği dedektörleri, analitin UV absorpsiyonu, floresans şiddeti veya difüzyon akımı gibi hareketli fazın sahip olmadığı bazı özelliklerine cevap veren dedektörlerdir (58).

HPLC’de en sık kullanılan dedektörler (65);

- Absorbans Dedektörü
- Kütle Spektroskopisi Dedektörü
- Floresans Dedektörü
- Refraktif Index Dedektörü (Kırılma İndisi Dedektörü)
- Elektrokimyasal Dedektör
- İletkenlik Dedektörü

#### 2.2.1.1.5.1.UV Dedektörler

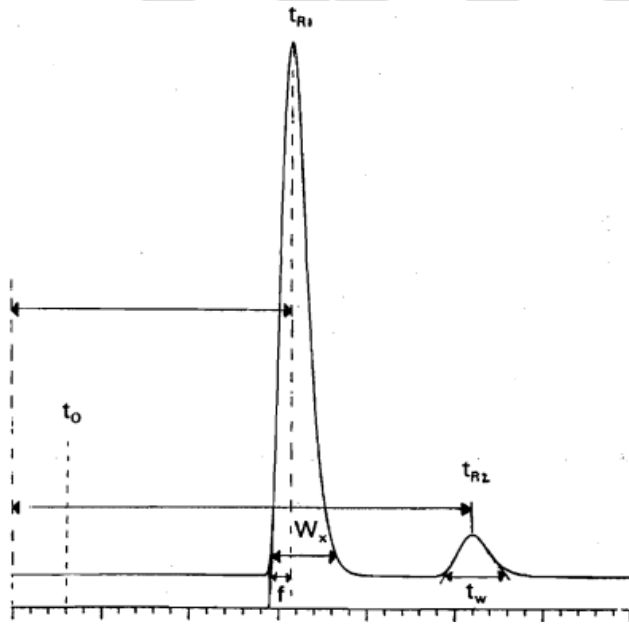
Maddelerin çoğu UV-görünür bölgede çeşitli dalga boylarında absorpsiyon sahiptirler. Bu yüzden en çok kullanılan dedektörlerden biridir. Kantitatif ölçümlerin esası Lambert-Beer yasasına dayanır. Hassasiyetle, yaklaşık olarak  $10^{-8}$ - $10^{-9}$  gr/ml dir. Tüm olefinler, aromatikler,  $>CO$ ,  $>CS$ ,  $-N=O$  ve  $-N \equiv N-$  grupları içeren moleküller gibi pek çok bileşik UV bölgede absorpsiyon yapar. Bu moleküllerin tek veya çift bağları ( $\pi$  elektronlar) vardır veya bağlanmamış elektronları bulunur. Absorbans dedektörleri, akış hücrelerinden geçen sıvının (sabit ya da istenilen değere ayarlanabilir dalga boyunda) ışığın absorpsiyonunu ölçerler. Radyasyon kaynağı UV bölgede (200-400 nm) döteryum lambası, görünür bölgede (400-700) ise tungsten lambadır. Dalga boyu seçicisi olarak monokromatörler kullanılır. 200-800 nm UV ve görünür bölgeyi kapsayan yüksek duyarlılığa sahip dedektörler bulunmaktadır (65).

### 2.3.Sistem Uygunluk Testi

HPLC verilerinin kesinliği ve doğruluğu düzgün geliştirilmiş bir kromatografik sistemle başlar. Sistem uygunluk spesifikasyonları ve testleri bu amacı gerçekleştirmede yol gösterici ve analitik prosedürün ayrılmaz bir parçasıdır.

Sistem uygunluk testi genelde tüm analitik sistemin (cihaz, reaktif, kolon ve analist dahil) istenilen uygulamaya uygun olduğundan emin olmak için laboratuvarlar tarafından kullanılır. Genel amaç, kromatografik uygunluk ve istikrarlı sistem performansından emin olmak için kromatografik sonuçları izlemektir. Bunun için kuyruklanma faktörü, kritik pik çiftlerinin kolon etkinliği ve rezolüsyon test edilir; test standartlarının tekrar enjeksiyonu yapılır.

Amerikan farmakopesine göre sistem uygunluk testleri gaz ve sıvı kromatografisi metotlarının ayrılmaz bir parçasıdır. Bunlar analizin yapılabilmesi için kromatografik sistemin rezolüsyon ve tekrarlanabilirliğinin yeterli olduğunu doğrulamak için kullanılır. Testler için cihaz, elektronik, analitik işlemler ve analiz edilecek örnekler ayrılmaz bir bütünü oluşturur ve böyle değerlendirilir (66).



$W_x$  : Pik genişliği

$f$  : Pikin en tepe noktasından gelen çizgiyle pikin arka cephesindeki mesafe

$t_0$  : Ölü hacim retansiyon zamanı

$t_R$  : Analitin retansiyon zamanı

#### Şekil 2-6: Sistem uygunluk terimlerinin kromatogram üzerinden gösterimi

Aşağıda sistem uygunluk parametrelerinden kısaca bahsedilmektedir (67);

**Kapasite faktörü ( $k'$ )**; İlgili analitin alıkonma zamanının ölü hacmin veya kolonda tutunamayan maddelerin alıkonma zamanına oranının gösterimidir. Kapasite faktörü ne kadar yüksekse analitin kolonla olan etkileşimi o kadar fazladır. Aşağıdaki gibi hesaplanabilir.

$$k' = (t_R - t_0) / t_0$$



**Enjeksiyon Tekrarlanabilirliği;** Numunenin analizi yapıldığı zaman dilimi içerisinde; pompanın, kolonun ve çevresel şartlarının etkilediği HPLC'nin performansdır. Bağıl standart sapma(RSD) olarak gösterilir.

**Seçicilik Faktörü ( $\alpha$ );** İki pikin bağıl lokasyonunun ölçümüdür. Yüksek  $\alpha$  değerleri iyi ayırma gücünü ifade eder. 1'den büyük olmalıdır. Rezolüsyondan ( $R_s$ ) bahsedildiği müddetçe zorunlu bir parametre değildir. Aşağıdaki eşitlikteki gibi hesaplanabilir.

$$\alpha = k'_1 / k'_2$$

**Rezolüsyon ( $R_s$ );** İki pikin ne kadar iyi ayrıldığıнын ölçümüdür. Güvenilir bir kantitatif ölçüm için iyi ayrılmış pikler önemlidir. Aşağıdaki eşitlikteki gibi hesaplanabilir.

$$R_s = (t_{R2} - t_{R1}) / (1/2) (t_{W1} + t_{W2})$$

**Kuyruklanma (T);** Pik kuyruklanması arttıkça kantifikasyon doğruluğu da azalmaktadır. Çünkü integrator, pikin nerde bittiğini belirlemede ve bu yüzden pik altı alanının hesaplanmasında zorluk yaşar. Aşağıdaki eşitlikteki gibi hesaplanabilir.

$$T = W_x / 2f$$

**Teorik Plaka Sayısı (N);** Kolon etkinliğini gösterir. HPLC kolonunda pik dağılımının ölçümüdür. Teorik plaka sayısını etkileyen etmenler; pik pozisyonu, kolonun partikül boyutu, mobil fazın akış hızı, kolon sıcaklığı, mobil fazın viskozitesi ve analitin moleküler ağırlığı. Aşağıdaki eşitlikteki gibi hesaplanabilir.

$$N = 16 (t_R / t_W)^2 = L / H$$

Bu verilerin kabul kriterleri kılavuzlarda belirlenmiştir. Tablo 2-1'de sistem uygunluk testi için kabul kriterleri verilmektedir.

**Tablo 2-1: FDA kılavuzu sistem uygunluk testi için kabul kriterleri**

Parametre	Limit
Kapasite Faktörü	$k' > 2$
Enjeksiyon kesinliği	$RSD < \%1$ , $n \geq 5$
Rezolüsyon	$R_s > 2$
Kuyruklanma faktörü	$T \leq 2$
Teorik plaka sayısı	$N > 2000$

## 2.4. Validasyon

Analitik ölçümün amacı sabit, güvenilir ve doğru veri elde edebilmektir. Valide edilmiş analitik metot bu amaca ulaşmada önemli bir rol oynar. Metot validasyonundan elde edilen sonuçlar; metodun kesinliği, güvenilirliği ve kalitesi hakkında bilgi vererek metodun geçerliliğinin kanıtlanmasını sağlar. Bu amaçla pek çok kılavuz metot validasyonu tarifini yapmıştır. Uluslararası Harmonizasyon Konferansı (ICH) kılavuzunda validasyon spesifiklik parametrelerinden; doğruluk, kesinlik (tekrarlanabilirlik), seçicilik, dedeksiyon limiti, doğrusallık parametrelerinin geçerli kabul kriterlerini yerine getirilmesi istenmektedir (68).

Aşağıda validasyon parametrelerinden kısaca bahsedilmektedir (68);

**Spesifiklik ve Seçicilik;** Yöntemin seçiciliği, analiti örnekte varlığı tespit edilmiş, analit ile girişim yapabilen diğer bileşenlerden farklı olarak ölçme yeteneğidir. Örnek matrisinde bulunması gereken bileşenlerin yanında analiz edilecek maddelerin doğru ve özgün belirlenebilmesi, analitik yöntemlerin seçiciliğini belirler.

**Doğrusallık;** Analitik seyreltmelerde azalan konsantrasyonlarda dedektör cevabının doğrusal olması araştırılır. Analitin değişen konsantrasyonları ile elde edilen verilerden oluşan eğrinin regresyon analizi yapılır. Korelasyon katsayısı, y(ordinat)-kesim noktası, eğrinin eğimi hesaplanarak eğri denklemi elde edilir. Analitik çalışmalarda minimum 5 noktadan doğrusallık gösterilmeli ve korelasyon katsayısı 0.99'dan büyük olmalıdır.

**Doğruluk;** Bir analitik prosedürün doğruluğu, doğru olarak kabul edilen değer ile bulunan değer arasındaki yakınlığı gösterir. Doğruluk; spesifik aralığı kapsayan min. 3 konsantrasyon düzeyinde (düşük-orta ve yüksek konsantrasyon) içeren min. 9 örnekte değerlendirilir. Elde edilen sonuçların yüzde ortalaması alınarak en küçük için  $\pm\%20$ , diğer noktalar için  $\pm\%15$  limitler arasında olup olmadığına bakılır.

