

**KANDESARTAN SİLEKSETİLİN İLAÇ
ETKİLEŞİMLERİNİN *IN VITRO* OLARAK
İNCELENMESİ ve ÇEŞİTLİ ANALİTİK
YÖNTEMLERLE ANALİZİ**

Arın Gül Dal

Doktora Tezi

**KANDESARTAN SİLEKSETİLİN İLAÇ
ETKİLEŞİMLERİNİN *IN VITRO* OLARAK
İNCELENMESİ ve ÇEŞİTLİ ANALİTİK
YÖNTEMLERLE ANALİZİ**

Arın Gül Dal

Doktora Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Anabilim Dalı

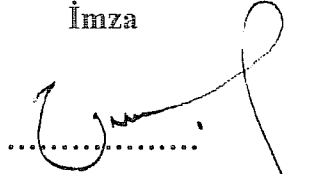
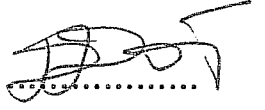
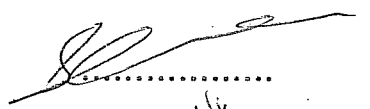
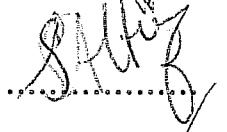

Eskişehir, Ocak 2009

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Muzaffer Tunçel

Bu tez çalışması, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No. 050331).

Jüri ve Enstitü Onayı

Arın Gül Dal'ın "Kandesartan sileksetilin ilaç etkileşimlerinin *in vitro* olarak incelenmesi ve çeşitli analitik yöntemlerle analizi" başlıklı, Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki Doktora tezi, 13.01.2009 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	Prof.Dr.Muzaffer TUNÇEL Anadolu Üniversitesi	
Üye	Prof.Dr.Dilek DOĞRUKOL AK Anadolu Üniversitesi	
Üye	Prof.Dr.Benay CAN EKE Ankara Üniversitesi	
Üye	Prof.Dr.Sacide ALTINÖZ Hacettepe Üniversitesi	
Üye	Doç.Dr.Göksel ARLI Anadolu Üniversitesi	

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 30.12.2008 tarih ve 29/2 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

E. Yasemin YAZAN

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı ve soyadı : Arın Gül Dal
Doğum tarihi ve yeri : 1978, Konya
Uyruğu : T.C.
Medeni durumu : Bekâr
İletişim adresleri : Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Analitik Kimya Anabilim Dalı
26470 Tepebaşı/Eskişehir
Tel : 0 222 3350580 # 3766
Faks : 0 222 3350750
e-posta : agdal@anadolu.edu.tr

Eğitim Durumu

İlkokul : Gazi Mustafa Kemal İlkokulu, Konya, 06/1989
Ortaokul : Konya Meram Anadolu Lisesi, Konya, 06/1993
Lise : Konya Meram Anadolu Lisesi, Konya, 06/1996
Üniversite : Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,
Eskişehir, 09/2000
Yüksek Lisans : Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Analitik Kimya ABD, Eskişehir, 09/2002
Yabancı dil : İngilizce

Mesleki Deneyim : Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Araştırma Görevlisi, 2001-

Yayımlar

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

Aboul-Enein, H.Y., Dal, A.G., Tunçel, M., A validated method development for ketoprofen by a flow-injection analysis with UV-detection and its application to pharmaceutical formulations, *Il Farmaco*, 58, 419–422 (2003).

Yapar, D., Dal, A.G., Tunçel, M., Uysal, Ü.D., Validated method for the determination of deflazacort by a flow-injection analysis with UV-detection: application to pharmaceutical formulations, J. Liq. Chromatogr. & R. T., 27 (16), 2593–2601 (2004).

Dal, A.G., Doğrukol-Ak, D., Tunçel, M., Flow injection analysis of mitomycin-C in flacons, J. Liq. Chromatogr. & R. T., 28 (4), 619–630 (2005).

Çomoğlu, T., Gönül, N., Şener, E., Dal, A. G., Tunçel, M., Determination of carbamazepine by flow-injection analysis: its application to tablet analysis and dissolution studies, J. Liq. Chromatogr. & R. T., 29(18), 2677–2690 (2006).

Doğrukol-Ak, D., Dal, A.G., Tunçel, M., Determination of sotalol in tablets and human serum by capillary electrophoresis, Chromatographia, 66, 159-163 (2007).

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

Dal, A.G., Tunçel, M., Aboul-Enein, H.Y., A validated method development for ketoprofen employing a flow-injection analysis by UV-detection and its application to pharmaceutical capsules, EUFEPS 2002, 20-23 Ekim 2002, Stockholm-İsveç.

Dal, A.G., Doğrukol-Ak, D., Tunçel, M., Determination of Mitomycin-C by flow-injection analysis in pharmaceutical flacons, Colloquium Spectroscopicum Internationale XXXIII, 7-12 Eylül 2003, Granada-İspanya.

Doğrukol-Ak, D., Dal, A.G., Tunçel, M., Determination of sotalol in tablets and human serum by capillary electrophoresis, 29th International Symposium on Capillary Chromatography, 29 Mayıs-2 Haziran 2006, Riva del Garda-İtalya.

Bilimsel Etkinlikler

Projeler :

Mitomisin C'nin akış enjeksiyon analiz ve mikrodializ yöntem parametrelerinin araştırılması, Proje Yürütücüsü: Prof.Dr. Muzaffer Tunçel, Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonu Proje No:010354, Eskişehir, 2003.

Kandesartan sileksetilin ilaç etkileşimlerinin *in vitro* olarak incelenmesi ve çeşitli analitik yöntemlerle analizi, Proje Yürütücüsü: Prof.Dr. Muzaffer Tunçel, Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonu Proje No:050331.

Organizasyonunda bulunulan toplantılar :

Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ve Kapiler Elektroferez Uygulamaları Çalıştayı, 4-8 Aralık 2006, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı, Eskişehir.

Katılan kurslar ve eğitim programları :

Moleküler Tanı ve Uygulamaları Yaz Okulu, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 28-31 Mayıs 2002, İzmir, Türkiye.

Biyoeşdeğerlik ve Patent Atölye Çalışması, 17 Nisan 2002, Ankara, Türkiye.

Osmangazi Üniversitesi Tıbbi-Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi (TICAM), I. Deneysel Hayvan Çalışmaları Temel Eğitim Günleri Çalıştayı, 11-13 Mart 2002, Eskişehir, Türkiye.

Enzim Karakterizasyonu ve Stabilizasyonu IX. Uygulamalı Lisansüstü Eğitim Kursu, 10-14 Temmuz 2006, Tübitak-Marmara Araştırma Merkezi, Gebze/Kocaeli.

ÖNSÖZ

Bu çalışmada kandesartan sileksetil (KSSL)'in ilaç etkileşmeleri *in vitro* ortamda, sıçan karaciğer mikrozomaları kullanılarak incelenmiş ve geliştirilen kapiler elektroforez (KE) yöntemi ile analizler yapılmıştır. KE yönteminin karşılaştırılması amacıyla, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) yöntemi kullanılmıştır. Geliştirilen her iki yöntem, örneklerin analizine başarı ile uygulanmıştır.

KE'nin, hızlı, kesin ve duyarlı sonuçlar sağlaması nedeniyle KSSL'nin *in vitro* ilaç etkileşmelerinin incelenmesinde güvenle kullanılabilceği gösterilmiştir.

Bilgi ve deneyimleri ile çalışmalarımın her aşamasında beni yönlendiren, araştırmacı bir kimlik kazanmamda en büyük rol sahibi, 12 yıllık değerli danışman hocam Prof. Dr. Muzaffer TUNÇEL'e

Tüm akademik yaşantım boyunca bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, sabır ve hoşgörüsü ile maddi ve manevi desteğini hep hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Dilek DOĞRUKOL AK'a

In vitro deneylerimi katkıları sayesinde gerçekleştirdiğim ve karaciğer mikrozomaları bana sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Benay CAN EKE ve Araş. Gör. Uzm. Kim. Elçin ÖZDAMAR'a

Kızıl ötesi spektrumların alınmasını sağlayan AÜBİBAM Müdür Yardımcısı Yrd. Doç. Dr. Lütfi GENÇ ve Araş. Gör. Özgür ALVER ile spektrumları yorumlayan Doç. Dr. Zafer Asım KAPLANCIKLİ'ya

Sonsuz sabır, hoşgörü ve iyi niyetleri ile sahip olmaktan her zaman gurur duyduğum sevgili arkadaşlarım Araş. Gör. Uzm. Ecz. Özlem ATLI, Araş. Gör. Uzm. Ecz. Sinem ILGIN, Araş. Gör. Uzm. Ecz. Nurcan BEKTAŞ ve Gülcan BEKTAŞ'a,

Tez konumun bulunmasından tezimin bittiği ana kadar beni her aşamada destekleyen ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Öğr. Gör. Uzm. Ecz. Ahmet SARAÇOĞLU, Araş. Gör. Dr. İlham ERÖZ POYRAZ ve Araş. Gör. Dr. Erol ŞENER'e,

Özellikle tezimin son aşamalarında yanımda olup bana maddi ve manevi destek veren sevgili arkadaşlarım Ecz. Dilek KULLUK, M. Sinan ELMALIOĞLU ve Araş. Gör. Dr. Gökalg İŞCAN'a,

Tezim süresince bana katlanan, ellerinden gelen her konuda bana yardımcı olan sevgili kardeşlerim Özgün Esin DAL ve Özden DAL KOLERİ ile sevgili eniştem Serkan KOLERİ'ye,

Hayatımın her aşamasında desteklerini benden esirgemeyen, her zaman yanımda olduklarını bildiğim sevgili annem Nuray DAL ve sevgili babam Ahmet DAL'a,

Hayatımın birlikte anlam kazandığı, yol arkadaşım Mehmet ÇAĞLAR'a teşekkürlerimi sunarım.

KANDESARTAN SİLEKSETİLİN İLAÇ ETKİLEŞİMLERİNİN *IN VITRO* OLARAK İNCELENMESİ ve ÇEŞİTLİ ANALİTİK YÖNTEMLERLE ANALİZİ

ÖZET

Kandesartan sileksetil (KSSL) hipertansiyon tedavisinde kullanılan kandesartan (KS)'nin ön ilacıdır. Bu çalışmada, KS'nin, bir sitokrom P450 2C9 (CYP 2C9) standart substratı olan diklofenak sodyum (DIC) ile farmakokinetik etkileşiminin *in vitro* koşullarda, sıçan karaciğer mikrozom enzimleri kullanılarak incelenmesi amacıyla kapiler elektroforez (KE) ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) yöntemleri tanıtılmaktadır.

Çalışmanın ilk aşamasında metoprolol süksinat (MTP) ve lansoprazol (LNS)'ün iç standart (IS) olarak kullanıldığı KS, KSSL ve DIC'in aynı anda tayinine olanak sağlayan KE yöntemi geliştirilmiştir. KE yönteminde sinyaller 214 nm'de UV detektörle kaydedilmiştir. Yöntemin optimizasyonu sonucunda, 15 mM borat, % 10 (h/h) metanol içeren, pH 8.50 çalışma tamponu, 25 kV potansiyel ve 1 sn enjeksiyon süresinin en uygun ayırımı sağladığı belirlenmiştir. Belirtilen koşullarda MTP 3.3 dk, LNS 4.7 dk, KSSL 5.1 dk ve KS'nin 7.5 dk göç zamanına sahip olduğu gözlenmiştir. KSSL için $1.88 \times 10^{-6} - 9.41 \times 10^{-5}$ M ve KS için $1.91 \times 10^{-6} - 9.58 \times 10^{-5}$ M derişim aralıklarında KE yönteminin doğrusallığı, kesinliği, doğruluğu, tutarlılığı, sağlamlığı ve seçiciliği gösterilmiştir. Yöntemin KS ve KSSL için gözlenebilme sınırı (LOD) sırasıyla 3.07×10^{-7} M ve 4.79×10^{-7} M ve alt tayin sınırı (LOQ) sırasıyla 9.15×10^{-7} M ve 1.45×10^{-6} M olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntemin bir uygulaması ticari tabletlerde KSSL analizi ile gösterilmiş ve analiz sonuçları USP XXIV kriterlerine uygun bulunmuştur.

KE yöntemini karşılaştırmak amacıyla, MTP'nin IS olarak kullanıldığı DIC ve KS'nin aynı anda analizine olanak sağlayan YPSK yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde, 290 nm uyarma ve 360 nm yayma dalga boylarında floresans detektör kullanılmıştır. % 0.01 (a/h) 1-heptan sülfonik asit içeren, pH 3.5, % 57 (h/h) metanol çözeltisinden oluşan hareketli faz sisteminde, C₁₈ kolonda, (3.0 x 150 mm, 5 µm) 1 mL/dk akış hızında ve izokratik sistemle ayırım gerçekleştirilmiştir. Belirtilen koşullarda MTP 2.5 dk, KS 4.6 dk ve DIC 16.4 dk alıkonma zamanına sahiptir. KS için $1.14 \times 10^{-8} - 1.46 \times 10^{-6}$ M, DIC için de $3.67 \times 10^{-7} - 3.91 \times 10^{-5}$ M derişim aralığında yöntemin doğrusallığı, doğruluğu, kesinliği, tutarlılığı, sağlamlığı ve seçiciliği gösterilmiştir. DIC için LOD 2.46×10^{-7} M, LOQ 7.47×10^{-7} M ve KS için LOD 1.72×10^{-8} M, LOQ 5.22×10^{-8} M olarak bulunmuştur.

Çalışmanın son aşamasında, KS'nin, DIC ile farmakokinetik etkileşimi *in vitro* koşullarda, sıçan karaciğer mikrozomal enzimleri kullanılarak incelenmiştir. *In vitro* ilaç metabolizması incelemelerinin optimizasyonu için mikrozomal protein derişimi ve substrat (DIC ve KS) derişimleri parametreleri incelenmiş ve örneklerin analizi için önerilen KE ve YPSK yöntemleri kullanılmış ve elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: kandesartan sileksetil, kapiler elektroforez, sitokrom P450 2C9, diklofenak sodyum, yüksek performanslı sıvı kromatografisi

INVESTIGATION OF *IN VITRO* DRUG-DRUG INTERACTIONS and ANALYSIS of CANDESARTAN CILEXETIL by VARIOUS ANALYTICAL TECHNIQUES

ABSTRACT

Candesartan cilexetil (KSSL) is a prodrug of candesartan (KS) which is used for hypertension therapy. Capillary electrophoretic (CE) and high performance liquid chromatographic (HPLC) methods are described for the investigation of the *in vitro* pharmacokinetic interaction between KS and diclofenac sodium (DIC) which is a standard CYP 2C9 substrate using rat liver microsomal enzymes, in this study.

In the first step, a CE method was developed for the simultaneous determination of KS, KSSL and DIC by using metoprolol succinate (MTP) and lansoprazole (LNS) as internal standards (IS). The signals were recorded at 214 nm by UV detector. The optimum conditions for the best separation were 15 mM borate buffer (pH 8.5) containing 10 % (v/v) methanol as run buffer, 25 kV for separation potential and 1 s for injection time. The migration times were 3.3 min for MTP, 4.7 min for LNS, 5.1 min KSSL and 7.5 min for KS. The method was validated in the concentration range of 1.88×10^{-6} – 9.41×10^{-5} M for KSSL and 1.91×10^{-6} – 9.58×10^{-5} M for KS for linearity, precision, accuracy, ruggedness, robustness and selectivity. The limit of detection (LOD) of the method for KSSL and KS were 3.07×10^{-7} M and 4.79×10^{-7} M respectively and limit of quantitation (LOQ) for KSSL and KS were 9.15×10^{-7} M and 1.45×10^{-6} M respectively. The method was also applied to the commercial tablet for the determination of KSSL and the results obtained were in the limits of USP XXIV.

In the second step the analysis of DIC, MTP and KS by HPLC was performed with fluorescence detector at 290 nm as excitation and 360 nm as emission wavelengths, and a pH 3.5, 57 % methanol (v/v) solution containing 0.01 % (w/v) 1-heptane sulphonic acid was used as mobile phase. Separation was achieved using C₁₈ column (3.0 x 150 mm, 5 μm) at 1 mL/min flow rate with isocratic system. Retention times were 2.5 min for MTP, 4.6 min for KS and 16.4 min for DIC. The method validation was also investigated in the concentration range 1.14×10^{-8} – 1.46×10^{-6} M for KS and 3.67×10^{-7} – 3.91×10^{-5} M for DIC to show the linearity, accuracy, precision, ruggedness, robustness and selectivity. LOD was 2.46×10^{-7} M and LOQ was 7.47×10^{-7} M for DIC, and LOD was 1.72×10^{-8} M and LOQ was 5.22×10^{-8} M for KS.

The *in vitro* pharmacokinetic interaction between KS and DIC has been investigated using rat liver microsomal enzymes in the last part of the study. The effects of the microsomal protein and substrate (DIC and KS) concentration on the drug metabolization were investigated to find out optimum parameters. The samples obtained from *in vitro* KS and DIC interaction studies were analyzed by using the developed methods and the results were compared.

Key Words: candesartan cilexetil, capillary electrophoresis, cytochrome P450 2C9, diclofenac sodium, high performance liquid chromatography

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZGEÇMİŞ	i
ÖNSÖZ	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	xxi
GİRİŞ ve AMAÇ	1
KAYNAK BİLGİSİ	3
Kullanılan Standart Maddeler ve Özellikleri	3
<i>Kandesartan sileksetil</i>	3
<i>Kandesartan</i>	3
<i>Metoprolol süksinat</i>	4
<i>Lansoprazol</i>	4
<i>Diklofenak sodyum</i>	5
Kullanılan Yöntemler	5
<i>Kapiler elektroforez</i>	5
<i>Yüksek performanslı sıvı kromatografisi</i>	7
Analitik Çalışmalar	8
Kandesartan Sileksetil ve Kandesartan Farmakolojisi	12
<i>Kandesartan sileksetil ve kandesartanın farmakokinetik özellikleri</i>	12

<i>Kandesartan sileksetil ve kandesartanın antihipertansif etkisinin özellikleri</i>	12
<i>In Vitro İlaç Metabolizma İncelemeleri</i>	13
<i>Sitokrom P450 enzim sistemi</i>	14
<i>Karaciğer mikrozomlarının hazırlanması</i>	16
<i>In vitro ilaç metabolizma incelemelerinde genel yaklaşımlar</i>	16
GEREÇLER	20
Kullanılan Kimyasal Maddeler	20
Kullanılan Cihazlar	21
YÖNTEMLER	23
Kullanılan Standart Maddelerin Saflıkları	23
<i>Erime derecesi tayini</i>	23
<i>Infra red spektrofotometri</i>	23
Kullanılan Standart Maddelerin Çözücüleri	23
Ultra Viyole Spektrofotometri	24
Kapiler Elektroforez	24
<i>Optimizasyon</i>	24
<i>Borat derişimi</i>	25
<i>pH</i>	25
<i>Organik çözücü yüzdesi</i>	25
<i>Uygulanan potansiyel</i>	25
<i>Enjeksiyon süresi</i>	26
<i>Sonuçların değerlendirilmesi</i>	26
Validasyon	26
<i>Kararlılık</i>	26

<i>Doğrusallık</i>	26
<i>Tekrarlanabilirlik</i>	27
<i>Duyarlılık</i>	27
<i>Tutarlılık</i>	27
<i>Sağlamlık</i>	28
<i>Doğruluk</i>	28
<i>Kapiler elektroforez ile kandesartan sileksetil içeren tabletlerde miktar tayini</i>	28
<i>Kandesartan sileksetil içeren tabletlerde</i>	
<i>ultra viyole spektrofotometri yöntemi ile miktar tayini ve</i>	
<i>kapiler elektroforez yöntemi ile sonuçların karşılaştırılması</i>	29
<i>Diklofenak sodyumun kapiler elektroforez ile analizi</i>	29
<i>Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi</i>	29
<i>Optimizasyon</i>	29
<i>Validasyon</i>	30
<i>Kararlılık</i>	30
<i>Doğrusallık</i>	30
<i>Tekrarlanabilirlik</i>	30
<i>Duyarlılık</i>	30
<i>Tutarlılık</i>	31
<i>Sağlamlık</i>	31
<i>In Vitro İlaç Metabolizma İncelemeleri</i>	31
<i>Mikrozomların hazırlanması</i>	31
<i>In vitro ilaç metabolizma incelemelerinde kullanılan çözeltiler ve derişimleri</i>	31
<i>Optimizasyon</i>	33

<i>Mikrozomal protein derişimi</i>	33
<i>Substrat derişimi (diklofenak sodyum)</i>	33
<i>Substrat derişimi (kandesartan)</i>	34
<i>Kapiler elektroforez ile yksek performanslı sıvı kromatografisi</i>	
<i>yntemlerinin karşılaştırılması</i>	34
BULGULAR VE TARTIşMA	35
Kullanılan Standart Maddelerin Saflıkları	35
<i>Erime derecesi tayini</i>	35
<i>Infra red spektrofotometri</i>	35
Kullanılan Standart Maddelerin zcleri	39
Ultra Viyole Spektrofotometri	40
Kapiler Elektroforez	43
<i>Optimizasyon</i>	43
<i>Borat derişimi</i>	43
<i>pH</i>	46
<i>Organik zc yzdesi</i>	49
<i>Uygulanan potansiyel</i>	52
<i>Enjeksiyon sresi</i>	55
<i>Validasyon</i>	59
<i>Kararlılık</i>	59
<i>Doğrusallık</i>	60
<i>Tekrarlanabilirlik</i>	64
<i>Duyarlılık</i>	65
<i>Tutarlılık</i>	66

<i>Sağlamlık</i>	66
<i>Doğruluk</i>	67
<i>Seçicilik</i>	72
<i>Sistem uygunluk testleri</i>	72
<i>Kapiler elektroforez ile kandesartan sileksetil içeren tabletlerde miktar tayini</i>	73
<i>Kandesartan sileksetil içeren tabletlerde</i>	
<i>ultra viyole spektrofotometri yntemi ile miktar tayini ve</i>	
<i>kapiler elektroforez yntemi ile sonuçların karşılaştırılması</i>	75
<i>Diklofenak sodyumun kapiler elektroforez ile analizi</i>	77
Yksek Performanslı Sıvı Kromatografisi	79
<i>Optimizasyon</i>	79
<i>Validasyon</i>	81
<i>Kararlılık</i>	81
<i>Doğrusallık</i>	82
<i>Tekrarlanabilirlik</i>	86
<i>Duyarlılık</i>	89
<i>Tutarlılık</i>	89
<i>Sağlamlık</i>	90
<i>Seçicilik</i>	91
<i>Sistem uygunluk testleri</i>	91
<i>In Vitro İlaç Metabolizma İncelemeleri</i>	92
<i>Optimizasyon</i>	92
<i>Mikrozomal protein deşişimi</i>	96
<i>Substrat deşişimi (diklofenak sodyum)</i>	98

<i>Substrat derişimi (kandesartan)</i>	101
<i>Kapiler elektroforez ile yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemlerinin karşılaştırılması</i>	108
SONUÇ VE ÖNERİLER	109
KAYNAKLAR	114
EK-1	

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE NO ve ADI	SAYFA
Çizelge 1 <i>In Vitro</i> İlaç Metabolizma İncelemelerinde Kullanılan Stokların İçerikleri	32
Çizelge 2 Maddelerin Ultra Viyole Spektrumu ile İlgili Karakteristikleri	42
Çizelge 3 Borat Derişiminin Maddelerin Pik Normalizasyon Oranı Üzerine Etkileri	45
Çizelge 4 pH'ın Maddelerin Pik Normalizasyon Oranı Üzerine Etkileri	48
Çizelge 5 Organik Çözücü Yüzdesinin (h/h) Maddelerin Pik Normalizasyon Oranı Üzerine Etkileri	51
Çizelge 6 Uygulanan Potansiyelin Maddelerin Pik Normalizasyon Oranı Üzerine Etkileri	54
Çizelge 7 Enjeksiyon Süresinin Maddelerin Pik Normalizasyon Oranı Üzerine Etkileri	57
Çizelge 8 Kapiler Elektroforez Yöntemi ile Kandesartan Sileksetil ve Kandesartanın Kararlılık Verileri	60
Çizelge 9 Kapiler Elektroforez Yönteminin Doğrusallık Verileri	60
Çizelge 10 Kapiler Elektroforez Yönteminin Kalibrasyon Verileri	62
Çizelge 11 Kapiler Elektroforez Yöntemine Ait Kalibrasyon Eğrisinin Korelasyon Katsayısının Önem Kontrolü	63
Çizelge 12 Kapiler Elektroforez Yöntemine Ait Kalibrasyon Eğrisinin Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü	63
Çizelge 13 Kapiler Elektroforez Yönteminin Tekrarlanabilirlik Verileri	64
Çizelge 14 Kapiler Elektroforez Cihazının Tekrarlanabilirlik Verileri	65
Çizelge 15 Kapiler Elektroforez Yönteminin Gözlenebilme ve Alt Tayin Sınırları	65
Çizelge 16 Kapiler Elektroforez Yönteminin Tutarlılık Verileri	66

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devam)

Çizelge 17	Kapiler Elektroforez Yönteminin Kandesartan Sileksetil İçin Sağlık Verileri	67
Çizelge 18	Kapiler Elektroforez Yönteminin Kandesartan İçin Sağlık Verileri	67
Çizelge 19	Kandesartanın Metoprolol Süksinata Karşı Kapiler Elektroforez Yöntemi ile Doğruluk Verileri	68
Çizelge 20	Kandesartanın Lansoprazole Karşı Kapiler Elektroforez Yöntemi ile Doğruluk Verileri	69
Çizelge 21	Kandesartan Sileksetilin Metoprolol Süksinata Karşı Kapiler Elektroforez Yöntemi ile Doğruluk Verileri	70
Çizelge 22	Kandesartan Sileksetilin Lansoprazole Karşı Kapiler Elektroforez Yöntemi ile Doğruluk Verileri	71
Çizelge 23	Matriks Ortamına Eklenen Kandesartan Sileksetilin Kapiler Elektroforez Yöntemi ile Doğruluk Verileri	72
Çizelge 24	Kapiler Elektroforez Yönteminin Sistem Uygunluk Testleri	73
Çizelge 25	Kandesartan Sileksetil İçeren Tabletlerde Kapiler Elektroforez ile Miktar Tayini Sonuçları	75
Çizelge 26	Ticari Tabletler Eklenen Standart Kandesartan Sileksetil İçin Elde Edilen Doğruluk ve Kesinlik Verileri	76
Çizelge 27	Kandesartan Sileksetil İçeren Tabletlerin Analizinde Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması	77
Çizelge 28	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi ile Kandesartan ve Diklofenak Sodyumun Kararlılık Verileri	81
Çizelge 29	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yönteminin Doğrusallık Verileri	82
Çizelge 30	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yönteminin Kalibrasyon Verileri	85
Çizelge 31	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemine Ait Kalibrasyon Eğrisinin Korelasyon Katsayısının Önem Kontrolü	86