**Kesinlik;** Yöntemin kesinliği; herhangi bir değer için tekrarlanabilme kabiliyeti veya bireysel test sonuçlarının belirlenen koşullar altında aynı örneklerin analiz sonuçlarının birbirine yakınlığının ifadesidir. Kesinlik; spesifik aralığı kapsayan min. 3 konsantrasyon düzeyi içeren min. 9 örnekte değerlendirilir. Standart sapma ve bağıl standart sapma (varyasyon katsayısı) elde edilen verilerden hesaplanır. Elde edilen sonuçların en küçük için  $\pm\%20$ , diğer noktalar için  $\pm\%15$  limitler arasında olup olmadığına bakılır ve validasyon raporuna konulur.

**Teşhis Sınırı (LOD);** Her analitik prosedürün dedeksiyon limiti analitin dedekte edilebilen en küçük miktarını belirtir fakat, tam değer ölçülme gibi bir zorunluluk yoktur. Sinyal / gürültü oranının 3:1 olduğu nokta en düşük dedeksiyon limiti olarak kabul edilebilir ya da  $LOD = 3 \sigma / S$  formülünden hesaplanabilir. ( $\sigma$ : İnterseptin standart sapması, S: Eğim).

**Tayin Sınırı (LOQ);** Her analitik prosedürün kantifikasyon limiti, uygun kesinlik ve doğruluk ile birlikte kantitatif olarak belirlenebilen numunedeki en düşük analit miktarını belirtir. Sinyal / gürültü oranının 10:1 olduğu nokta en düşük tayin limiti olarak kabul edilebilir ya da  $LOQ = 10 \sigma / S$  formülünden hesaplanabilir ( $\sigma$ : İnterseptin standart sapması, S: Eğim).



### 3.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması 2015-2016 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, Çözücüler ve Çözeltiler

##### 3.1.1.Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Metod geliştirme ve validasyon çalışmaları sırasında referans standart kullanılmıştır (Tablo 3-1).

**Tablo 3-1:Referans standart**

Standart	Temin Edildiği Firma	Kullanım Amacı
Karbazokrom	World Medicine	Analit
Trokserutin	World Medicine	Analit

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

**Tablo 3-2: Kimyasallar**

Kimyasallar	Marka
Asetonitril (HPLC saflığında)	Merck
Metanol (HPLC saflığında)	Merck
Asetik Asit (% 100 )	Merck
Dimetil Sülfoksit	Merck
Ultra saf su	Elga Purelab Option Q

#### 3.1.2.Çözeltiler

##### 3.1.2.1.Mobil Faz Çözeltisi

(MeOH:%5 HAc),(99,5:0,5-V/V) mobil faz olarak seçildi. Mobil faz süzme sisteminden süzülüp ultrasonik banyoda degaze edilerek sisteme vermeye hazır hale getirildi.

### 3.1.2.2. Trokserutin Çözeltileri

Ana Stok Çözeltisi: 5mg Trokserutin tartıldıktan sonra 10ml'lik balon jode suda çözülerek hacmine tamamlandı (500 µg/ml, TRO-DS1).

Ana stok çözeltisinden 100 µg/ml MeOH ile hacmine tamamlanarak ara stok hazırlandı (TRO-DS2). Daha sonra 1-20µg/mL aralığında standart çözeltiler metanol ile hazırlandı. Kalibrasyon standartlarının ve kalite kontrol örneklerinin hazırlanışı Tablo 3-3 ve 3-4'de verilmiştir.

**Tablo 3-3: Trokserutin için kalibrasyon standartlarının hazırlanışı**

Standart Adı	Analit	Konsantrasyon (µg/mL)	TRO-DS2'den Alınan Hacim (TRO-DS2:100 µg/mL)	Final Hacim
ST1	TROX	1,00	250 µL	25mL
ST2	TROX	2,00	100 µL	5mL
ST3	TROX	5,00	250 µL	5mL
ST4	TROX	10,00	500 µL	5mL
ST5	TROX	20,00	1000 µL	5mL

Düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlarda seçilen noktalarda kalite kontrol örnekleri hazırlanmıştır (Tablo 3-4).

**Tablo 3-4: Trokserutin kalite kontrol örneklerinin hazırlanışı**

Standart Adı	Analit	Konsantrasyon (µg/mL)	TRO-DS2'den Alınan Hacim (TRO-DS2:100 µg/mL)	Final Hacim
ST1	TROX	1,00	250 µL	25mL
ST2	TROX	3,00	150 µL	5mL
ST3	TROX	15,00	750 µL	5mL
ST4	TROX	20,00	1000 µL	5mL

### 3.1.2.3.Karbazokrom Çözeltileri

Ana Stok Çözeltisi; 5mg Karbazokrom tartıldıktan sonra 10ml'lik balon jojede dimetilsülfoksitte çözülerek hacmine tamamlandı (500 µg/ml, CARBO –DS1).

Ana stok çözeltisinden metanolle 5 µg/ml MeOH ile hacmine tamamlanarak ara stok hazırlandı (CARBO -DS2). Daha sonra 0,05-1,00 µg/mL aralığında standart çözeltiler metanol ile hazırlandı. Kalibrasyon standartlarının ve kalite kontrol örneklerinin hazırlanışı Tablo 3-5 ve 3-6'de verilmiştir.

**Tablo 3-5: Karbazokrom için kalibrasyon standartlarının hazırlanışı**

Standart Adı	Analit	Konsantrasyon (µg/mL)	CARBO-DS2'den Alınan Hacim (CARBO-DS2:5 µg/mL)	Final Hacim
ST1	CARBO	0,05	250µL	25mL
ST2	CARBO	0,10	100µL	5mL
ST3	CARBO	0,20	200µL	5mL
ST4	CARBO	0,50	500µL	5mL
ST5	CARBO	1,00	1000µL	5mL

Düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlarda seçilen noktalarda kalite kontrol örnekleri hazırlanmıştır (Tablo 3-6).

**Tablo 3-6: Karbazokromun kalite kontrol örneklerinin hazırlanışı**

Standart Adı	Analit	Konsantrasyon (µg/mL)	CARBO-DS2'den Alınan Hacim (CARBO -DS2:5 µg/mL)	Final Hacim
ST1	CARBO	0,05	250 µL	25mL
ST2	CARBO	0,30	300 µL	5mL
ST3	CARBO	0,70	700 µL	5mL
ST4	CARBO	1,00	1000 µL	5mL

### 3.2.Aletler ve Gereçler

Tablo 3-7' deki parçalardan oluşan Agilent Infinity 1260 Series HPLC-UV sistemi kullanıldı.

**Tablo 3-7: Ekipmanlar**

HPLC-UV Sistemi	Marka - Model
Pompa	Agilent Infinity 1260 Series
Oto örnekleyici	Agilent Infinity 1260 Series
Dedektör	Agilent Infinity 1260 Series
Kolon Fırını	Agilent Infinity 1260 Series
Analitik Kolon	Phenomenex-Kinetex Core Shell Technology
Yazılım	Chem32

Validasyon çalışması sırasında kullanılan destek ekipmanlar Tablo 3-8' de belirtilmiştir.

**Tablo 3-8: Destek ekipmanlar**

Marka - Model	Destek Ekipmanlar
Spektrofotometre	Shimadzu UV-160A
Ultra saf su cihazı	Elga Purelab Option Q
Ultrasonik banyo	Elma Ultrasonics LC 30 H
pH metre	Mettler Toledo
Otomatik pipetler	Eppendorf 10-100 µL ve 100-1000µL
Pipet Uçları	Eppendorf 100 µL ve 1000 µL
Vorteks	Tetra
Analitik Terazî	Ohaus Explorer

Validasyon çalışması sırasında kullanılan cam malzemeler (Tablo 3-9)' da belirtilmiştir

**Tablo 3-9 : Cam Malzemeler**

Cam Malzemeler	Marka
Balon joje 5 mL	Isolab
Balon joje 10 mL	Isolab
Balon joje 25 mL	Isolab
Balon joje 200 mL	Isolab
Oto örnekleyici Vialleri	Agilent

### 3.3. Analizin Gerçekleştirilmesi

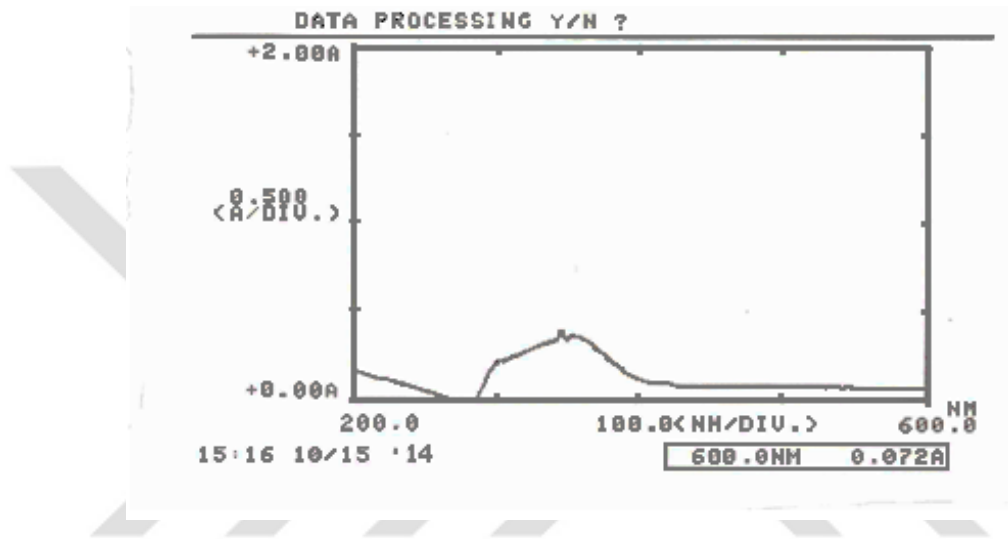
- a. Agilent 1260 serisi HPLC sisteminin bilgisayarı güç düğmesine basılarak açılır.
- b. HPLC kısımları sırasıyla açılır.
- c. UV dedektörünün güç düğmesine basılarak açılır ve 1-2 dakika bağlantı sağlanana kadar beklenir.
- d. Ardından bilgisayarda Chem32 ikonuna basılarak Chem32 yazılımı açılır.
- e. %5'lik Asetik asit çözeltisi sistemin A hattına yerleştirilir. B hattına ise metanol yerleştirilir.
- f. Kullanılan hatlara purge işlemi uygulanır.
- g. Purge işlemi bittikten sonra , bir müddet kolonun saklı kaldığı çözelti ile (70;30),(ACN;Saf Su) oran purgten geçirilerek tubinglerin bu oranla şartlanması beklenir. Ardından akış 0,2 mL/dak olarak ayarlanır ve purge vanası kapatılır.
- h. Akış 0,5 ml/dk'ya artırılır ve, metot parametrelerine uygun olan (MeOH:%5 HAc),(99,5:0,5-V/V) mobil faz oranı kolondan geçirilerek kolon yaklaşık 0,5 ml/dk akışta yarım saat şartlandırılır.
- i. Kolonun şartlanmasıyla birlikte final akış 0,25 mL/dk.'ya düşürülür.
- j. Analiz süresi 7 dakikadır.
- k. Kolon sıcaklığı 25°C' dir.
- l. Enjeksiyon hacmi 5 µL'dir.
- m. Dedektör 350 nm'dir.
- n. Hazırlanan metot seçilerek analiz başlatılır.



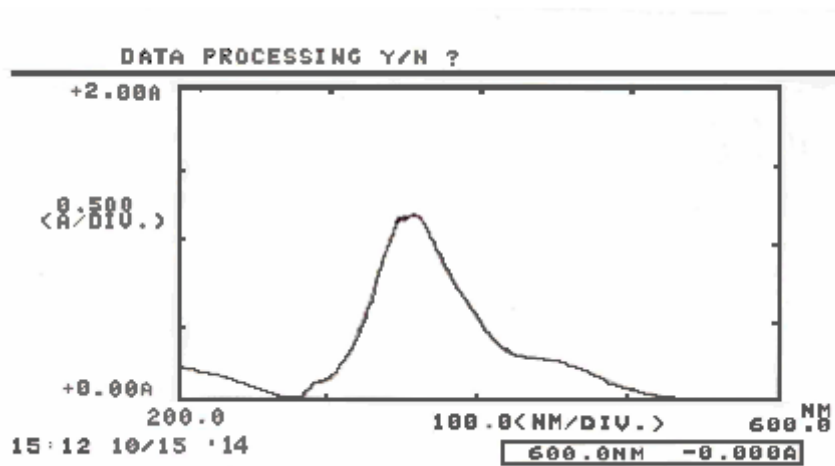
### 3.4.Trokserutin ve Karbazokromun Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC-UV) ile Yöntem Geliştirme

#### 3.4.1.Dedektör Dalga Boyu Seçimi

Trokserutin'in 348 nm 'lerde max. absorban yaptığı; karbazokromun ise 355 nm'de max. absorban yaptığı spektrofotometri yöntemiyle bulunmuştur. Metotta çalışılan dalga boyu ise bu iki maddenin max. absorbanları arasındaki orta nokta olan 350 nm olarak alınmıştır.



Şekil 3-1: Trokserutin'in 20 µg/mL konsantrasyonda metanolde 200-600 nm aralığında alınmış UV spektrumu



Şekil 3-2: Karbazokrom'un 20 µg/mL konsantrasyonda metanolde 200-400 nm aralığında alınmış UV Spektrumu

### 3.4.2.Mobil Faz Seçimi

En uygun mobil faz sistemini bulmak için farklı türlerde, kombinasyonlarda ve pH'larda mobil faz sistemleri denenmiştir.

25mM farklı pH'larda(3,5,6,8) tampon sistemleriyle ACN, MeOH ve/veya saf su kombinasyonları, farklı akış hızlarında hem gradient hem izokratik elüsyon tiplerinde denenmiştir. Piklerin alıkonmaları çok düşük ve aynı anda elue olduğu gözlemlenmiştir.

Tampon sistemlerinde başta  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  olmak üzere  $\text{KH}_2\text{PO}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  ve  $\text{CH}_3\text{COONa}$  da metod geliştirme çalışmalarında kullanılmıştır.

Tampon yerine asetik asit veya formik asit çözeltileri mobil faz olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca rezolüsyonu arttırmak için 5mM tetrametil amonyum hidroksil iyon çifti ajanı kullanımı denenmiştir.

En iyi oranın  $\%10 \geq \text{HAc}$  ( $\%1$ 'lik) ve ACN'li mobil faz oranı olduğu gözlemlenmiştir. Bileşiklerin oldukça polar oluşları ve rezolüsyonlarının oldukça düşük olması nedeniyle denemelere polar kolonda uygun mobil faz karışımları ile devam ettirilmiştir. Mobil fazdaki ACN olan organik bileşim yerine; ACN'nin fenil gruplarında pi-pi etkileşimini bozduğu için MeOH kullanılmaya başlanmış ve daha iyi bir ayrılma gözlemlenmiştir.

Denemeler MeOH:HAc karışımları üzerine yoğunlaştırarak ilerlerken farklı yüzdelerde  $\%1$ ,  $\%2$ ,  $\%5$  ve  $\%10$ 'luk asetik asit çözeltileri denenmiştir. En iyisinin  $\%5$ 'lik asetik asit çözeltisi olduğuna karar verilip en uygun mobil faz oranı (MeOH: $\%5$  HAc), (99,5:0,5-V/V) olarak kesinleştirilmiştir.

### 3.4.3.Kolon Seçimi

2,7  $\mu\text{m}$  partikül çaplı 30x100 mm boyutunda C18; 5 $\mu\text{m}$  partikül çaplı 4,6x250mm boyutunda C18; 2,6  $\mu\text{m}$  partikül çaplı 4,6x150mm boyutunda core-shell Pentaflorafenil Propil kolonları denenmiştir. En uygun kolon olarak core-shell polar kolon seçilmiştir.

### 3.4.4.Kalibrasyon Eğrisinin Seçimi

Trokserutin ve karbazokromun aynı aynda miktar tayininde kullanılmak üzere; trokserutin için 1,00-10,00  $\mu\text{g/mL}$  ve karbazokrom için 0,05-1,00  $\mu\text{g/mL}$  kalibrasyon aralıkları uygun bulunup hazırlanmıştır.

### 3.5 Sistem Uygunluk Testi

Cihazın performansının istikrarlı olup olmadığını anlamak için altı analit enjeksiyonun yüzde bağıl standart sapması (%RSD) hesaplanarak enjeksiyon tekrarlanabilirliği hesaplandı.

Kromatografik koşulların uygunluğuna bakıldı. Bunun için piklerin rezolüsyonu, kapasite faktörü, seçicilik faktörü, kuyruklanma ve teorik plaka sayısı bölüm 2.3'de verilen formüllerle hesaplandı. Sonuçlar Şekil 2-1'deki kabul kriterleriyle karşılaştırıldı.

### 3.6.Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

İlaç uygulamaları için Uluslararası Harmonizasyon Konferansı (ICH, International Conference Harmonization) Q2 kılavuza göre validasyon yapıldı [68].

#### 3.6.1.Spesifiklik ve Seçicilik

Yöntemin seçiciliğinin tayini amacıyla, mobil faz enjeksiyonu yapıldı. Ayrıca tabletlerle ve standartlarla yapılan enjeksiyonlar karşılaştırılıp girişimin olup olmadığına bakıldı. Plasebo ile denemeler yapıp pik saflığına bakıldı.

#### 3.6.2.Doğrusallık

Kalibrasyon eğrisini oluşturmak için beş konsantrasyon seçildi. Trokserutin için stoğundan 1,00 (S.T.-1) ; 2,00 (S.T.-2) ; 5,00 (S.T.-3) ; 10,00 (S.T.-4) ; 20,00 (S.T.-5) µg/mL konsantrasyonlarda ; karbazokrom için 0,05 (S.T.-1) ; 0,10 (S.T.-2) ; 0,20 (S.T.-3) ; 0,50 (S.T.-4) ;1,00 (S.T.-5) µg/mL konsantrasyonlarda karabzokrom ihtiva eden karışım çözeltileri hazırlandı, analize verildi 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. Korrelasyon katsayısının yanı sıra eğrinin denkleminin ve eğimi de bulundu. (S.T.: Standart)

### 3.6.3.Doğruluk

Analitin en düşük ve en yüksek konsantrasyonları içeren dört konsantrasyon seçilmiştir. Trokserutin için sırasıyla 1,00 (KK-1); 3,00 (KK-2); 15,00 (KK-3); 20,00 (KK-4) µg/mL konsantrasyonlarda; karbazokrom için 0,05 (KK-1); 0,30 (KK-2); 0,70 (KK-3); 1,00 (KK-4) µg/mL konsantrasyonlarda kalite kontrol numuneleri hazırlandı ve analize verildi. Elde edilen analiz sonuçlarının yüzde ortalaması alınarak doğrulukları hesaplandı ve, hesaplamaların LOQ için %± 20, diğer noktalar için %±15 kabul limitleri aralığında seri kabul edildi. ( K.K.: Kalite Kontrol Örnekleri)

### 3.6.4.Kesinlik

Analitin en düşük ve en yüksek konsantrasyonları içeren dört konsantrasyon seçilmiştir Trokserutin için sırasıyla 1,00 (KK-1); 3,00 (KK-2); 15,00 (KK-3); 20,00 (KK-4) µg/mL konsantrasyonlarda; karbazokrom için 0,05 (KK-1); 0,30 (KK-2); 0,70 (KK-3); 1,00 (KK-4) µg/mL konsantrasyonlarda kalite kontrol numuneleri hazırlandı ve analize verildi. 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. ( K.K.: Kalite Kontrol Örnekleri)

### 3.6.5.Tehhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)

Karbazokrom-trokserutin karışım numuleriye LOQ belirleme çalışmaları yapıldı. En düşük konsantrasyon LOD formülü ile hesaplandı.