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devam)

Çizelge 32	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemine Ait Kalibrasyon Eğrisinin Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü	86
Çizelge 33	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yönteminin Kesinlik ve Doğruluk Verileri	88
Çizelge 34	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Cihazının Tekrarlanabilirlik Verileri	89
Çizelge 35	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yönteminin Gözlenebilme ve Alt Tayin Sınırları	89
Çizelge 36	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yönteminin Tutarlılık Verileri	90
Çizelge 37	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yönteminin Kandesartan İçin Sağlık Verileri	90
Çizelge 38	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yönteminin Diklofenak Sodyum İçin Sağlık Verileri	91
Çizelge 39	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yönteminin Sistem Uygunluk Testleri	91
Çizelge 40	Kapiler Elektroforez Yöntemi ile Mikrozomal Protein Değişimi Analiz Verileri	98
Çizelge 41	Kapiler Elektroforez Yöntemi ile Substrat Değişimi (Diklofenak Sodyum) Analiz Verileri	100
Çizelge 42	Kapiler Elektroforez Yöntemi ile Substrat Değişimi (Kandesartan) Analiz Verileri	103
Çizelge 43	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yönteminin ile Substrat Değişimi (Kandesartan) Analiz Verileri	105
Çizelge 44	Kapiler Elektroforez ile Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemlerinin Karşılaştırılması	108

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA
Şekil 1 Kandesartan Sileksetilin Kimyasal Yapısı	3
Şekil 2 Kandesartanın Kimyasal Yapısı	3
Şekil 3 Metoprolol Süksinatın Kimyasal Yapısı	4
Şekil 4 Lansoprazolün Kimyasal Yapısı	4
Şekil 5 Diklofenak Sodyumun Kimyasal Yapısı	5
Şekil 6 Kapiler İçindeki Elektrozmotik Akış	5
Şekil 7 Kapiler Elektroforez Cihazı	6
Şekil 8 Sıvı Kromatografinin Uygulamaları	7
Şekil 9 Bir İlacın Sitokrom P450 Enzim Sistemi Tarafından Oksidasyonu	14
Şekil 10 Potasyum Bromür Diski Hazırlanan Kandesartanın Infra Red Spektrumu	35
Şekil 11 Potasyum Bromür Diski Hazırlanan Kandesartan Sileksetilin Infra Red Spektrumu	36
Şekil 12 Potasyum Bromür Diski Hazırlanan Diklofenak Sodyumun Infra Red Spektrumu	37
Şekil 13 Potasyum Bromür Diski Hazırlanan Metoprolol Süksinatın Infra Red Spektrumu	38
Şekil 14 Potasyum Bromür Diski Hazırlanan Lansoprazolün Infra Red Spektrumu	39
Şekil 15 Metanolde Çözülmüş 2.05×10^{-5} M Derişimdeki Kandesartanın 200-360 nm'ler Arasında Kaydedilmiş Ultra Viyole Spektrumu	40
Şekil 16 Metanolde Çözülmüş 2.07×10^{-5} M Derişimdeki Kandesartan Sileksetilin 200-360 nm'ler Arasında Kaydedilmiş Ultra Viyole Spektrumu	41
Şekil 17 Metanolde Çözülmüş 2.07×10^{-5} M Derişimdeki Diklofenak Sodyumun 200-360 nm'ler Arasında Kaydedilmiş Ultra Viyole Spektrumu	41

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

Şekil 18	%50 (h/h) Metanolde Çözülmüş 2.21×10^{-5} M Derişimdeki Metoprolol Süksinatın 200-360 nm'ler Arasında Kaydedilmiş Ultra Viyole Spektrumu	41
Şekil 19	2.07×10^{-5} M Derişimdeki Lansoprazolün 200-360 nm'ler Arasında Kaydedilmiş Ultra Viyole Spektrumu	42
Şekil 20	Kandesartan Sileksetilin Borat Derişimine Karşı Göç Zamanı ve Teorik Tabaka Sayısı Değişimi	44
Şekil 21	Kandesartanın Borat Derişimine Karşı Göç Zamanı ve Teorik Tabaka Sayısı Değişimi	44
Şekil 22	Borat Derişiminin Maddelerin Pik Normalizasyon Oranı Üzerine Etkilerinin Grafikselsel Gösterimi	46
Şekil 23	Kandesartan Sileksetilin pH'a Karşı Göç Zamanı ve Teorik Tabaka Sayısı Değişimi	47
Şekil 24	Kandesartanın pH'a Karşı Göç Zamanı ve Teorik Tabaka Sayısı Değişimi	47
Şekil 25	pH'ın Maddelerin Pik Normalizasyon Oranı Üzerine Etkilerinin Grafikselsel Gösterimi	49
Şekil 26	Kandesartan Sileksetilin Organik Çözücü Yüzdesine Karşı Göç Zamanı ve Teorik Tabaka Sayısı Değişimi	50
Şekil 27	Kandesartanın Organik Çözücü Yüzdesine Karşı Göç Zamanı ve Teorik Tabaka Sayısı Değişimi	50
Şekil 28	Organik Çözücü Yüzdesinin Maddelerin Pik Normalizasyon Oranı Üzerine Etkilerinin Grafikselsel Gösterimi	52
Şekil 29	Kandesartan Sileksetilin Uygulanan Potansiyele Karşı Göç Zamanı ve Teorik Tabaka Sayısı Değişimi	53
Şekil 30	Kandesartanın Uygulanan Potansiyele Karşı Göç Zamanı ve Teorik Tabaka Sayısı Değişimi	53
Şekil 31	Uygulanan Potansiyelin Maddelerin Pik Normalizasyon Oranı Üzerine Etkilerinin Grafikselsel Gösterimi	55

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

Şekil 32	Kandesartan Sileksetilin Enjeksiyon Süresine Karşı Göç Zamanı ve Teorik Tabaka Sayısı Değişimi	56
Şekil 33	Kandesartanın Enjeksiyon Süresine Karşı Göç Zamanı ve Teorik Tabaka Sayısı Değişimi	56
Şekil 34	Enjeksiyon Süresinin Maddelerin Pik Normalizasyon Oranı Üzerine Etkilerinin Grafikselsel Gösterimi	58
Şekil 35	Maddelerin Optimum Koşullarda Elde Edilen Elektroferogramı	59
Şekil 36	Kapiler Elektroforez Yönteminin Kandesartan İçin Doğrusallığının Grafikselsel Gösterimi	61
Şekil 37	Kapiler Elektroforez Yönteminin Kandesartan Sileksetil İçin Doğrusallığının Grafikselsel Gösterimi	61
Şekil 38	a: Standart Çözelti, b: Ticari Tablet Çözeltisi, c:Sentetik Tablet Çözeltisi d:Matriks Elektroferogramları	74
Şekil 39	Ultra Viyole Spektrofotometrik Yöntemde Standart Ekleme Tekniğı ile Elde Edilen Kalibrasyon Grafiğı	76
Şekil 40	Diklofenak Sodyumun Kapiler Elektroforez Yöntemi ile Analizi	78
Şekil 41	Maddelerin Optimum Koşullarda Elde Edilen Kromatogramı	80
Şekil 42	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yönteminin Kandesartan İçin Doğrusallığının Grafikselsel Gösterimi	83
Şekil 43	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yönteminin Diklofenak Sodyum İçin Doğrusallığının Grafikselsel Gösterimi	83
Şekil 44	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yönteminin Gün İçi Kalibrasyon Analizlerinden Birinin Grafikselsel Gösterimi	84
Şekil 45	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yönteminin Gün İçi Kesinliğinin Grafikselsel Gösterimi	87
Şekil 46	Kapiler Elektroforez Yöntemiyle İncelenen Mikrozoimal Proteinsiz Örneğıe Ait Elektroferogram	94

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

Şekil 47	Kapiler Elektrophorez Yöntemiyle Reaksiyon Başlatıcı Ajan Kullanılmadan İncelenen Örneğe Ait Elektropherogram	94
Şekil 48	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemiyle İncelenen Mikrozomal Proteinsiz Örneğe Ait Kromatogram	95
Şekil 49	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemiyle Reaksiyon Başlatıcı Ajan Kullanılmadan İncelenen Örneğe Ait Kromatogram	95
Şekil 50	Kapiler Elektrophorez Yöntemi ile Mikrozomal Protein Derişimi Analizinin Grafıksel Gösterimi	97
Şekil 51	Kapiler Elektrophorez Yöntemi ile Mikrozomal Protein Derişimi Analiz Sonuçlarının Logaritmik Grafığı	98
Şekil 52	Kapiler Elektrophorez Yöntemi ile Substrat Derişimi (Diklofenak Sodyum) Analizinin Grafıksel Gösterimi	99
Şekil 53	Kapiler Elektrophorez Yöntemi ile Substrat Derişimi (Diklofenak Sodyum) Analiz Sonuçlarının Logaritmik Grafığı	100
Şekil 54	Kapiler Elektrophorez Yöntemi ile Substrat Derişimi (Kandesartan) Analizinin Grafıksel Gösterimi	102
Şekil 55	Kapiler Elektrophorez Yöntemi ile Substrat Derişimi (Kandesartan) Analiz Sonuçlarının Logaritmik Grafığı	103
Şekil 56	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi ile Substrat Derişimi (Kandesartan) Analizinin Grafıksel Gösterimi	104
Şekil 57	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi ile Substrat Derişimi (Kandesartan) Analiz Sonuçlarının Logaritmik Grafığı	105

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

Şekil 58.	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi ile Yalnız 50 mM Diklofenak Sodyum İçeren Örneğin 60. Dakikadaki Kromatogramı ile 50 mM Diklofenak Sodyum ve 50 mM Kandesartan İçeren Örneğin Tüm Zamanlardaki Kromatogramlarının Karşılaştırılması	106
Şekil 59.	Kapiler Elektforez Yöntemi ile Zamana Karşı Metabolize Olmadan Ortamda Kalan Yüzde Diklofenak Sodyum Miktarına Ait Grafik	107
Şekil 60.	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi ile Zamana Karşı Metabolize Olmadan Ortamda Kalan Yüzde Diklofenak Sodyum Miktarına Ait Grafik	107

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

1-HSA	: 1-Heptan sülfonik asit
α	: Seçicilik faktörü
a	: Eğim
ADE	: Anjiyotensin dönüştürücü enzim
ARA II	: Anjiyotensin II reseptör antagonisti
AT ₁	: Anjiyotensin II tip 1
AT ₂	: Anjiyotensin II tip 2
b	: Kesim
BH	: Bağlı hata
BSS	: Bağlı standart sapma
cDNA	: Tamamlayıcı deoksiribo nükleik asit
CYP	: Sitokrom P450
DIC	: Diklofenak sodyum
dk	: Dakika
ϵ	: Molar ekstinksiyon katsayısı
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit disodyum tuzu
GA	: Güven aralığı
GS	: Güven sınırları
HCl	: Hidroklorik asit
IR	: Infra red
IS	: İç standart
k'	: Kapasite faktörü
KBr	: Potasyum bromür
KCl	: Potasyum klorür
KE	: Kapiler elektroforez
KH ₂ PO ₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
KS	: Kandesartan
KSSL	: Kandesartan sileksetil
LNS	: Lansoprazol
LOD	: Gözlenebilme sınırı
LOQ	: Alt tayin sınırı

MgCl ₂	: Magnezyum klorür
MTP	: Metoprolol süksinat
n	: Deney sayısı
NADH	: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid 2'-fosfat
NaH ₂ PO ₄	: Sodyum dihidrojen fosfat
NaOH	: Sodyum hidroksit
ODS	: Okta desil silan
pKa	: Asitlik sabiti
PN	: Pik normalizasyonu
PNO	: Pik normalizasyon oranı
r	: Korelasyon katsayısı
rpm	: Döngü/dakika
Rs	: Ayırım gücü
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
sn	: Saniye
Sr	: Korelasyon katsayısının standart hatası
ss	: Standart sapma
TRIS	: 2-Amino-2-hidroksi metil-propan-1,3-diol
USP	: Amerikan farmakopesi
UV	: Ultra viyole
v ⁻¹	: Dalga sayısı
YPSK	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
\bar{x}	: Ortalama

GİRİŞ ve AMAÇ

Birden fazla ilacın birlikte kullanıldığı durumlarda karşılaşılan önemli sorunlardan biri, bu ilaçların birbirleri ile etkileşimi sonucunda etkilerinin artması ve/veya azalması nedeni ile toksisite gözlenmesi ya da istenen terapötik etkiye ulaşılamamasıdır.

Bir ilaç tarafından, diğer bir ilacın etkisi kalitatif ve/veya kantitatif olarak değiştiriliyorsa, bu iki ilaç arasında etkileşme vardır. İlaç etkileşimleri, oluş mekanizmalarına göre farmakodinamik ve farmakokinetik etkileşmeler olmak üzere iki ana grupta toplanırlar. Farmakodinamik etkileşmeler, bir ilacın bir başka ilacın etkisini, onunla etki yeri veya çevresinde etkileşmesi, onunla zıt veya aynı yönde bir etki oluşturması veya onunla kimyasal olarak birleşmesi sonucu değiştirmesi ile oluşur. Farmakokinetik etkileşmeler ise bir ilacın, bir başka ilacın farmakokinetiğini yani absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve atılımını değiştirmesi sonucu oluşur. Farmakokinetik ilaç etkileşmelerinin en sık görülen örnekleri, bir ilacın biyotransformasyon hızının bir diğer ilaç tarafından değiştirilmesi sonucu ortaya çıkar. Bu tür etkileşme, genelde bir ilacın biyotransformasyonundan sorumlu olan enzimin, diğer bir ilaç tarafından indüksiyonu veya inhibisyonu sonucunda oluşur ve etkilenen ilacın vücut sıvıları ve etki yerindeki derişimi değişeceği için etki şiddeti ve/veya süresi de değişir. Etkilenen enzimler genellikle sitokrom P450 (CYP) grubu enzimlerdir (Kayaalp, 2000).

İlaç etkileşmeleri çalışmaları, ilaç geliştirmenin erken keşif aşamalarında planlanmalıdır. Bu çalışmalar *in vitro* koşullarda enzimatik düzeyde çalışmalar olabileceği gibi deney hayvanlarında da *in vivo* koşullarda gerçekleştirilebilir. *In vivo* çalışmalar, *in vitro* çalışmaların bulgularına göre yapılmalıdır. *In vitro* çalışmalardaki negatif bulgular, ilgili *in vivo* çalışmaların elenmesine yardım edebilir. Uygun substrat ve inhibitörlerin kullanılması, ilaç etkileşmeleri çalışmalarının sonuçlarının yorumlanmasına yardımcı olabilir (Zhang ve ark., 2008).

Hipertansiyon gibi kronik hastalıkların tedavisinde sürekli ilaç kullanımı gerektiğinden, bu tip hastalarda ortaya çıkabilecek diğer hastalıkların tedavi edilebilmesi için ilaç seçimi yapılırken, olası etkileşimlerin göz önünde bulundurulması tedavinin başarısı açısından büyük önem taşır. Kandesartan sileksetil (KSSL), hipertansiyon tedavisinde kullanılan ve gastrointestinal sistemde ester hidrolizine uğrayarak aktif metaboliti olan kandesartan (KS)'a dönüşen bir ön ilaçtır (Easthope ve Jarvis, 2002).

KSSL ve aktif metaboliti KS'nin, spektrofotometrik (Erk, 2003a), ultra viyole (UV) ve/veya floresans detektöre bağlı yüksek performanslı sıvı kromatografik (Nie ve ark., 2005; Subba Rao ve ark., 2007; Erk, 2003b; Stenhoff ve ark., 1999; González ve ark., 2002; Miyabayashi ve ark., 1996; Lee ve ark., 1995), kütle spektrometresine bağlı sıvı kromatografik (Kumar ve ark., 2002), kapiler zon elektroforetik (Hillaert ve Van den Bossche, 2002; Zhang ve ark., 2006) ve miselsi elektrokinetik kapiler kromatografik (Hillaert ve ark., 2003) analizleri yapılmış ve tablet, plazma, idrar gibi örneklere uygulanması literatürlerde gösterilmiştir.

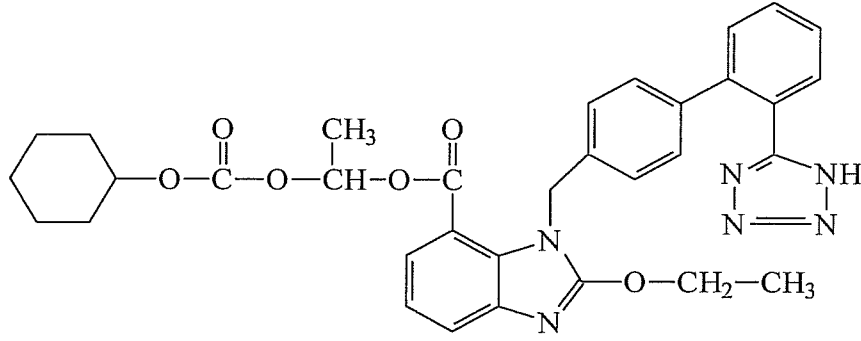
Bu tezde; KSSL ve aktif metaboliti olan KS'nin miktar tayini için bir kapiler elektroforetik yöntem geliştirilmesi ve geliştirilen yöntemin *in vitro* ortamda, sıçan karaciğer mikrozoamları kullanılarak KS ile diklofenak sodyum (DIC)'un ilaç etkileşmelerinin incelenmesinde kullanılması hedeflenmiştir. Kapiler elektroforetik yöntemde iç standart (IS) olarak metoprolol süksinat (MTP) ve lansoprazol (LNS) kullanılmıştır. CYP 2C9 enziminin standart substratı olan DIC de geliştirilen kapiler elektroforez (KE) yöntemi ile analiz edilmiştir. Daha sonra karşılaştırma yöntemi olarak, floresans detektöre bağlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) ile KS, DIC ve IS olarak MTP'nin kullanıldığı bir yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemler *in vitro* ortamda, sıçan karaciğer mikrozoamları üzerinde gerçekleştirilen KS'nin DIC ile etkileşimi deneylerinden elde edilen örneklerin analizine başarı ile uygulanmıştır.

KAYNAK BİLGİSİ

Kullanılan Standart Maddeler ve Özellikleri

Kandesartan sileksetil

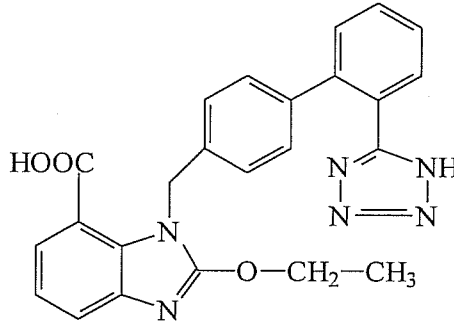
KSSL, 610.67 g/mol molekül ağırlığına sahip, kapalı formülü $C_{33}H_{34}N_6O_6$ olan bir maddedir. Kimyasal olarak 2-etoksi-1-[4-[2-(1 H-tetrazol-5-il)fenil]benzil]-7-benzimidazol karboksilik asit şeklinde adlandırılır. 163–167 °C'ta erir ve bozunur (http-1). Pratik olarak suda çözünmez, metanolde çözünür (http-2). Asitlik sabiti (pKa) değeri 6.0'dır (Cagigal ve ark., 2001). KSSL'nin kimyasal formülü **Şekil 1**'de verilmektedir.



Şekil 1. Kandesartan Sileksetilin Kimyasal Yapısı

Kandesartan

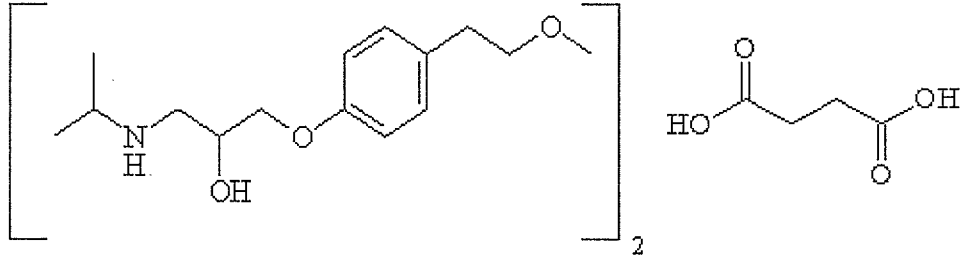
KS, 440.454 g/mol molekül ağırlığına sahip, kapalı formülü $C_{24}H_{20}N_6O_3$ olan bir maddedir. Kimyasal olarak 2-etoksi-3-[[4-[2-(2h-tetrazol-5-il)fenil]fenil]metil]benzimidazol-4-karboksilik asit şeklinde isimlendirilir. Erime derecesi 183–185 °C'tır (http-3). Pratik olarak suda çözünmez (http-4). pKa'sı 3.9'dur (Cagigal ve ark., 2001). KS'nin açık formülü **Şekil 2**'de sunulmaktadır.



Şekil 2. Kandesartanın Kimyasal Yapısı

Metoprolol süksinat

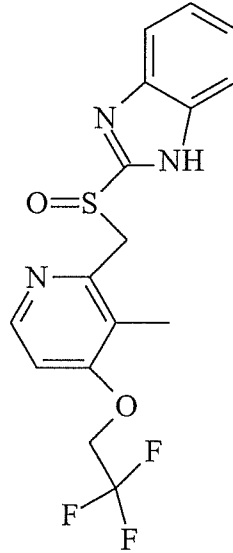
MTP'nin kapalı formülü $(C_{15}H_{25}NO_3)_2 \cdot C_4H_6O_4$ ve molekül ağırlığı 652.8 g/mol'dür. Kimyasal isimlendirilmesi (+/-)-1-izopropilamino-3-(4-(2-metoksietil)fenoksi)propan-2-ol süksinat şeklindedir. MTP'nin erime derecesi 136-138 °C'tır (http-5; http-6). Suda, metanol ve etanolde kolayca çözünür ancak, eter ve asetonda çözünmez. pKa'sı 9.68'dir (http-7; http-8; USP XXIV, 2000; The Merck Index, 1989). MTP'nin kimyasal formülü **Şekil 3**'te gösterilmektedir.



Şekil 3. Metoprolol Süksinatın Kimyasal Yapısı

Lansoprazol

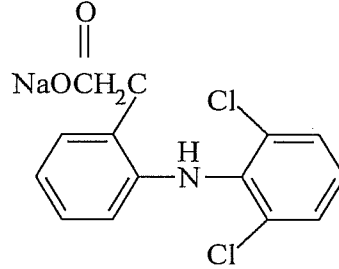
LNS, $C_{16}H_{14}F_3N_3O_2S$ kapalı formülüne ve 369.4 g/mol molekül ağırlığına sahiptir. Kimyasal olarak 2-[[3-metil-4-(2,2,2-trifloroetoksi)piridin-2-il]metil]sülfinil]-1H-benzimidazol şeklinde isimlendirilir. Erime derecesi 178-182 °C'tır (http-9). Etanol, metanol ve dimetil formamidde çözünür. Pratik olarak suda ve hegzanda çözünmez. pKa değeri 8.8'dir (http-10). LNS'nin kimyasal yapısı **Şekil 4**'te verilmektedir.



Şekil 4. Lansoprazolün Kimyasal Yapısı

Diklofenak sodyum

DIC, kimyasal olarak sodyum [*o*-(2,6-dikloroanilino)fenil]asetat olarak isimlendirilir. Kapalı formülü $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$ 'dir ve molekül ağırlığı 318.13 g/mol'dür. Suda ve metanolde çözünür ancak, eterde çözünmez. pKa'sı 4.0'dır. Erime noktası 283-285 °C'tır (http-11; http-12; USP XXIV, 2000; The Merck Index, 1989). DIC'in açık formülü **Şekil 5**'te sunulmaktadır.

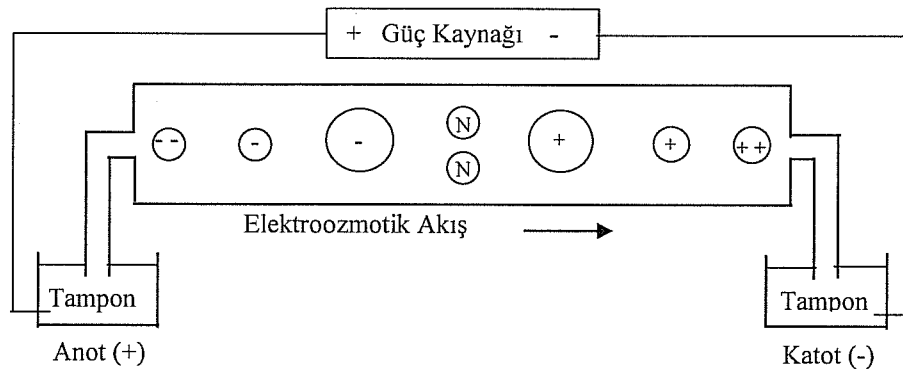


Şekil 5. Diklofenak Sodyumun Kimyasal Yapısı

Kullanılan Yöntemler

Kapiler elektroforez

KE, küçük hacimlerdeki numunelerde bulunan yüklü parçacıkların hızlı ve verimli ayırmalarına ve analizine olanak sağlayan modern bir analitik tekniktir. Elektroforez, yüklü parçacık veya moleküllerin sıvı bir ortamda elektrik alan etkisiyle hareketleridir. KE'de moleküller, yük / kütle oranlarına göre farklı hızda göç ederek birbirlerinden ayrılırlar. KE'de parçacıkların göç hızları üzerine etki eden iki kuvvet bulunmaktadır. Bunlar elektroozmotik ve elektroforetik etkilerdir. Elektrik alan uygulandığında yüklü iyonlar, yüklerine ters işaretteki elektroda doğru yol alırlar. Küçük ve yükü daha fazla olan iyonlar daha hızlı hareket ederek erken elüe olurlar. Büyük ve elektriksel yükü daha az olanlar ise kapileri daha geç terk ederler. Elektrik alan uygulandığında nötr moleküller ve tampon da elektroozmotik akışa göre hareket ederler. **Şekil 6**'da kapiler içindeki elektroozmotik akış gösterilmektedir (Baker, 1995).