### 3.6.6.Validasyon Serisinin Hazırlanması

Validasyon serisi; boş, kalibrasyon eğrisi ve kalite kontrol örnekleri olarak torkserutin için bölüm 3.1.2.2. 'de anlatıldığı gibi karbazokrom için de bölüm 3.1.2.3.'de anlatıldığı gibi hazırlandı. Boş numune olarak mobil faz çözeltisi konuldu. Hazırlanan validasyon serisi Tablo 3-12'deki gibidir.

( S.T.: Standart , K.K.: Kalite Kontrol, İlk numara: konsatrasyon seviyesi, ikinci numara hazırlanma sayısı. Örn: K.K.3-2 : İkinci kez hazırlanan 3 no'lu konsatrasyonlu kalite kontrol numunesi)

**Tablo 3-10: Validasyon Serisi**

Numune	Analiz Sırası	Numune	Analiz Sırası
BOŞ	1	K.K. 3-1	22
S.T. 1-1	2	K.K. 3-2	23
S.T. 2-1	3	K.K. 3-3	24
S.T. 3-1	4	K.K. 3-4	25
S.T. 4-1	5	K.K. 3-5	26
S.T. 5-1	6	K.K. 3-6	27
BOŞ	7	BOŞ	28
K.K. 1-1	8	K.K. 4-1	29
K.K. 1-2	9	K.K. 4-2	30
K.K. 1-3	10	K.K. 4-3	31
K.K. 1-4	11	K.K. 4-4	32
K.K. 1-5	12	K.K. 4-5	33
K.K. 1-6	13	K.K. 4-6	34
BOŞ	14	BOŞ	35
K.K. 2-1	15	S.T. 1-2	36
K.K. 2-2	16	S.T. 2-2	37
K.K. 2-3	17	S.T. 3-2	38
K.K. 2-4	18	S.T. 4-2	39
K.K. 2-5	19	S.T. 5-2	40
K.K. 2-6	20		
BOŞ	21		

### **3.7. Tabletlerde Trokserutin ve Karbazokrom Analizi**

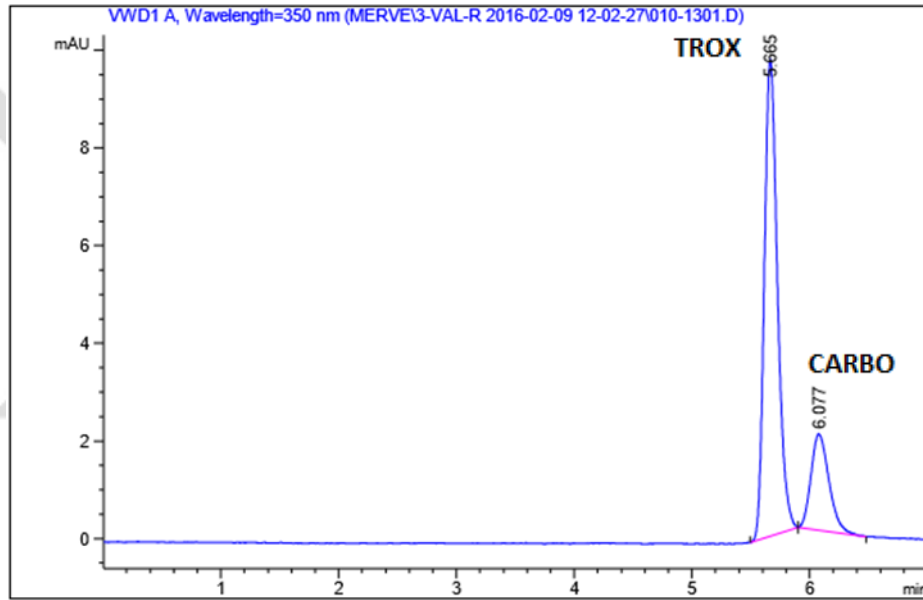
#### **3.7.1. Tabletlerin ve Tablet Çözeltilerinin Hazırlanması**

300 mg trokserutin ve 3 mg karbazokrom içeren 10 adet tablet ayrı ayrı tartılarak ortalama tablet ağırlığı hesaplandı. Havanda ezilerek, homojen bir karışım olması sağlandı. Tablet ağırlığının dörtte biri kadar on ayrı tartım bu homojen karışımdan alınarak tartıldı. Bu tartımlar ayrı ayrı 50 mL' lik balon jöjelerde dimetilsülfoksit ile çözülerek hacmine tamamlandı. Tabletler toz edildikten sonra süzme işlemi uygulandı ve kalıntı kalmadığı görüldü. Her biri 5'er dakika vortekslendi. Böylece trokserutin için 1500 µg/ml, karbazokrom için 15 µg/ml tablet stok çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan çözeltiden 500µL çekilip yine 50ml'lik balon jöjede MeOH ile tamamlandı. Son hazırlanan çözeltinin konsantrasyonu trokserutin için 15 µg/ml , karbazokrom için 0,15 µg/ml'dir. Daha sonra 0,22 mikronluk filtreden geçirilerek viallenip analize verildi.

## 4.BULGULAR

### 4.1.Kromatografik Koşullar

2,6 µm partikül çaplı 4,6x150mm boyutunda core-shell Pentaflorafenil Propil polar kolonda, mobil faz olarak (MeOH: %5'lik HAc),(99,5:0,5-V/V) olarak, 25°C'de; 0,25 mL/dak akış hızında elde edilmektedir. Çalışma UV dedeksiyonla, 350 nm dalgaboyu kullanılarak yapılmıştır. Bu kromatografik sistemde alıkonma zamanları trokserutin için 5,6 . dakika ve karbazokrom için 6,0 . dakikadadır. Örnek kromatogram Şekil 4-1'de verilmiştir.



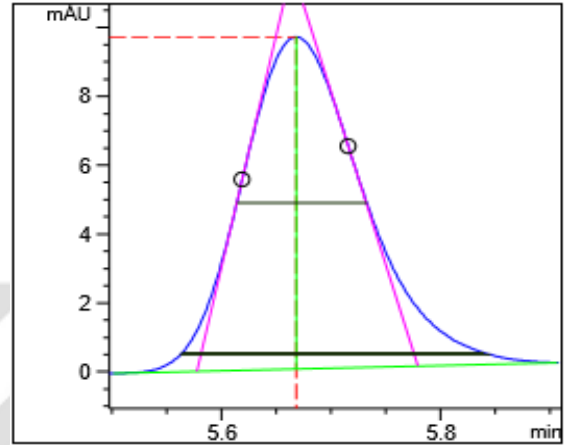
Şekil 4-1: 3 µg/mL trokserutin-0,3 µg/mL karbazokrom karışımına ait örnek kromatogram

## 4.2.Sistem Uygunluk Testi

Geliştirilen analiz metodunun yeterliliğini ölçmek için validasyon çalışmalarına geçmeden önce yapılan sistem uygunluk testinde trokserutin için Tablo 4-1'deki gibi sonuçlar elde edildi.

**Tablo 4-1 :Trokserutin sistem uygunluk Parametreleri**

Miktar	3 $\mu$ g/ml
Dalga Boyu	350 nm
Alıkonma zamanı	5.66806
Yükseklik	9.64728
Alan	74.77316
Pik Genişliği	0.1192
Kuyruklanma	1.32400
Simetri	0.77117
Teorik Tabaka sayısı	10974
RSD	0,4235923
Ayrırcılık	2.9213

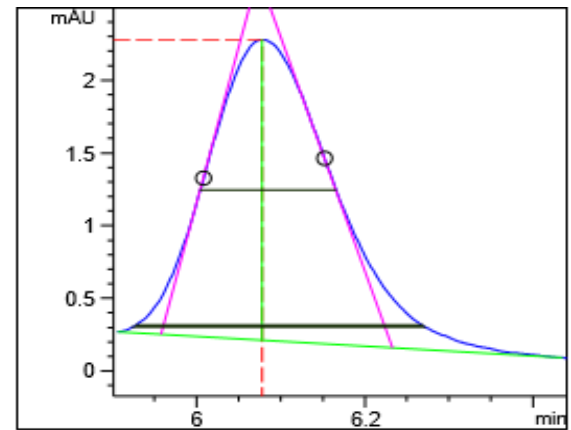


**Şekil 4-2:Trokserutin Piki**

Yapılan sistem uygunluk testinde karbazokrom için Tablo 4-2 gibi sonuçlar elde edildi.

**Tablo 4-2 :Karbazokrom sistem uygunluk Parametreler**

Miktar	0,3 $\mu$ g/ml
Dalga Boyu	350 nm
Alıkonma zamanı	6.07837
Yükseklik	2.06819
Alan	21.75435
Pik Genişliği	0.1617
Kuyruklanma	1.13889
Simetri	0.73330
Teorik Tabaka sayısı	6902
RSD	0,1890909
Ayrırcılık	2.9213