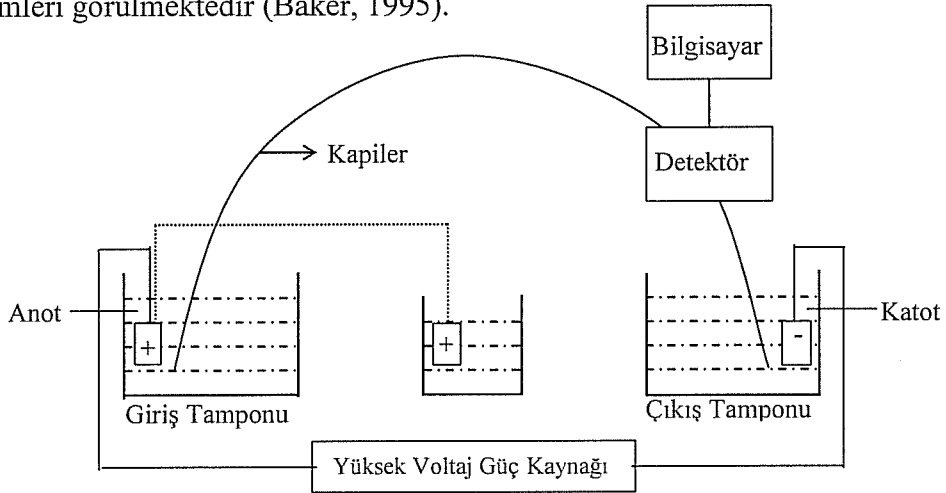


Şekil 6. Kapiler İçindeki Elektroozmotik Akış

Yüklü moleküller, elektroforetik hareketliliklerindeki farklılıklara göre ayrılırlar ve her molekül kendi yüküne ters işaretteki elektroda gitme eğilimindedir. Elektroozmotik akış bir nehrin akışı gibidir. Kapiler girişi anot olarak kabul edildiğinde, negatif yüklü anyonlar, pozitif yüklü anoda doğru çekilirler ve eğer elektroozmotik akış olmazsa kapilerden geçmeyerek giriş tamponuna geri göç ederler. Kapiler içerisindeki tamponun elektroozmotik akışı, genellikle negatif yüklü anyonların elektroforetik hareketliliklerinden büyük olduğu için, negatif yüklü anyonlar tamponla taşınırlar. Anyonik moleküller anot tarafından çekildikleri için elektroozmotik akıştan daha yavaş hareket ederek kapileri daha geç terk ederler. Yüksüz parçacıklar, elektroforetik hareketliliklerden etkilenmedikleri için elektroozmotik akış hızında göç ederler. Pozitif yüklü parçacıklar ise katoda doğru hem elektroforetik etki hem de elektroozmotik akış sayesinde göç ederler. Dolayısıyla pozitif yüklü moleküllerin akış hızı elektroozmotik akıştan fazladır. Elektroozmotik akış hızının deneysel tayininde mezitil oksit veya dimetil sülfoksit gibi elektroforetik çekime uğramayan nötral maddeler kullanılabilir (Baker, 1995).

Elektroozmotik akışı voltaj, pH, tampon konsantrasyonu ve sıcaklık gibi faktörler etkiler. Elektroozmotik akış sayesinde anyon ve katyonlar tek analizle ayrılabilirler. Ayrıca farklı yük/kütle oranına sahip iyonlar belli bir zaman içerisinde ayrılabilirler. KE ile polar, apolar, suda çözünen ve çözünmeyen moleküller, inorganik anyon ve katyonlar, proteinler gibi yüksek molekül ağırlığına sahip moleküller oda sıcaklığında ve bir sıvı pompasına gerek duyulmaksızın düşük basınçta tayin edilebilir (Baker, 1995).

KE sistemi, numune vialı, giriş ve çıkış vialleri, kapiler, detektör, yüksek voltaj güç kaynağı ve bilgisayardan oluşur. Aşağıdaki şekilde tipik bir KE cihazının bölümleri görülmektedir (Baker, 1995).



Şekil 7. Kapiler Elektroforez Cihazı

KE'de ayırma bölmesi, içi çözelti ile doldurulmuş kapiler bir borudur. Kapilerin iki ucunda içi tampon çözeltisiyle doldurulmuş küçük şişeler bulunur. Bu şişelere daldırılmış olan elektrotlara, bir güç kaynağından elektrik alan uygulanır. Kapilerin bir ucundan örnek uygulanır ve bileşenlerin ayırımı sağlanır. Bileşenler

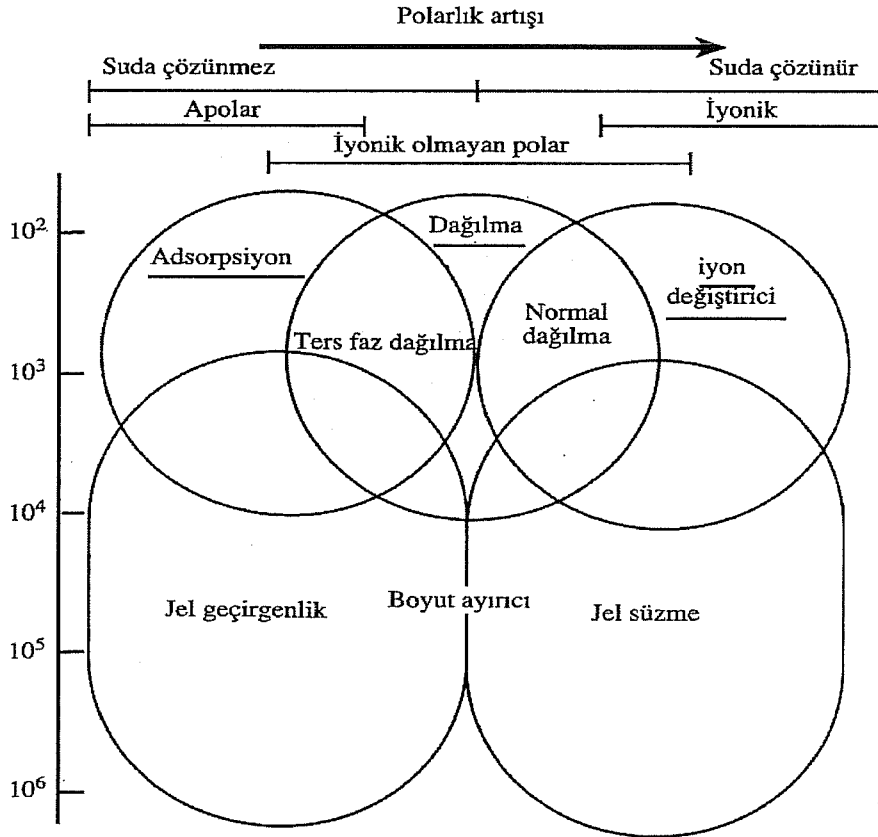
detektör önünden geçerken tayin edilirler. Zamana karşı detektör sinyalinin oluşturduğu grafiğe elektroferogram denir (Baker, 1995).

KE, yüksek verimlilikte ve hızlı ayırmalar, diğer yöntemlerdeki materyallere göre ucuz ve dayanıklı kapiler kolonlar, küçük hacimli örnek ile çalışabilme ve reaktif sarfiyatının az olması gibi üstünlükler taşımaktadır (Baker, 1995).

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

YPSK, 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.

Kromatografik yöntemler için çeşitli kriterlere göre pek çok sınıflandırma bulunmaktadır. YPSK'da kullanılabilen ayırma mekanizmaları adsorpsiyon, dağılma, iyon değiştirme ve boyut elemidir (Lindsay, 1992; Skoog, 1999).



Şekil 8. Sıvı Kromatografinin Uygulamaları (Saunders, 1975)

Bir YPSK cihazı genel olarak hareketli faz sağlayıcı sistem, pompa, enjeksiyon ünitesi, kolon, detektör ve bilgisayardan oluşur. Hareketli faz sağlayıcı sistem, hareketli fazın içinde bulunduğu ağız kapalı bir cam malzemedir. Hareketli fazın pompaya ulaşmadan önce içinde çözünmüş olabilecek gazlardan arındırılması işlemi bu aşamada gerçekleştirilir. Pompa, kontrol edilebilen bir akış hızında hareketli fazları kolona gönderir. Bazı cihazlarda bulunan gradient sistem sayesinde çeşitli hareketli fazlar, istenilen oran ve sürelerde karıştırılıp pompalanabilir. Enjeksiyon ünitesi ile analiz edilecek örnekler kolona yüklenir. Kolon, örneklerin ayırımının gerçekleştiği, çeşitli çap ve uzunlukta olabilen, paslanmaz çelik borulara doldurulmuş sabit faz materyalinden oluşur. Pek çok durumda kolonun ön kısmına takılan ve kolonun kirlenmesini önleyen koruyucu (Guard) kolon kullanılmaktadır. Bu koruyucu kolonların iç çapı daha dardır. Detektör ise kolondan çıkan bileşenleri elektriksel sinyallere çeviren bölümdür (Lindsay, 1992; Skoog, 1999).

Analitik Çalışmalar

Yapılan bir çalışmada KS, eprosartan, irbesartan, losartan potasyum, telmisartan ve valsartandan oluşan altı anjiyotensin reseptör antagonisti (ARA II)'nin ayırımı için kapiler zon elektroforetik bir yöntem geliştirilmiştir. Çalışmada detektör olarak UV detektör kullanılmış ve dalga boyu 214 nm'ye ayarlanmıştır. 85 cm (detektöre kadar 33 cm) uzunluğunda ve 50 µm iç çapa sahip çıplak silika kullanılarak gerçekleştirilen ayırmada, 25 kV potansiyel ve 5 saniye (sn) enjeksiyon süresi uygulanmıştır. ARA II'ler amfoterik karakterdedir ve dolayısıyla göç zamanları pH'tan oldukça fazla etkilenmektedir. pH 7.5 ve üzerinde incelenen ARA II'ler iki gruba ayrılmıştır. İlk gruptaki eprosartan ve valsartan birlikte göç etmişler ve ikinci gruptaki telmisartan, irbesartan ve losartan potasyum arasında düzgün bir ayırım sağlanamamıştır. Bunun üzerine pH ve tampon derişimi parametreleri incelenerek asidik bir tampon kullanılmasına karar verilmiş ve çalışma tamponu olarak pH'ı 2.5 olan 60 mM sodyum fosfat tamponu kullanılmıştır. Asidik ortamda çalışmaya karar verildikten sonra tüm maddeler için 1 M hidroklorik asit (HCl) çözeltisi çözücü olarak kullanılmış, ancak, valsartan ve KS düşük çözünürlükleri nedeniyle kantitatif tayine uygun bulunmamışlardır. Bu maddeler, uzun göç zamanına sahip olmaları nedeniyle diğer dört maddeden iyi ayrılmıştır. Tek başlarına analiz edildiklerinde KS'nin 12 dk, valsartanın ise 18 dk göç zamanına sahip oldukları görülmüştür. Bu iki madde için pH'ın daha yüksek olduğu ve sodyum dodesil sülfat (SDS) eklenmiş bir tampon önerilmektedir (Hillaert ve Van den Bossche, 2002).

KS, eprosartan mesilat, irbesartan, losartan potasyum, telmisartan ve valsartanın miselsi elektrokinetik kapiler kromatografik yöntemle ayırımının gerçekleştirildiği bir çalışmada 214 nm'ye ayarlanmış UV detektör kullanılmıştır. 30 cm (22.5 + 7.5) uzunluğunda, 75 µm iç çapa sahip kapiler kullanılmış ve örnekler 10 kV potansiyel altında uygulanmıştır. Yöntemin optimizasyonu için pH, tampon derişimi ve misel oluşturucu ajan olarak SDS derişimi parametreleri incelenmiştir. Ortamın pH'ı olarak, 6.0 - 7.5; tampon derişimi olarak sodyum fosfatın 40 - 80 mM derişimleri ve SDS derişimi olarak 10 - 40 mM değerleri kullanılarak çalışılmıştır. İncelemeler sonucunda 15 mM SDS içeren, pH 6.5, 55 mM sodyum fosfat sisteminin bu ARA II'lerin ayırımını yeterli düzeyde sağladığı görülmüştür.

Çalışmada KS, yüksek çözünürlüğü nedeniyle IS olarak seçilmiş ve bu koşullar altında elektroferogramda 6.8 dakikada belirmiştir (Hillaert ve ark., 2003).

Bir başka çalışmada ARA II'lerden KS, telmisartan, losartan ve irbesartanın idrardan ayırımı poli monolit kullanılarak kapiler zon elektroforez yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. KS'nin asidik ortamdaki düşük çözünürlüğü nedeniyle, çalışma tamponuna organik çözücü eklenmesine gerek duyulmuştur. pH'ın 2.3 olduğu, asetonitril:10 mM sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4) (1:1, h/h) tampon sistemi ile başarıyla gerçekleştirilen analizde, tüm maddelerin stok çözeltileri metanolde çözülerek hazırlanmıştır. KS, 2 µg/mL derişimde, IS olarak kullanılmış ve göç zamanının 7 dakikadan daha kısa olduğu bulunmuştur. Çalışmada incelenen ARA II'ler için saptama sınırları 15-20 ng/mL aralığında bulunmuştur. (Zhang ve ark., 2006).

Poli monolit kullanılarak yapılan bir başka çalışmada, YPSK ile ve ARA II'lerden KS, losartan, irbesartan, valsartan ve telmisartanın plazma ve idrardan tayini için bir yöntem geliştirilmiştir. Yöntemde ayırım, 250 mm x 4.6 mm boyutlarına ve 5 µm partikül çapına sahip C_{18} kolonda gerçekleştirilmiştir. Detektör olarak, UV detektör 250 nm'ye ve floresans detektör uyarma dalga boyu 250 nm'ye, yayma dalga boyu da 380 nm'ye ayarlanarak kullanılmıştır. Hareketli faz olarak asetonitril:5 mM sodyum asetat tamponu (40:60, h/h) pH 3.5 olacak şekilde kullanılmıştır. Bu ARA II'ler için saptama sınırları, plazma için 0.1 – 15.3 ng/mL düzeyinde ve idrar için 0.1 - 15.2 ng/mL düzeyinde hesaplanmıştır. Yöntem KS için 5 – 2000 ng/mL derişim aralığında doğrusal bulunmuştur. Bu koşullar altında KS'nin alıkonma zamanının 10 dakikadan daha kısa olduğu görülmüştür (Nie ve ark., 2005).

KSSL ve bozunma ürünlerinin birlikte analizinin yapıldığı bir çalışmada 250 mm x 4.6 mm boyutlarına ve 5 µm partikül çapına sahip siyano kolon kullanılarak sıvı kromatografik ayırım sağlanmıştır. Hareketli faz olarak pH 3.0 fosfat tamponu:asetonitril (50/50, h/h) karışımı kullanılmış ve deteksiyon UV detektörle 210 nm'de gerçekleştirilmiştir. Çalışmada KSSL hidrolitik, oksidatif, fotolitik ve termal strese maruz bırakılmış ve oluşan bozunma ürünleri ile birlikte analizi yapılmıştır. KSSL ve bozunma ürünlerinin stok çözeltileri asetonitrilde hazırlanmıştır. Optimizasyon çalışmaları sonucunda 20 dakikalık bir analizde KSSL'nin 12 dk alıkonma zamanına sahip olduğu görülmüştür. Çeşitli streslere maruz bırakılan KSSL tabletleri için geliştirilen yöntemin validasyonu da başarıyla gösterilmiştir (Subba Rao ve ark., 2007).

KSSL ve diüretik bir ilaç olan hidroklorotiyazidin farmasötik preparatlardan ve plazmadan tayini için geliştirilen bir sıvı kromatografik yöntemde diyot dizisi detektör kullanılmış ve dalga boyu 260 nm'ye ayarlanmıştır. KSSL ve hidroklorotiyazidin stok çözeltileri metanolde hazırlanmıştır. 150 mm x 4.6 mm boyutlarına ve 5 µm partikül çapına sahip C_{18} kolonda ayırım gerçekleştirilmiş ve hareketli faz olarak pH'ı 2.5 olan 10 mM potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4):metanol:asetonitril (2:80:18, h/h/h) karışımı kullanılmıştır. Bu koşullar altında KSSL ve hidroklorotiyazid için alıkonma zamanları sırasıyla 3.5 ve 6.5 dk olarak bulunmuştur. KSSL için yöntemin saptama sınırı 2 ng/mL ve tayin sınırı 11 ng/mL olarak bulunmuştur (Erk, 2003a).

Stenhoff ve ark., (1999) yaptıkları çalışmada KS'nin plazmadan, KSSL'nin plazma ve idrardan, KS ve inaktif metabolitinin plazma ve idrardan miktar tayini için YPSK ile yöntemler geliştirmişlerdir. Bu yöntemlerde sıvı-sıvı ekstraksiyon ve florimetrik detektörle, fenil kolonda ayırım kullanıldığı belirtilmiştir. Hareketli fazın, her analiz için farklı içerikte kullanıldığı ve inaktif metabolit ile KS'nin birbirinden ayırımını sağlayan analizde gradient sistemle ayırımın gerçekleştirildiği belirtilmiştir. Uyarma ve yayma dalga boylarının sırasıyla 265 ve 395 nm olduğu ve analitik kolonun 100 x 4.6 mm boyutlarına ve 3 µm partikül çapına sahip olduğu bildirilmiştir. Bu sistemde alıkonma zamanlarının plazmadan KS için 9 dk, plazma ve idrardan KSSL için 20 dk, plazma ve idrarda inaktif metabolit ve KS için sırasıyla 10 ve 18 dk olduğu bildirilmiştir. Yöntemin plazmadaki tayin sınırının KSSL için 5 nM, KS için 1 nM ve inaktif metabolit için 3 nM olduğu belirtilmiştir.

YPSK ile yapılan bir başka çalışmada losartan, irbesartan, valsartan, KSSL ve metaboliti olan KS'nin plazmadan florimetrik detektörle tayini gerçekleştirilmiştir. Stok ARA II çözeltileri, 1 mg/mL olacak şekilde metanolde ve asetonitrilde ayrı ayrı çözülmüştür. Detektör, uyarma dalga boyu olarak 250 nm ve yayma dalga boyu olarak 375 nm'ye ayarlanmıştır. C₈ kolonla, katı faz ekstraksiyonu yapıldıktan sonra azot buharıyla uçurma işlemi gerçekleştirilmiştir. Koruyucu kolon olarak 20 x 3.9 mm boyutlarında, 4 µm partikül çapında C₁₈ kolon kullanılırken, analitik kolon olarak da 300 x 3.9 mm boyutlarında, 10 µm partikül boyutunda C₁₈ kolon kullanılmıştır. Hareketli faz olarak asetonitril ve 5 mM sodyum asetat çözeltilerinin pH 4'teki karışımları gradient bir sistemle uygulanmıştır. Bu koşullarda KSSL'nin 22.6 dakikada ve KS'nin 9.7 dakikada alıkonulduğu görülmüştür. Tayin sınırı KSSL için 3.3 ng/mL, KS için ise 3.2 ng/mL olarak bulunmuştur (González ve ark., 2002).

Yine YPSK'ye bağlı floresans detektörle yapılan bir çalışmada KSSL ve iki metabolitinin insan serum ve idrarda tayini gerçekleştirilmiştir. KSSL için uyarma dalga boyu 270 nm ve yayma dalga boyu 390 nm olarak belirlenmiş, metabolitler için ise uyarma dalga boyu 260 nm ve yayma dalga boyu 395 nm olarak seçilmiştir. Ayırım 5 µm partikül çapına sahip, 150 x 4.6 mm boyutlarında, okta desil silan (ODS) kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. KSSL ve metabolitleri için, hareketli faz sistemi olarak KH₂PO₄ ve asetonitrilin farklı karışımları kullanılmış ve ayrı ayrı analizleri yapılmıştır. Bu yöntemle analizler, serum için 20 dk, idrar için ise 25 dk sürmüştür. Yöntemin tayin sınırı serumda KSSL, KS ve inaktif metabolit için 0.5 ng/mL olarak, idrarda ise sırasıyla 0.5, 10 ve 10 ng/mL olarak bulunmuştur. Çalışmada ayrıca maddeler için detaylı bir kararlılık çalışması yapılmıştır. Üç madde de metanolde çözülerek +4 °C'ta 3 ay süreyle kararlı bulunmuştur. Bunların oda sıcaklığında da 24 saat süreyle kararlı oldukları gözlenmiştir (Miyabayashi ve ark., 1996).

İdrar ve serumdan KSSL ve metabolitlerinin tayini için geliştirilen bir başka YPSK yönteminde, deteksiyon KSSL ve KS için UV detektör kullanılarak, inaktif metabolit için ise floresans detektör kullanılarak gerçekleştirilmiştir. KSSL tamamen KS'ye çevrildiği için idrarda saptanamamış ve serumda tayini 229 nm'de gerçekleştirilmiştir. KS'nin serumdaki tayini için 210 nm, idrardaki tayini için 229 nm kullanılmıştır. İnaktif metabolitin hem idrar hem de serumdan tayini

için uyarma dalga boyu olarak 285 nm ve yayma dalga boyu olarak da 395 nm kullanılmıştır. YPSK ile analizden önce maddelerin serum ve idrardan ekstraksiyonu için çeşitli prosedürler uygulanmıştır. Çalışmada standart maddeler metanolde çözülerek +4 °C'ta, kalite kontrol örnekleri ise -20 °C'ta saklanmıştır. KSSL'nin serumdaki, KS'nin ise idrar ve serumdaki kalite kontrol örnekleri için detaylı bir kararlılık incelemesi yapılmıştır. Bu yöntemle, 0.5 mL serumda tayin sınırı, KSSL için 2 ng/mL, KS için 0.8 ng/mL ve inaktif metabolit için 0.5 ng/mL olarak bulunmuştur. İdrar örnekleri için saptama sınırı ise hem KS hem de inaktif metabolit için 10 ng/mL olarak bulunmuştur (Lee ve ark., 1995).

Cagigal ve ark., (2001) yaptıkları çalışmada KSSL, KS, KS'nin inaktif metaboliti, losartan, irbesartan, valsartan ve telmisartanın pKa'larını spektrofotometrik yöntemle tayin etmişlerdir. Tayinin yapılabilmesi için belirtilen ARA II'lerin metanolde çözüldüğü ve yapılarındaki bifenil, imidazol ve benzimidazol gruplarının onlara floresans verici özellik kazandırdığı belirtilmiştir. Yöntemin optimizasyonundan sonra KSSL ve KS için uyarma dalga boylarının sırasıyla 272 nm ve 259 nm olarak, yayma dalga boylarının da 384 nm ve 392 nm olarak bulunduğu belirtilmiştir. Rölatif floresans yoğunluğundan hareketle hesaplanan pKa değerlerinin, iyonik şiddetin 0.5 M olduğu koşullarda, KSSL için 6.0 ± 0.1 ve KS için 3.9 ± 0.1 olarak bulunduğu bildirilmiştir.

KSSL ve hidroklorotiyazidin miktar tayini için geliştirilen bir başka yöntemde ise spektrofotometri kullanılarak geliştirilen yöntem, maddeleri birlikte içeren tabletlere uygulanmıştır. Çalışmada her iki madde de 0.1 N HCl çözeltisinde çözülmüş ve 0. derece absorpsiyon spektrumunda KSSL için maksimum absorbans veren dalga boyu 255 nm olarak belirlenmiştir (Erk, 2003b).

Aseklofenak ve DIC'in plazmadan tayini için *N*-metil-D-glukamin kullanılarak kapiler zon elektroforetik bir yöntem geliştirilmiştir. Diyot dizisi detektör, 290 nm'ye ayarlanmış ve örnekler 30 kV potansiyel altında analiz edilmiştir. Yöntemde 75 µm iç çapa sahip, 40 cm toplam, 30 cm efektif uzunlukta çıplak silika kullanılmıştır. Çalışmada ayırım pH 8.9, 200 mM *N*-metil-D-glukamin içeren 300 mM sodyum borat tamponu ile gerçekleştirilmiştir. *N*-metil-D-glukamin eklenmesiyle daha uzun göç zamanları gözlenmesine rağmen verimlilik, resolüsyon ve pik asimetrisi gelişmiştir. Bu koşullar altında DIC, 3.075 dk göç zamanına sahiptir. Her iki madde için de yöntemin saptama sınırı ve tayin sınırı sırasıyla 0.03 mg/L ve 0.1 mg/L olarak bulunmuştur. (Zinellu ve ark., 2005).

DIC'in elektrokimyasal detektör kullanılarak kapiler zon elektroforetik ayırımının gerçekleştirildiği bir çalışmada, DIC'in suda çözülmesi tercih edilmiştir. Ayırım 10 kV potansiyel altında, NaH₂PO₄ ve disodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄) tamponlarının pH 7.0'deki karışımları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yöntemde 25 µm iç çapa sahip, 30.5 cm uzunlukta çıplak silika kullanılmıştır. Bu koşullar altında analiz 8 dakikadan daha kısa sürmüştür. Yöntemin saptama sınırı 5.2 fmol olarak bulunmuş ve geliştirilen yöntem DIC'in idrardan tayinine uygulanmıştır (Jin ve Zhang, 2000).

DIC ve naproksenin YPSK'ye bağlı floresans detektör ile gerçekleştirilen bir analizinde 5 µm partikül çapına sahip, 150 x 1 mm boyutlarında C₁₈ kolonda

ayırım gerçekleştirilmiştir. DIC ve naproksen için çözücü sistemi % 20 (h/h) asetonitril olarak belirlenmiştir. Çalışmada hareketli faz olarak asetik asit:asetonitril (600:400) karışımı pH'ı sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi ile 4'e ayarlanarak kullanılmıştır. Floresans detektör DIC için uyarma dalga boyu olarak 292 nm'ye ve yayma dalga boyu olarak 355 nm'ye ayarlanmıştır. Bu koşullarda DIC 8.9 dakika (dk) alıkonma zamanına sahiptir. Geliştirilen yöntem maddelerin farmasötik preparatlarına ve DIC'in bozunma ürünlerinin tayini için uygulanmıştır. DIC için yöntemin saptama sınırı 0.2 µg/mL olarak bulunmuştur (Baeyens ve ark., 1995).

Kısa süreli ranitidin kullanımının DIC'in farmakokinetiği üzerine etkisini inceleyen bir çalışmada, DIC analizi YPSK'ye bağlı floresans detektör ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma koşulları; hareketli faz olarak asetonitril:% 0.1 trifloro asetik asit (suda) (53:47, h/h) ve 3.5 µm partikül çapına sahip, 75 x 4.6 mm boyutlarında C₁₈ kolon olarak belirlenmiştir. Floresans detektör uyarma dalga boyu olarak 294 nm'ye ve yayma dalga boyu olarak 390 nm'ye ayarlanarak kullanılmıştır. Geliştirilen yöntem, yalnız DIC ve DIC'le birlikte ranitidin alan sağlıklı bayan gönüllülerden alınan plazma örneklerine uygulanmıştır (Leucuta ve ark., 2004).