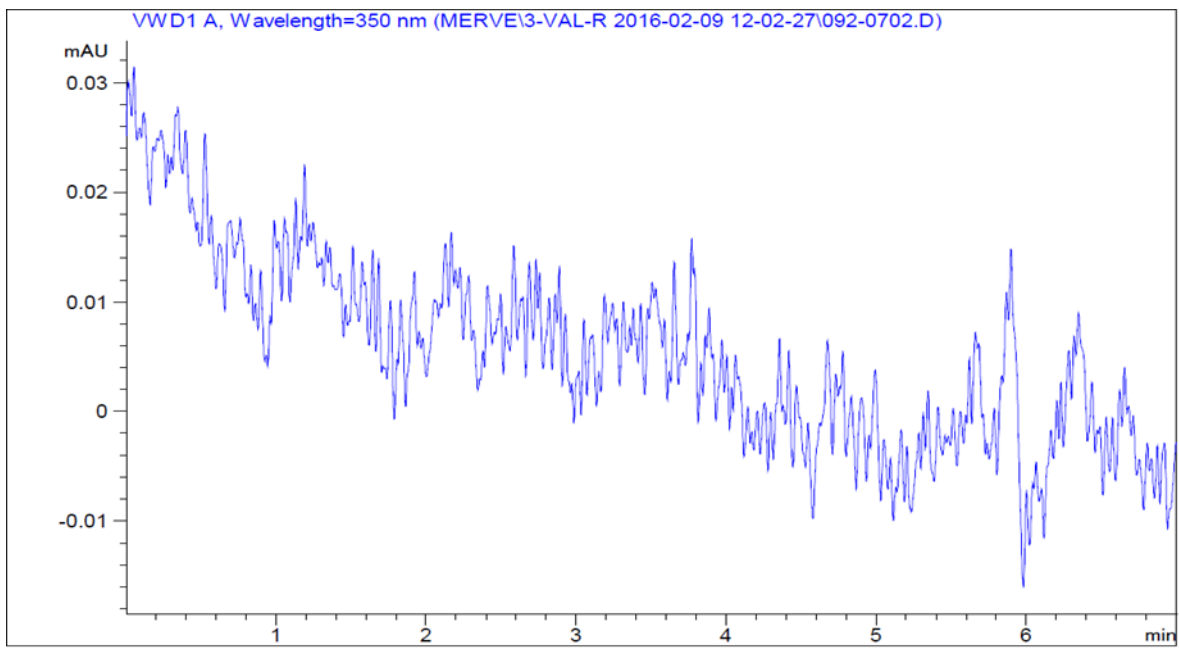
**Şekil 4-3:Karbazokrom Piki**



### 4.3.Yöntem Validasyonu

#### 4.3.1. Seçicilik

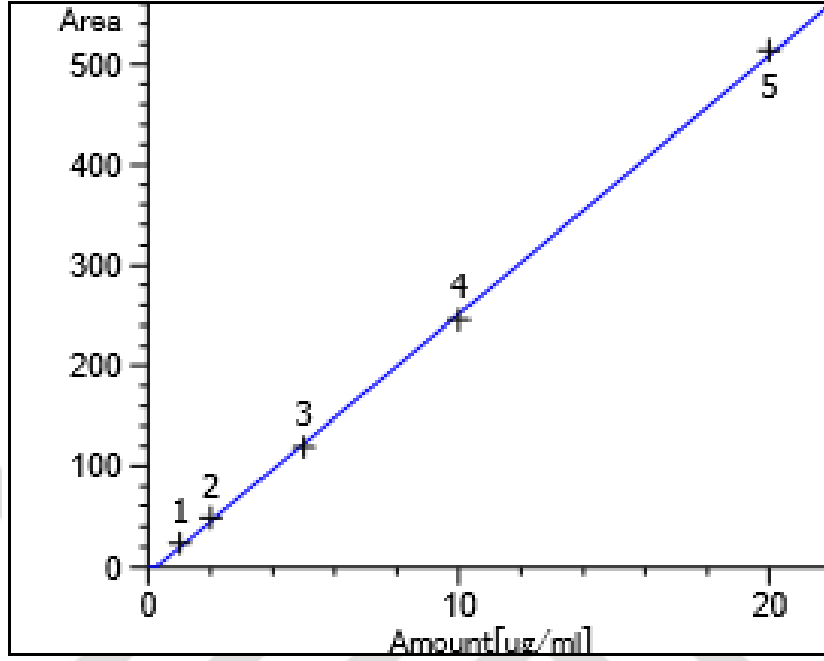
Yöntemin seçiciliği için; mobil faz enjeksiyonuna ait kromatogram Şekil 4-4'deki gibidir. Şekil 4-8 tablet analizine ait kromatogramdan da görüldüğü üzere analitin alıkonma zamanını ve alanını etkileyen herhangi bir girişim tespit edilmemiştir. Plasebo ile denemeler yapıp pik saflığına bakılmış ve girişim görülmemiştir.



Şekil 4-4: Mobil faz enjeksiyonuna ait bir kromatogram

#### 4.3.2.Doğrusallık

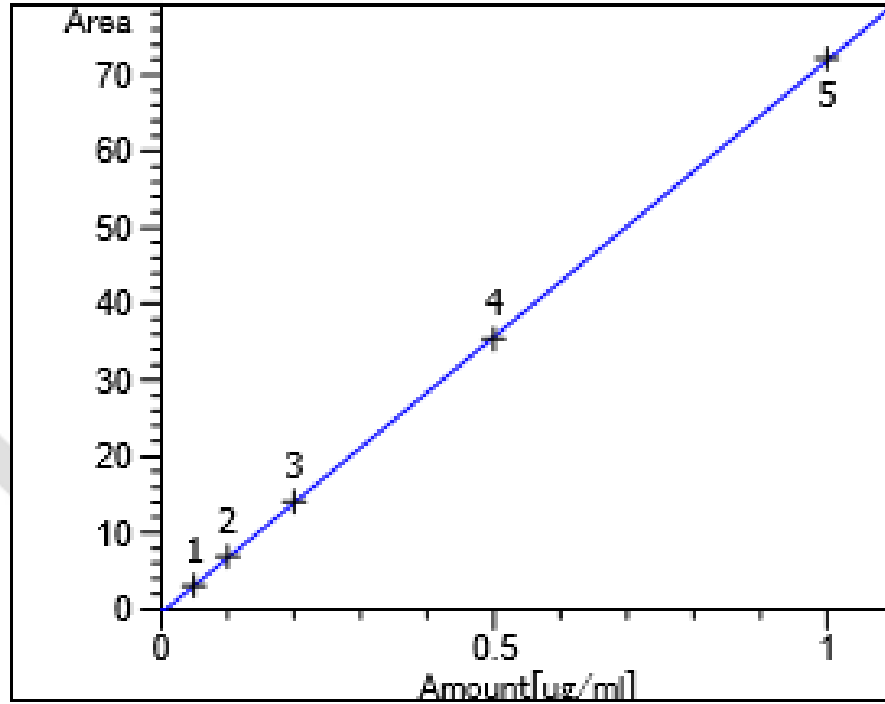
Hazırlanan kalibrasyon standartlarının analizi neticesinde elde edilen pik alanlarıyla konsantrasyon verileri grafiğe geçildi ve kalibrasyon eğrisi çizildi. Kalibrasyon eğrileri korelasyon katsayıları trokserutin için 0.9999 mertebesinde kabul edilebilir sınırlardadır. Kalibrasyon eğrileri trokserutin için Şekil 4-5'de ve karbazokrom için Şekil 4-6'de verildi. Doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları trokserutin için Tablo 4-3' de, karbazokrom için Tablo 4-4' de verildi.



**Şekil 4-5: Trokserutin'in 1,00-20,00 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi**

**Tablo 4-3: Trokserutin'in validasyon serlerinden elde edilen doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları**

Validasyon Seri No	Korelasyon Katsayısı	Doğru Denklemi
Val-1	0,99999	$y = 23,37416.x - 1,24667$
Val-2	0,99973	$y = 25,38252.x - 5,89231$
Val-3	0,99971	$y = 25,80154.x - 6,00975$



**Şekil 4-6: Karbazokromun 0,05-1,00 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi**

**Tablo 4-4: Karbazokromun validasyon serlerinden elde edilen doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları**

Validasyon Seri no	Korelasyon Katsayısı	Doğru Denklemi
Val-1	0,99981	$y = 71,03424.x + 0,289801$
Val-2	0,99998	$y = 67,83588.x - 0,457045$
Val-3	0,99997	$y = 72,58107.x - 0,520126$

### 4.3.3.Doğruluk ve Kesinlik

Düşük , orta ve yüksek konsantrasyonlarda seçilen kalite kontrol örnekleri gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri hesaplandı. Ayrıca kalibrasyon standartlarının da günler arası kesinlik ve doğruluğu hesaplandı. Yöntem ile elde edilen sonuçların gerçek değere yakınlığı kontrol edildi. Yöntemin kesinliği; herhangi bir değerlerin tekrarlanabilirliği veya bireysel test sonuçlarının belirlenen koşullar altında aynı örneklerin analiz sonuçlarının birbirine yakınlığı kontrol edildi. Trokserutin için yapılan hesaplamalar Tablo 4-5, Tablo 4-7, Tablo 4-9, Tablo 4-11, Tablo 4-13' de ve karbazokrom için yapılan hesaplamalar Tablo 4-6, Tablo 4-8, Tablo 4-10, Tablo 4-12 ve Tablo 4-14' de verildi. Bulunan değerlere göre yöntemin doğruluğu ve kesinliği uygun bulundu. Bu değerlerle yöntemin tekrarlanabilir olduğu da görülmektedir.

**Tablo 4-5: Bir Nolu Validasyon Serisi Kalite Kontrol Örneklerinde Trokserutinün Gün İçi Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları**

Numune	Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama	%Ort	Sapma(SD)	%CV	n
KK1	1,00	1,04	104,22	0,0256	2,46	6
KK2	3,00	3,00	100,13	0,05453	1,51	6
KK3	15,00	14,70	97,98	0,3405	2,32	6
KK4	20,00	20,14	100,68	0,3160	1,57	6

**Tablo 4-6: Bir Nolu Validasyon Serisi Kalite Kontrol Örneklerinde Karbazokromun Gün İçi Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları**

Numune	Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama	%Ort	Sapma(SD)	%CV	n
KK1	0,05	0,04	82,54	0,0009	2,18	6
KK2	0,30	0,32	108,21	0,0055	1,70	6
KK3	0,70	0,73	103,62	0,0036	0,49	6
KK4	1,00	1,06	105,50	0,0047	0,44	6

**Tablo 4-7: İki Nolu Validasyon Serisi Kalite Kontrol Örneklerinde Trokserutinün Gün İçi Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları**

Numune	Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama	%Ort	Sapma(SD)	%CV	n
KK1	1,00	1,16	116,38	0,0131	1,13	6
KK2	3,00	3,16	105,19	0,0193	0,61	6
KK3	15,00	15,06	100,38	0,0521	0,35	4
KK4	20,00	20,06	100,28	0,4039	2,01	6

**Tablo 4-8: İki Nolu Validasyon Serisi Kalite Kontrol Örneklerinde Karbazokromun Gün İçi Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları**