Kandesartan Sileksetil ve Kandesartan Farmakolojisi

KSSL, ARA II etkinliği nedeniyle hipertansiyon tedavisinde kullanılan yeni ajanlardan biri olan KS'nin ön ilacıdır (Gleiter ve Mörike, 2002).

Kandesartan sileksetil ve kandesartanın farmakokinetik özellikleri

KSSL'nin, 4-16 mg arasında artan dozlarda verilmesiyle, KS'nin pik plazma konsantrasyonlarına 3-5 saat arasında ulaştığı gözlenmiştir. KSSL, iyi bir absorpsiyona sahiptir. İlaç yüksek oranda (≥% 99) plazma proteinlerine bağlanır. İntravenöz uygulamadan sonra ise düşük dağılım hacmine sahiptir (0.13 L/kg). KS, büyük ölçüde değişmeden atılırken, küçük bir kısmı karaciğerde CYP 2C9 enzimi ile inaktif bir metabolit olan CV-15959'a dönüştürülür. KS, CYP sistemi ile metabolize edildiğinden, bu enzimlerle metabolize olan ilaçlarla etkileşime girebilir veya bu izoenzimlerin aktivitesini değiştirebilir. İlacın eliminasyon yarı ömrü ise 9-13 saat arasındadır (Easthope ve Jarvis, 2002). Gruptaki diğer ilaçlardan farklı olarak KS, hem renal hem de safra yolu ile elimine edilir ve yaklaşık % 60'ı idrarla, % 40'ı ise feçesle atılır (Hoogkamer ve ark., 1998; Oparil, 2000).

Kandesartan sileksetil ve kandesartanın antihipertansif etkisinin özellikleri

ARA II'ler, anjiyotensin II tip 1 (AT₁) reseptörlerini antagonize ederek, anjiyotensin II'ye bağlı damar kasılmasını, renal tübüler sodyum geri emilimini, aldosteron ve vazopressin salgılanmasını, noradrenaline bağlı sinirsel iletimi ve santral sinir sisteminin sempatik cevabını, kan basıncı ve sıvı-elektrolit dengesini düzenleyerek antihipertansif etki gösterir. Losartan, valsartan, irbesartan, telmisartan, eprosartan bu gruba dâhil olan diğer ilaçlardır (Oparil, 2000).

KSSL, gastrointestinal kanaldan geçişi sırasında hidroliz olarak aktif metaboliti olan KS'ye dönüştürülür. KS, AT₁ reseptörlerine seçici ve yarışmalı olarak bağlanarak renin-anjiyotensin sisteminde kilit bir aracı olan anjiyotensin II'nin bu reseptörlere bağlanmasını engeller. Böylelikle, sistolik ve diyastolik kan basıncında belirgin bir azalma gözlenir. Ayrıca yapılan çalışmalarda, hipertansiyonlu hastalarda KS'nin, sol ventrikül büyümesinde gerileme sağladığı gözlenmiştir. KS, diyabetli veya diyabetsiz hipertansiyon hastalarında böbrek fonksiyonları üzerinde olumlu etkiler sağlamıştır (Easthope ve Jarvis, 2002).

Renin-anjiyotensin sistemini etkileyen, hipertansiyon ve kalp yetmezliği tedavisinde kullanılan diğer bir ilaç grubu anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörleridir. Fakat ARA II'ler; anjiyotensin II'nin dolaşım ve dokudaki etkilerini, AT₁ reseptörleri düzeyinde artan bir seçicilikle bloke ederek, renin-anjiyotensin sistemini ADE inhibitörlerine oranla, daha seçici bir yaklaşımla düzenler. ADE inhibitörleri anjiyotensin II düzeyini azaltırken bradikinin düzeyini arttırır. Çünkü ADE, anjiyotensin I'in anjiyotensin II'ye dönüşümünü sağlamakla birlikte damar gevşetici bir madde olan bradikininin metabolize olmasından da sorumludur. ADE inhibitörlerinin kullanımına bağlı olarak artan bradikinin düzeyi, akciğerde bradikinin birikimi sonucu kuru öksürük gelişimine yol açtığı için, bu ilaçların kullanımını kısıtlamaktadır. Ayrıca bu ilaçlar, anjiyotensin II oluşumunu engelleyerek, diğer anjiyotensin reseptörü olan anjiyotensin II tip 2 (AT₂)'ye bağımlı antiproliferatif ve damar gevşetici etkiler gibi faydalı etkilerin de ortadan kalkmasına neden olur. Bu nedenlerle AT₁ reseptör antagonistleri, hipertansiyon tedavisinde daha etkili bir yaklaşım ile yerini almış ve günümüzde ADE inhibitörlerine tercih edilmektedirler (Gavras, 2000; Gleiter ve Mörike, 2002; Song ve White, 2000).

***In Vitro* İlaç Metabolizma İncelemeleri**

İlaç etkileşimleri çalışmaları, ilaç geliştirmenin erken keşif aşamalarında planlanmalıdır. *In vivo* çalışmalar, *in vitro* çalışmaların bulgularına göre yapılmalıdır. *In vitro* çalışmalarda negatif bulgular, ilgili *in vivo* çalışmaların elenmesine yardım edebilir. Uygun substrat ve inhibitörlerin kullanılması, ilaç etkileşimleri çalışmalarının sonuçlarının yorumlanmasına yardımcı olabilir. *In vitro* çalışmalarda, bilimsel kuruluşlar tarafından üzerinde ortak görüşe varılmış, tercih edilen substratların kullanılması önemlidir (Zhang ve ark., 2008).

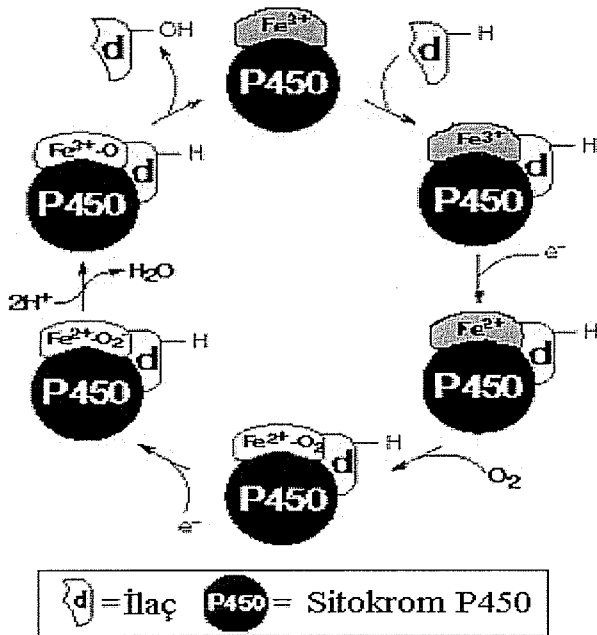
Klinik öncesinde metabolizma çalışmaları için *in vitro* pek çok yaklaşım bulunmaktadır. Bu çalışmalarda enzim kaynakları, karaciğer mikrozomları, hepatositler, hücre dizileri, karaciğer kesitleri veya teker teker belirlenmiş tamamlayıcı deoksiribo nükleik asit (cDNA) enzimleri olabilir. Karaciğer mikrozomları, subseleler organellerin çeşitli yüksek hızlarda santrifüjlenmesi ile elde edilir. Bu şekilde elde edilen bir mikrozom fraksiyonu, CYP enzimlerinin tamamını içerir. Mikrozomların hazırlanması görece olarak kolaydır ve gereken koşullarda saklanmış ise enzimatik aktiviteleri, uzun süre kararlı kalır (Taavitsainen, 2001).

Sitokrom P450 enzim sistemi

Karaciğerde oksidasyon yapan mikrozomal enzimler, tamamıyla aydınlatılmamış bir grup enzimden oluşur. Bunlar CYP enzimleri diye adlandırılırlar; karma fonksiyonlu oksidazlar veya monooksijenazlar adını da alırlar. Söz konusu oksidaz sisteminin, P450 sitokrom oksidaz sistemi yanında onunla eşgüdümlü olarak çalışan diğer bir temel ögesi indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid 2'-fosfat (NADPH)-CYP redüktaz sistemidir. Endoplazmik retikulum membranının iki tabakalı lipit fazında, bu iki ögeden ilkinin yaklaşık 10 molekülüne karşı ikincinin bir molekülü bulunur (Kayaalp, 2005).

CYP enzimleri, ilaçlardan ve diğer ksenobiyotiklerden başka, steroidler, yağ asitleri, safra asitleri, prostaglandinler ve biyojenik aminler gibi endojen maddelerin ve bunlardan bazılarının prekürsörlerinin oksidatif metabolizmasında ve biyosentezinde rol oynarlar (Kayaalp, 2005).

CYP enzimleri 300'den fazla amino asit rezidüsü içeren hem'li peptitler (hemoproteinler)'dir. Enzimin aktif noktası demir iyonudur. Bu nokta oksitlenmiş (Fe^{+3}) durumda iken substratı bağlar, böylece enzim substrat ile kompleks yapar. Bundan sonra NADPH-CYP redüktaz enzimi aracılığı ile NADPH'tan çıkan bir elektron, enzim-substrat kompleksine transfer edilir. Böylece kompleks indirgenir (Fe^{+3} , Fe^{+2} haline geçer). İndirgenmiş enzim-substrat kompleksi moleküler oksijenle birleşir ve bunun ardından ikinci bir elektronun transferi ile kompleks daha da indirgenir. İkinci elektron büyük bir olasılıkla sitokrom b5 üzerinden indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) tarafından verilir ve bu olayı NADH-sitokrom b5 redüktaz enzimi katalize eder. Sonuçta, enzim-substrat-oksijen kompleksi; su, oksitlenmiş substrat ve oksitlenmiş durumdaki serbest CYP enzimine ayrışır (Kayaalp, 2005).



Şekil 9. Bir İlacın Sitokrom P450 Enzim Sistemi Tarafından Oksidasyonu

CYP enzimleri çok sayıda enzimden ve onların izoenzimlerinden oluşan geniş bir enzim süperfamilyasıdır. CYP enzimleri, iletişimin standardizasyonu için özel bir nomenklatura göre adlandırılırlar. Bu adlandırmada CYP, sitokrom P450'i ifade eder, ondan sonra gelen sayı familya numarasını gösterir ve bunu izleyen harf alt familyayı belirler. Daha sonraki sayı ise bu alt familya içindeki enzimlerin numarasını yani bireysel enzimleri gösterir. Bazı familyalarda ise tek bir üye bulunduğu için familya numarasından sonra başka bir açıklayıcı işaret bulunmaz (Kayaalp, 2005; http-13).

CYP enzimleri ilaçların metabolizmasına olan katkıları bakımından değerlendirildiğinde 5 üyesi çok önemlidir. Bunlardan CYP 3A4 ilaçların % 50-55'inin, CYP 2D6 % 25'inin ve CYP 2C grubu (CYP 2C8, 9, 10, 18, 19) % 15'inin ve CYP 1A2 ve CYP 2E1 toplam % 5'e yakın bir bölümünün oksidasyonuna katkıda bulunur (Kayaalp, 2005). CYP 2C9, CYP 2C ailesinin en büyük izoformudur. CYP 2C9'un karaciğerdeki oranı yaklaşık % 20'dir. Substratları ve oluşan reaksiyonlar sırasıyla tolbutamidin metil hidroksilasyonu, DIC'in hidroksilasyonu ve S-varfarinin 7-hidroksilasyonudur. Selektif inhibitörü sülfafenazoldür (Taavitsainen, 2001).

CYP'ler karaciğerde değişik miktarlarda bulunurlar. Bu durum farklı enzimlerle yıkılan ilaçların metabolizma hızının farklı olmasına yol açan faktörlerden birini oluşturur. Belirli bir CYP enziminin karaciğerdeki miktarı, kişinin diyetine, maruz kaldığı çevresel etkenlere, cinsiyetine ve beslenme durumuna göre bireyler arasında bazen fazla olmak üzere değişir. Ayrıca bireyler arasında enzim miktarı ve etkinliği bakımından genetik polimorfizme bağlı değişkenlik de vardır (Kayaalp, 2005; http-13).

CYP enzimleri sadece karaciğerde değil, diğer birçok organ ve dokuda da bulunurlar. Memelilerde bulunduğu gösterilen 10 familyadan 8'indeki enzimler, hücrelerin pürüzsüz endoplazmik retikulumu üzerinde yerleşmiştir. Karaciğer dokusu, homojenize edilirken retikulum membranı parçalanarak mikrozomlar denilen, mikroskobik küreciklere dönüşür. Karaciğerde, söz konusu enzimler özellikle sentrilobüler bölgedeki karaciğer hücrelerinde yoğun olarak bulunurlar (Kayaalp, 2005).

Mikrozomal enzimlerin indüklenmesi, mikrozomal bir enzimin substratı olan bir madde tarafından, bu enzimin ve çoğu kez benzer enzimlerin sentezinin artırılması ya da yıkımının yavaşlatılması sonucu enzimin dokudaki miktarının, dolayısıyla etkinliğinin arttırılması olayıdır. CYP enzimlerinin kimyasal etkenler tarafından indüklenebilirlikleri farklıdır. Enzim indüklenmesinin pratik önemi, artmış olan enzim etkinliği sonucu, bu enzimler tarafından inaktive edilen ilaçların vücutta yıkımının artması ve etkinliğinin azaltılmasıdır (Kayaalp, 2005; http-13).