Numune	Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama	%Ort	Sapma(SD)	%CV	n
KK1	0,05	0,05	103,60	0,0008	1,64	4
KK2	0,30	0,34	112,42	0,0080	2,38	6
KK3	0,70	0,77	110,50	0,0057	0,74	6
KK4	1,00	1,08	107,88	0,0030	0,27	6

**Tablo 4-9: Üç Nolu Validasyon Serisi Kalite Kontrol Örneklerinde Trokserutinün Gün İçi Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları**

Numune	Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama	%Ort	Sapma(SD)	%CV	n
KK1	1,00	1,17	117,16	0,0122	1,04	6
KK2	3,00	3,15	104,93	0,0133	0,42	6
KK3	15,00	14,78	98,55	0,0764	0,52	4
KK4	20,00	19,50	97,48	0,3873	1,99	6

**Tablo 4-10: Üç Nolu Validasyon Serisi Kalite Kontrol Örneklerinde Karbazokromun Gün İçi Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları**

Numune	Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama	%Ort	Sapma(SD)	%CV	n
KK1	0,05	0,05	103,40	0,0013	2,50	5
KK2	0,30	0,30	99,80	0,0057	0,19	6
KK3	0,70	0,67	95,74	0,0103	1,53	6
KK4	1,00	0,92	91,57	0,0071	0,78	6

**Tablo 4-11: Validasyon Serilerinde Kalite Kontrol Örneklerinde Trokserutinın Günler Arası Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları**

Numune	Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama	%Ort	Sapma(SD)	%CV	n
KK1	1,00	1,13	112,58	0,0633	5,62	18
KK2	3,00	3,10	103,42	0,0769	2,48	18
KK3	15,00	14,82	98,83	0,2668	1,80	14
KK4	20,00	19,90	99,48	0,4555	2,29	18

**Tablo 4-12: Validasyon Serilerinde Kalite Kontrol Örneklerinde Karbazokromun Günler Arası Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları**

Numune	Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama	%Ort	Sapma(SD)	%CV	n
KK1	0,05	0,05	97,94	0,0054	11,3755	15
KK2	0,30	0,32	106,81	0,0173	5,4035	18
KK3	0,70	0,72	103,29	0,0439	6,0784	18
KK4	1,00	1,02	101,65	0,0742	7,4119	18

**Tablo 4-13: Trokserutin kalibrasyon standartlarının günler arası doğruluk ve kesinlik hesaplamaları**

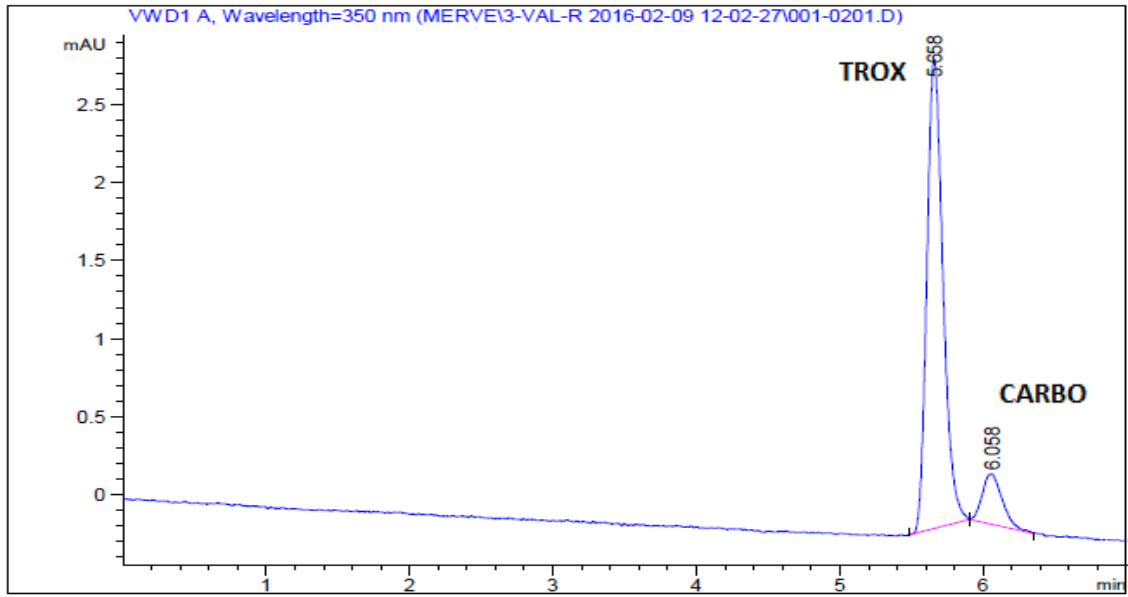
Standart Adı	Analit	Konsantrasyon ( $\mu\text{g/mL}$ )	Ortalama	%Ort	Sapma(SD)	%CV	n
ST1	TROX	1,00	1,11	111,10	0,0668	6,02	12
ST2	TROX	2,00	2,10	105,04	0,0595	2,84	12
ST3	TROX	5,00	4,95	98,94	0,0677	1,37	12
ST4	TROX	10,00	9,88	98,77	0,1167	1,18	12
ST5	TROX	20,00	20,20	101,01	0,1904	0,94	12

**Tablo 4-14: Karbazokrom kalibrasyon standartlarının günler arası doğruluk ve kesinlik hesaplamaları**

Standart Adı	Analit	Konsantrasyon ( $\mu\text{g/mL}$ )	Ortalama	%Ort	Sapma(SD)	%CV	n
ST1	CARBO	0,05	0,05	93,81	0,0034	7,30	12
ST2	CARBO	0,10	0,10	100,00	0,0049	4,85	12
ST3	CARBO	0,20	0,21	103,68	0,0126	6,09	12
ST4	CARBO	0,50	0,51	101,39	0,0262	5,18	12
ST5	CARBO	1,00	1,00	100,80	0,0527	5,23	12

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

Yapılan LOQ belirleme çalışmaları neticesinde bir LOQ değeri belirlendi. Trokserutin için 1 µg/ml, karbazokrom için 0,05 µg/ml şeklinde belirlenen LOQ noktası kalibrasyon eğrisinin en düşük noktası olarak kullandı. LOD değeri kalibrasyon eğrisi yardımıyla formülünden hesaplandı ve trokserutin için 0,65 µg/ml, karbazokrom için 0,01 µg/ml şeklinde bulundu. LOQ noktasına ait kromatogram Şekil 4-7’de verildi.

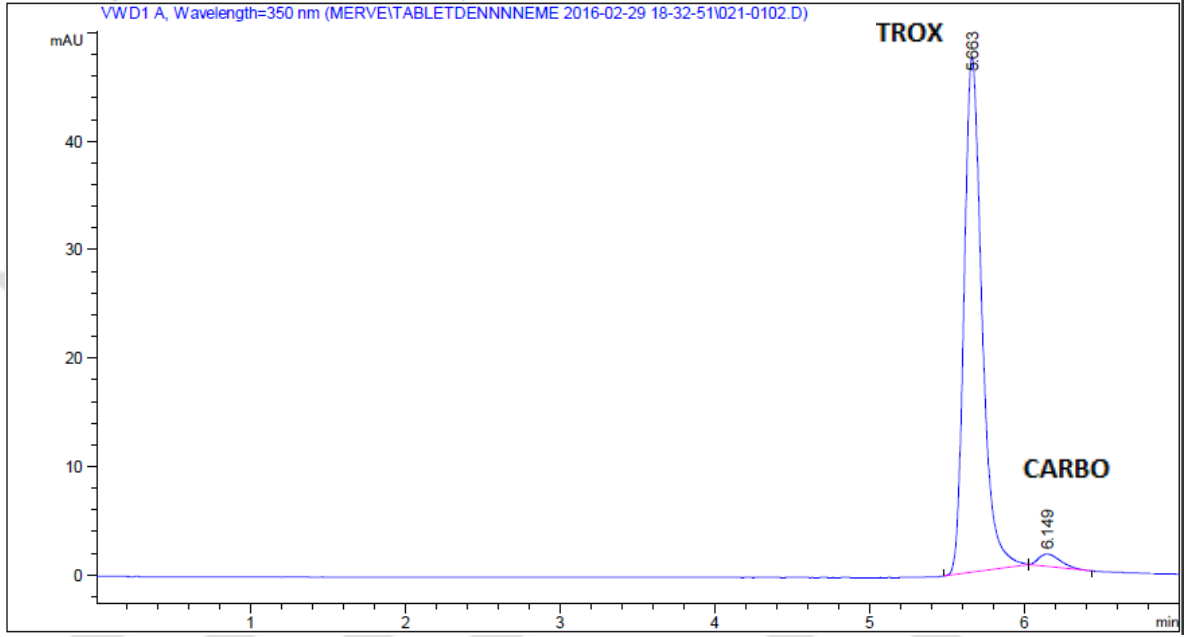


Şekil 4-7: 1,00 µg/mL trokserutin ve 0,05 µg/mL karbazokrom karışımına ait örnek kromatogram



#### 4.4. Tabletlerde Trokserutin ve Karbazokrom Analizi

Trokserutinün tabletten geri kazanımı 98,86; ve karbazokromun tabletten geri kazanımı %105,81 bulundu. Şekil 4-8' da tabletlerdeki analiz sonuçlarına ait bir kromatogram gösterilmektedir.



Şekil 4-8:Tabletteki analizlere ait bir kromatogram

## 5.TARTIŞMA

Toplumun çok ciddi bir kesminde yaygın olarak görülen hemoroidin altında yatan sebeplerin, lokal damar kapileritisini geliştiren venötik ajanlarla tedavi edilebileceği saptanmıştır. Venötik ajan olarak bir flavonoid türü olan trokserutin ve adrenalinin oksidasyon ürünü olan karbazokromun optimum kombinasyonu kullanılmıştır. Yürütülen klinik çalışmalarda olumlu sonuçlar elde edilmiştir.

Trokserutin, kanın dokulara aşırı geçişini engelleyerek geçirgenliğini azaltır ve vasküler direnci artırır. Karbazokrom ise, küçük damarların kanama bölgelerinde damar daraltıcı olarak lokal etki yapar ve kanama süresini azaltır. Ayrıca kapiler geçirgenliğe, damarların kasılma gücüne ve dayanıklılığına olumlu olarak etki eder. Kısacası trokserutin ve karbazokromun optimal kombinasyonu yüksek farmakolojik etki sağlar ve böylece, damarların kapiler zayıflığından ileri gelebilen damar hastalıkları ve hemoraji sendromlarının tedavisini mümkün kılar.

Hemoroid yaşam kalitesini düşüren ağrılı ve yaygın bir hastalık çeşididir ve bu yüzden, tedavisi için önerilen trokserutin ve karbazokrom kombinasyonun farmasötik preparatlarda tayini kalite kontrol açısından ilaç sanayinde önem arz etmektedir.

Bu ihtiyaca cevap vermek için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemiyle F5 Core-Shell bir kolon desteğiyle tabletlerden analizi için bir yöntem geliştirilerek başarılı bir şekilde valide edilmiştir.

Trokserutin ve karbazokrom moleküllerinde  $\pi \rightarrow \pi^*$ ,  $n \rightarrow \pi^*$  geçişini kolaylaştıracak konjuge  $\pi$  bağlarının olması ve elektron verici grupların bulunması nedeniyle doğal ve kuvvetli UV absorpsiyon özelliğe sahiptir (Şekil 2-1, Şekil 2-2). Bu özelliklerinden dolayı dedektör olarak absorpsiyon dedektörü seçilmiştir. Trokserutin maksimum absorpsiyon dalga boyu 348 nm (Şekil 3-1), karbazokromun maksimum absorpsiyon dalga boyu 355 nm (Şekil 3-2) olarak bulunmuştur. Ortak dalga boyu olarak 350 nm kullanılmıştır.

Bu iki ilaç etken maddesinin polar yapıları, alıkonmalarının düşük olması nedeniyle ayrılmaları için etkin bir yöntem geliştirilmesi gerekiyordu. Bu nedenle polar maddelerin ayrımının daha iyi olduğu 2,6  $\mu\text{m}$  partikül çaplı 4,6x150mm boyutunda core-shell Pentaflorafenil Propil polar kolon kullanıldı ve daha iyi bir kromatografik koşul elde edildi. Mobil fazdaki organik faz ACN yerine; ACN'nin, kolonun fenil gruplarıyla maddenin (Şekil 2-5, Şekil 2-1, Şekil 2-2)  $\pi$ - $\pi$  etkileşimini bozduğu için MeOH kullanılmaya başlandı ve en iyi ayrılmanın (MeOH;%5'lik HAc),(99,5:0,5(V/V)) mobil faz sistemiyle olduğu görüldü.

Geliştirilen analiz metoduna sistem uygunluk testi yapıldı. Test sonucunda trokserutin için Tablo 4-1, karbazokrom için ise Tablo 4-2'de verilen değerler elde edildi. Tablo 2.1'de kabul limitleri verilmiştir. Buna göre en önemli kromatografik parametre olan ayırıcılık trokserutin ve karbazokrom için 2,9 bulunup 2,0'ın üzerindedir. Bunun dışında kuyruklanma faktörü ve teorik plaka sayısı da uygun bulunmuştur.

Kalibrasyon eğrisi trokserutin için; 1,00-20,00  $\mu\text{g/mL}$  ve, karbazokrom için 0,05-1,00  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonlarında seçildi. LOD ve LOQ değerleri trokserutin için; 0,65

$\mu\text{g/mL}$  ve  $1,00 \mu\text{g/mL}$ , karbazokrom için ise;  $0,01 \mu\text{g/mL}$  ve  $0,05 \mu\text{g/mL}$  olarak hesaplandı. Validasyon serilerinden elde edilen kalibrasyon eğrilerinin korelasyon katsayıları  $0,9999$  mertebesinde ve analitik açıdan kabul edilebilir değerlerde olduğu görüldü.

Kalibrasyon eğrilerinin en yüksek ve en düşük değeri ile birlikte iki ara değerden oluşan kalite kontrol örnekleriyle doğruluk ve kesinlik çalışmaları yapıldı. Sonuçta elde edilen değerlerin en küçük için  $\% \pm 20$ , diğer noktalar için  $\% \pm 15$  limitleri dışına çıkmadığı kesinliği ve doğruluğu yüksek olduğu tespit edildi.

Yapılan validasyon çalışmaları neticesinde yöntemin tablet analizleri için uygun olduğu sonucuna varıldı ve tableten geri kazanım çalışmaları yapıldı. Trokserutin tableten geri kazanımı  $\% 98,86$  ; ve karbazokromun tableten geri kazanımı ;  $\% 105,81$  olarak bulundu.

Yapılan litaretür araştırmalarında karbazokrom ve trokserutin kromatografik analizlerine rastlanılmamıştır. Bunun yanı sıra tek tek analizleri trokserutin için spektrofotometrik (6,23-26), HPLC (14-15,17-21); karbazokrom için ise kromatografik (38-46), spektroskopik (47-51) yöntemleriyle olduğu görülmüştür.

Khatab ve ark., trokserutin ve karbazokromu enjeksiyon preparatlardan birlikte tayinini türev spektrofotometresi yöntemiyle gerçekleştirmişlerdir. Trokserutin için kalibrasyon eğrisi aralığını  $5,00-50,00 \mu\text{g/ml}$  olarak bulurken, karbazokrom için ise  $0,50-10,00 \mu\text{g/ml}$  olarak bulmuşlardır (6).

Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen yöntemde trokserutin için  $1,00-20,00 \mu\text{g/mL}$ , karbazokrom için  $0,05-1,00 \mu\text{g/mL}$  aralığında analiz yapılabilir. Bu çalışmada trokserutin ve karbazokrom için hassas, seçici ve özgün bir kromatografik yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntem, kombine preparatif için kalite kontrolde kullanılabilir.

## 6.KAYNAKLAR

- [1] Lorenzo-Rivero, S. (2009). Hemorrhoids: diagnosis and current management. *The American Journal of Surgery* . 75(8), s. 635–42.
- [2] Basile, M., Gidaro, S. , Pacella, M. (2001). Parenteral troxerutin and carbazochrome combination in the treatment of posthemorrhoidectomy status: A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase IV study. *Current Medical Research and Opinion* , 17(4), s. 256-261
- [3] Squadrito, F. , Altavilla, D. , Oliaro Bosso, S. (2000). Double-blind, randomized clinical trial of troxerutin-carbazochrome in patients with hemorrhoids. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* , 4(1-2) , 21-4
- [4] Kumar, S., K. Pandey, A. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview", *ScientificWorldJournal.* , s.29
- [5] Xiangyong, C., Mengliang , Z., Xin, G., Lei, Y., Yantong, S., J. Paul, F., Jingkai , G., .(2011). LC–MS–MS Determination of Troxerutin in Plasma and Its Application to a Pharmacokinetic Study . *Chromatographia* ,73 , s.165-169
- [6] Khattab, F., Ramadan N., Hegazy , M., Al-Ghobashy, M., Ghoniem , NS. (2015). Validated spectrophotometric methods for simultaneous determination of troxerutin and carbazochrome in dosage form. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.*, 139:206, s. 206-13
- [7] P.V. Subash Chandra Boss, T. Vetrichelvan, M. Jyostna, K. Pragadeesh, G. Swathy, M. Shankar. (2013). UV-spectrophotometric and rp-hplc methods for the estimation of troxerutin in bulk and tablet formulation. *International Journal of Pharmaceutical Research & Analysis* , 3, s.1-7
- [8] Haenen GR, Jansen FP, Bast A. (1993). The antioxidant properties of five O-(---Hydroxyethyl)-Rutositides of the flavonoid mixture Venoruton. *Phlebology: The Journal of Venous Disease*,8, s.10-17.

- [9] Chen, J., Meng, F.; Zhang, Y., Guo, ., Wang, D., Wang, S. (2013). Simultaneous quantification of CTN986, rutin and troxerutin in mice plasma by LC-MS/MS and its application in pharmacokinetics study. *Journal of International Pharmaceutical Research* ,40 ,248-253
- [10]- Zhou, M., Wu, G. (2012). Determination of troxerutin in Beagle dog plasma by LC-MS/MS .*Anhui medical and Pharmaceutical Journal* ,12, s.1768-1770
- [11] Ma, J., Zhang, Y., Zhang, M., Fan, X., Wang, Z., Shentu, Y., Wang, Z., Wang, X. (2011). Determination of troxerutin in rabbit plasma by LC-ESI-MS and its application to a pharmacokinetic study. *Latin American Journal of Pharmacy* , 30(3) , s.613-618
- [12] Zhang, Q., Yang, J., He, Y., Tang, L., Du, Y. (2013). Evaluation of measurement uncertainty for determination of troxerutin concentration in human plasma by LC-MS /MS. *Journal of Pharmaceutical Analysis* , , s. 678-683
- [13] Liu, Fei; Xu, Yu; Rui, Lei; Gao, Shu; Dong, Haijun; Guo, Qingxiang , "Liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay for the quantification of troxerutin in human plasma", *Rapid Commun Mass Spectrom.*, 1 ,2006, s.3522-6
- [14] Hepsebah, N. J. R., Nihitha, D., Ashok Kumar, A. (2014). Reverse phase HPLC method development and validation for the simultaneous quantitative estimation of troxerutin and calcium dobesilate in tablets. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* , 6(1) , s.0975-1491
- [15] Shi, J., Lin, L. (2013). Simultaneous determination of troxerutin and coumarin in troxerutin coumarin tablets by HPLC . *China Pharmacy*, 21, s. 1994-1996.
- [16] Morugina, L. V., Chumacheva, E. A. (2013). Method for the determination of content of troxerutin, dexpanthenol, benzocaine and methyl parahydroxybenzoate in pharmaceutical formulation by HPLC. , *Russ.*
- [17] Weng, S. (2005). Determination on content of troxerutin injection by HPLC. *China Pharmacist*,5,s. 389-391.
- [18] Li, Z., Wang, X., Zhao, Y. (2009). Assay of troxerutin in plasma by RP-HPLC. *Zhongguo Yaoye* , 18(2), s.23-24.
- [19] Yang, G., Liu, P., Qu, X., Xu, M., Qu, Q.; Wang, C., Hu, X., Wang, Z. (2007). The simultaneous separation and determination of six flavonoids and troxerutin in rat urine and chicken plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography with

ultraviolet-visible detection. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* , 856(1-2) , s. 222-8

[20] Zhang, H., Zhou, J., Yang, J., Lan, K., Chen, Z. (2004). Determination of troxerutin in plasma by RP-HPLC. *West China Journal of Pharmaceutical Sciences*, 19(6), s. 439-440

[21] Chen, Z. (1999). Determination of troxerutin concentration in plasma by HPLC. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 19, s.111-113(3)

[22] Dittrich, P., Ostrowski, J., Beubler, E., Schraven, E., Kukovetz, W. (1985). HPLC determination of troxerutin in plasma and urine following oral administration in man. *Arzneimittelforschung*, 35(4), s. 765-7

[23] Chen, Y.H., Ren, K., Tian, F. S., Zhu, K. K., Hu, X. Y. (2015). Spectrofluorimetric and spectrophotometric determination of troxerutin in pharmaceutical preparations. *Asian Journal of Chemistry* , 27(5), s. 1854-1856

[24] Yu, S., Gong, A., Ji, Z., Ma, Z., Zhu, M. (2006). Determination of troxerutin by spectrophotometry. *Yangzhou Daxue Xuebao, Ziran Kexueban*, 9 ,s. 28-30

[25] Quan, H., Bai, X., Yang, X. Determination of troxerutin and trace rutin contents in troxerutin tablets by double wavelength UV spectrophotometry.(2005). *Journal of Shanxi Medical University* , 5, s.592-594.

[26] Issopoulou, P. B., Economou, P. T. Analytical investigations of bioflavonoids. II. Spectrophotometric determination of sub-micromolar concentrations of troxerutin by means of a coupled redox-complexation reaction with Ce(IV) and arsenazo III.(1994). *Farmaco*, s.733-7

[27] Issopoulou, P. B. A new spectrophotometric determination of troxerutin using an oxidative coupling reaction of 3-methylbenzothiazolin-2-one hydrazone. (1993). *Pharmazie*, 48(1), s. 67-8

[28] Pochtova, M., Kakac, B. Fluorometric determination of troxerutin. (1981). *Cesko-Slovenska Farmacie*, 30, s. 16-20,

[29] Chen, X., Ma, H., Du, Y. (2011). Flow injection chemiluminescence method for determination of troxerutin. *Journal of Analytical Science*, 1, s.119-121.

- [30] Chen, X., Ma, H., Zhang, Y. (2006). Determination of troxerutin by micellar chemiluminescence with flow-injection analysis. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 7, s.109-111.
- [31] He, S., Lu, Y., He, D., Hu, Y., Zhang, Z. (2003). Flow injection chemiluminescence determination of troxerutin with ferricyanide and rhodamine 6G. *Journal of Southwest China Normal University(Natural Science)* , 4, s. 606-608.
- [32] Guo, H., Chen, R., Bi, K., Sun, Y. (2004). Determination of Troxerutin in Venoruton Injections and Venoruton Tablets by Short Capillary Zone Electrophoresis. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*,5, s. 457-459(3) ,
- [33] Guo, H., Wang, L., Bi, K., Sun, Y. (2005). Determination of troxerutin in troxerutin tablets by monolithic capillary electrochromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28, s. 647-658
- [34] Silvestri, S. (1972). Polarographic determination of some pharmaceutical products. Bromophenindione, trihydroxyethylrutoside, glibenclamide, coenzyme A, doxycycline. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, s. 209-21
- [35] Deppeler, H.; Becker, A. (1963). Determination of some pharmaceutically active substances with phenolic hydroxyl groups as iron(III) compounds. III. Separation by elatography. *Fresenius' Zeitschrift fuer Analytische Chemie*, 198(4), s. 344-7
- [36] Verstraete, M. (1977). *Haemostatic Drugs*. The Netherlands: Springer Netherlands
- [37] carbazochrome sodium sulfonate –product datasheet" 07.08.2016, <https://www.http://www.abcam.com/Carbazochrome-sodium-sulfonate-AC-17-ab145694.html>
- [38] Song, M., Zhao, H., Wang, L., Yang, L., Hang, T., Wen, A. Development and validation of a robust LC-MS-MS with atmospheric pressure chemical ionization for quantitation of carbazochrome sodium sulfonate in human plasma: application to a pharmacokinetic study. (2010). *Biomedical Chromatography*, 24(9) , s. 990-9
- [39] Hu ,X., Zheng Y., Wu, G., Liu, J., Zhu, M., Zhou, H., Zhai, Y., Wu, L., Shen-Tu, J. (2014). Optimization of solid phase extraction clean up and validation of quantitative determination of carbazochrome sodium sulfonate in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 1-6, s. 951-952

- [40] Zhang, R., Lv, W., Ma, H. (2008). Determination of carbazochrome sodium sulfonate in carbazochrome sodium sulfonate injection by HPLC. *China Pharmaceuticals*, 6, s. 120-121.
- [41] Ji, B., Wang, D., Gao, F., Xu, S., Liu, L. (2006). Determination of the content of carbazochrome sodium sulfonate injection and its related substances by HPLC. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University*, 3, s. 159-161, 168.
- [42] Qiu, Y., Luo, H., Li, J. Determination of carbazochrome tablet by HPLC. (2006). *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy*, 6, s. 492-493.
- [43] Xu, L., Wu, X., Chen, M., Zhao, X., Cai, M., Wang, Y. Determination of related substances in carbazochrome sodium sulfonate injection by HPLC. (2008). *Chinese Pharmaceutical Journal*, 12, s. 120-121.
- [44] Li, X., Liu, F. Content and related substances determination of carbazochrome sodium sulfonate for injection by RP-HPLC. (2009). *Zhongguo Yaopin Biaozhun*, 10, s. 133-135.
- [45] Huang, S., Xu, L., Cao, M. (2008). Determination of carbazochrome sodium sulfonate in carbazochrome sodium sulfonate and glucose injection by HPLC. *Anhui Yiyao*, 10, s. 120-121.
- [46] Li, J., Wang, X. (2008). HPLC determination of carbazochrome injection and its related substances. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 28, s. 1712-1714.
- [47] Gan, X., Liu, S., Liu, Z., Hu, X., Cui, Z., Wang, Y. (2012). Determination of carbazochrome by fluorescence quenching method", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 97, s. 161-6.
- [48] Gan, X., Liu, S., Liu, Z., Hu, X. (2012). Fluorescence quenching method for the determination of carbazochromum with halide fluorescein dyes. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 04, s. 683-688.
- [49] Gan, X., Liu, S., Liu, Z., Hu, X., Tian, J., Xue, J. (2013). Fluorescence quenching method for the determination of carbazochrome sodium sulfonate with aromatic amino acids. *Luminescence*, 28(3), s. 265-269.
- [50] Wang, B., Sui, X., Jiang, J. (2007). Improvement of content determination method of carbazochrome tablets. *Heilongjiang Yiyao*, 20, s. 190-191.



- [51] Wu, H., Liu, F. (2008). Determination of carbazochrome sodium sulfonate for injection by UV spectrophotometry . . *Anhui Medical and Pharmaceutical Journal*, 1, s. 18-19.
- [52] Wang, L., Fu, Z., Wang, Y. Cation exchange solid-phase extraction coupled with flow injection chemiluminescent analysis for detection of carbazochrome.(2011). *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis* , 10, s. 1934-1937.
- [53] Nie, F., He, Y., Wang, Z. (2000). Chemiluminescence determination of carbazochrome salicylate in sodium periodate-carbazochrome salicylate system. *Chinese journal of analysis laboratory* , 19, s. 56-58.
- [54] Shi, Z. (2007). Determination of carbazochrome by linear-sweep oscillography . (2007). *Modern Preventive Medicine*, 6, s.1130-1131.
- [55] Reddy, C. S., Sridevi, C.; Reddy, S. J. (1995). Polarographic determination of carbazochrome in tablets. *Journal of the Electrochemical Society of India*, 44, s. 97-100.
- [56] Zhou, B., Xu, P., Ma, H. (2006). Determination of carbazochrome sodium sulfonate by cation resin exchange method. *Zhongguo Yiyuan Yaoxue Zazhi* , 26(6), s. 770-771.
- [57] Gündüz, T. (2007). *İnstrümantal Analiz*. Ankara: Gazi Kitabevi
- [58] Kılıç,E., Köseoğlu, F., Yılmaz ,H. (Ed.). (1998). *Enstrümantal Analiz İlkeleri*. Ankara: Bilim Yayıncılık
- [59] How Does High Performance Liquid Chromatography Work. 10.05.2016, <http://www.waters.com/>
- [60] Agilent Technologies, Agilent 1260 Infinity Isocratic Pump and Quaternary Pump- User Manual ,10
- [61] Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi,“Yüksek Performanlı Sıvı Kromatografisi.15.05.2016,<http://gidaarge.akdeniz.edu.tr/cihazlar.i32.yukse-performansli-sivi-kromatografisi-hplc>
- [62] Dibek , H. (2014). Ant Teknik Cihazlar .*Turkchem* ,60-61
- [63] Hayesa, R., Ahmeda, A., Edgeb, T., Zhanga, H. (2014). Core–shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. *Advanced Materials for Separation Science*, 1357, s. 36–52

[64] NEW Kinetex F5 HPLC/UHPLC Core-Shell Columns

[65] Enstrümental Analiz-HPLC 2 ders notu-2015

[66] Söğütertaş, Ö. ve Kayalı, A. (2005) .*Ankara Ecz. Fak. Derg*, 34 (1) 37 - 57

[67] Bose, A., A. and Bm, R. HPLC Calibration Process Parameters in Terms of System Suitability Test. (2014). *Austin Chromatography*, 4, s. 1-4

[68] European Medicines Agency (2011). *ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*