Mikrozomal enzimlerin çeşitli maddelerle inhibisyon kalıpları da fark gösterir. Enzim inhibisyonunun çeşitli mekanizmaları vardır. Bunların farmakolojide sık görülen biri, aynı enzimle metabolize edilen ilaçların enzimin aktif noktasına karşı yarışmaya girmeleridir. Bu noktaya afinitesi fazla olan ilaç, az olanın metabolize edilmesini engeller (kompetitif inhibisyon). Bazı ilaçlar ise substratı oldukları

enzimleri non-kompetitif şekilde inhibe edebilirler. Biyotransformasyonu inhibe edilen ilacın konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak farmakolojik etkileri uzar ve ilacın neden olduğu toksik reaksiyonlarda artış görülür (Kayaalp, 2005; http-13).

Karaciğer mikrozomlarının hazırlanması

Karaciğer hücrelerindeki enzimlerin önemli bir bölümü enzimatik çalışmalar için karaciğer dokusu homojenize edilirken mikrozomlar içine geçerler. Hücre membranı, sitoplazma ve mitokondrielerde de çeşitli enzimler bulunursa da bunlar bir çok ilacın metabolizmasında mikrozomal enzimler kadar rol oynamazlar (Kayaalp, 2005).

Canlı bir hücrede mikrozom bulunmaz. Bunlar homojenizasyon sırasında hücrenin endoplazmik retikulum membranının parçalanması ve kürecikler sekline geçmesi sonucu oluşur. Genellikle şöyle elde edilirler:

Karaciğer hücreleri homojenize edilir ve homojenat 30 dk süre ile 9000-12000 x g hızında santrifüj edilerek çekirdek, mitokondri ve kaba membran parçacıkları çöktürülür ve atılır. Süpernatant ayrılır ve 105000 x g'de 1 saat santrifüj edilir. Dipte çöken kısım, karaciğer hücrelerinin mikrozomlarını veya daha doğru bir deyimle mikrozomal fraksiyonunu oluşturur. Mikrozomlarla *in vitro* ilaç metabolizması incelemeleri yapılabilir (Tata, 1972; Lewis ve Tata, 1973; Hook ve ark., 1972; Kayaalp, 2005).

In vitro ilaç metabolizma incelemelerinde genel yaklaşımlar

Ortak deneysel yaklaşımlara göre, deney koşulları ile ilgili izlenebilecek yollar şöyle özetlenebilir. Tampon olarak 2-amino-2-hidroksi metil-propan-1,3-diol (TRIS)-HCl veya potasyum fosfat kullanılabilir ve ayrıca ortamda NADPH oluşturmak için bir sisteme gereksinim vardır. Bu sistemde NADPH derişimi en az 1 mM düzeyinde olmalıdır. Enzim kaynakları çok çeşitli olabilir. Substrat derişimi ve reaksiyon karışımında bulunması gereken bileşenlerin belirlenmesi de son derece önemlidir. Genel bir kural olarak tüm inkübasyonlarda, organik çözücü düzeyi olabildiğince düşük tutulmalıdır. Bu tür çözücülerden en çok kullanılan dimetil sülfoksit ve metanol (veya asetonitril) sırasıyla % 0.2 ve 2'ye eşit veya mümkünse daha az düzeylerde olmalıdır. Tek bir zamanda örnek toplanmasıyla yapılan çalışmalarda, standart sapmaların hesaplanabilmesi için örnekler 3 tekrarlı uygulanmalıdır. Beş veya altı farklı zamanda örnek toplanmasıyla yapılan çalışmalarda ise, örneklerin 2 tekrarlı hazırlanması yeterlidir. Genel olarak mikrozomal protein oranı 0.2 – 4.0 mg/mL aralığında olabilir. Reaksiyon süresi olarak da 0-90 dk aralığı seçilebilir (Zhang ve ark., 2008).

Dondurma, eritme ve saklama koşullarının incelendiği bir çalışmada, insan karaciğer örneklerinin, -80 °C'ta, 5 yıl boyunca bekletmenin, bu örneklerin mikrozomal içerikleri ve CYP enzimlerinin aktiviteleri üzerinde değişmeye neden olmadığı bulunmuştur. Ancak örnekler çözülüp, 6 saat boyunca, 25 °C'ta bekletilip, tekrar -80 °C'ta dondurulduktan bir hafta sonra mikrozomal CYP enzim düzeylerinin azaldığı ve aktivitelerinin % 90 oranında düştüğü görülmüştür (Yamazaki ve ark., 1997).

In vitro çalışmalarda sıklıkla kullanılan organik çözücülerden metanol, asetonitril ve dimetil sülfoksitin, insan karaciğer mikrozomları kullanılarak, çeşitli substratların CYP'lerle metabolizması üzerine etkilerini inceleyen bir çalışmada, CYP 2C9 için tolbutamid hidroksilasyonu seçilmiştir. Çalışmada dimetil sülfoksitin düşük derişimlerde (% 0.2) bile pek çok reaksiyonu inhibe ettiği bulunmuştur. Bu organik çözücülerin % 0.2 düzeyindeki varlığı, tolbutamid reaksiyonunu etkilememiştir. Metanol ve dimetil sülfoksit oranı % 0.5 ve üzeri olduğu zaman, CYP 2C9 aktivitesinin inhibe edildiği görülmüştür. Asetonitrilin % 1 düzeyine kadar CYP 2C9 aktivitesi üzerine etkisi olmadığı, fakat % 5 oranında iken aktiviteyi arttırdığı gözlenmiştir. Bundan emin olmak için aynı çalışma CYP 2C9'un başka bir substratı olan DIC ile yapılmış ve % 5 asetonitril düzeyinde CYP 2C9 aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. Çalışma sonucuna göre, % 5 düzeyinde organik çözücü kullanılması, pek çok CYP enzim aktivitesini inhibe etmektedir. Dimetil sülfoksit çok düşük oranlarda bile CYP aktivitelerini inhibe ettiği için tercih edilmemelidir. Genel olarak asetonitril ve metanol daha iyi sonuçlar vermektedir ancak, bu çözücüler de % 1 dolayında kullanılmalıdır. Ayrıca gözlenen etkiler, inkübasyonlardaki protein içeriği gibi deneysel koşullarla değişebileceği için, organik çözücüler mümkün olan en düşük oranda kullanılmalıdır (Chauret ve ark., 1998).

Asetonitrilin, CYP 2C9 tarafından katalizlenen dört reaksiyon üzerindeki etkilerini, insan karaciğer mikrozomları ve rekombinant CYP 2C9 kullanarak inceleyen bir çalışmada, CYP 2C9'un dört farklı substratı seçilmiştir. Bu substratlar ve reaksiyonları DIC hidroksilasyonu, tolbutamid metil hidroksilasyonu, fenitoin hidroksilasyonu ve selekoksib metil hidroksilasyonudur. Substratları çözmek için % 50 (h/h) asetonitril çözeltisi kullanılmıştır. Çalışmada DIC, tolbutamid ve selekoksibin metabolizmalarını incelemek için aynı inkübasyon prosedürü uygulanmıştır. 0.5 mL son hacme sahip inkübasyon karışımı, 0.1 M potasyum fosfat tamponu, NADPH rejenerasyon sistemi, 0.1 - 0.5 mg/mL arasında mikrozomal protein ve % 0 - 5 (h/h) aralığında asetonitril ile hazırlanmıştır. Ön inkübasyon süresi 37 °C'ta 3 dk olarak belirlenmiştir. Reaksiyonun durdurulması 2 mL asetonitril ile gerçekleştirilmiştir. Gerekli santrifüj işlemlerinden sonra YPSK ile DIC, selekoksib ve tolbutamidin analizleri gerçekleştirilmiştir. DIC ve metaboliti için gradient sistemle 274 nm'de UV deteksiyon kullanılmıştır. Çalışmada sonuç olarak asetonitrilin, DIC ve tolbutamid hidroksilasyonunu aktive ettiği, selekoksib reaksiyonunu inhibe ettiği ve fenitoin metabolizmasını önemsiz derecede etkilediği ortaya çıkarılmıştır (Tang ve ark., 2000).

ARA II'lerin (sartanlar) çoğu feçes ya da idrar yolu ile atılır ve küçük bir oranı metabolize olur. Metabolizma düzeyindeki etkileşmeler bu nedenle klinik açıdan önemsizdir. Ancak, bir sartanın herhangi bir ilaç metabolize eden enzime yüksek afinitesi varsa, bu durumda o enzimle metabolize olan başka bir ilacın metabolizmasını etkiler. Bu çalışmada losartan, irbesartan, KS, eprosartan ve valsartanın CYP enzimleriyle insan karaciğer mikrozomlarındaki potansiyel etkileşmeleri incelenmiştir. Çalışmada CYP 2C9 için referans inhibitör olarak sülfafenazol kullanılmıştır. Sülfafenazolün 1 µM düzeyinde inhibe ettiği tolbutamid metil hidroksilasyonu reaksiyonunu, KS, 600 µM düzeyinde inhibe

etmiştir. Çalışmadaki en önemli bulgu, incelenen sartanların, insan karaciğer CYP enzimlerine, referans inhibitörlere oranla, daha düşük afinite göstermeleridir. Maddenin bir enzime yüksek afinite göstermesi, mutlaka o enzim tarafından metabolik dönüşüme uğratılacağı veya düşük afinite göstermesi ise maddenin o enzimle metabolize olmayacağı anlamına gelmez. Sartanların metabolizması ve bu çalışmadaki ortak görüş, CYP enzimlerinin, sartanların metabolizması ve etkileşmelerinde, rolünün sınırlı olduğudur. Ancak yine de, *in vivo* ortamda, sartanlar, uygun CYP enzimlerinin aktif bölgelerinde, yeterli derecede yüksek derişimlere ulaşırlarsa, bu enzimler tarafından metabolize edilen maddeler ile anlamlı farmakokinetik etkileşmeler gösterebilirler (Taavitsainen ve ark., 2000).

Esas olarak hepatik biyotransformasyona uğrayan DIC'in, yalnız % 1'i direkt olarak atılır. DIC'in ana metaboliti 4'-hidroksi-DIC, ikincil metabolitleri ise 3'-hidroksi-DIC ile 5-hidroksi-DIC'tir. Hepatositler, karaciğer mikrozomları ve rekombinant CYP'lerle yapılan *in vitro* çalışmalar, CYP 2C9'un 4'-hidroksi-DIC ve 3'-hidroksi-DIC oluşumunu tek başına katalizlediğini ve 5-hidroksi-DIC oluşumunun diğer izoformlar tarafından sağlandığını göstermiştir (Konečný ve ark., 2007).

Yapılan başka bir *in vitro* metabolizma çalışmasında CYP 2C8, CYP 2C19, CYP 2C18, CYP 2B6 izoformlarının DIC metabolizmasında yer alan minör oksidatif yollardan sorumlu olduğu belirlenmiştir. Çalışmada 75 mM TRIS-HCl (pH 7.4) içeren inkübasyon ortamına 1.2 mM NADPH eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Kontrol örnekleri NADPH'sız ve mikrozomsuz olacak şekilde hazırlanmıştır. Reaksiyonunun durdurulması 1 mL asetonitril ile sağlanmıştır. Bu çalışmada DIC ve metabolitlerinin analizi için kütle spektrometresi ve UV detektörle tayin gerçekleştirilecek şekilde iki YPSK yöntemi geliştirilmiştir. Analizin 35 dk sürdüğü çalışmada DIC 30. dakikada belirmiştir (Bort ve ark., 1999).

Bir başka çalışmada *in vitro* metabolizma verilerinden yararlanılarak DIC'in klerensi öngörülme çalışılmıştır. Burada açıl glukuronidasyonu ile açıl glukuronidin seküental metabolizmasının rolü incelenmiştir. Bu çalışma için sıçan, köpek ve insandan elde edilen mikrozomlar kullanılarak birbiriyle karşılaştırılmıştır. DIC çözeltisi asetonitrilde hazırlandıktan sonra, sıvı kromatografisine bağlı kütle spektrometresi/kütle spektrometresi sistemi ile analiz edilmiştir. Analiz ters faz, fenil kolonla ve gradient sistemle gerçekleştirilmiş ve DIC'in alıkonma zamanı 2.3 dk olarak gözlenmiştir. Tüm mikrozomal inkübasyonlar 0.2 mL hacimde, 37 °C'ta ve 100 mM pH 7.4 potasyum fosfat tamponunda yürütülmüştür. Çalışmada 4'-hidroksi-DIC oluşumu için insan ve sıçan mikrozomlarında 100 µg/mL mikrozomal protein derişimi ve 10 dk inkübasyon süresi kullanılmıştır. Köpek mikrozomlarında 4'-hidroksi-DIC oluşumu daha yavaş olduğu için daha uzun bir inkübasyon süresi ve daha derişik mikrozomal protein kullanılmıştır. 0.2 mL inkübasyon hacmi için, reaksiyon % 3 formik asit içeren 400 µL asetonitril ile durdurulmuştur (Kumar ve ark., 2002).

Mefenitoin ve metadonun şiral metabolizması için geliştirilen miselsi elektrokinetik kapiler kromatografik yöntemde CYP 2C9 substratı olarak DIC seçilmiştir. Çalışmada DIC çözeltisi suda çözülerek hazırlanmıştır. CYP 2C9'un mikrozomal inkübasyonunda tampon olarak 100 mM TRIS (pH 7.5)

kullanılmıştır. Kapiler elektroforetik analizde çalışma tamponu olarak 20 mM disodyum tetraborat (pH 9.2) kullanılmıştır. Sıvı-sıvı ekstraksiyonundan sonra 200 nm'de analiz edilen örnekte, DIC'in 4.5 dk ve 4-hidroksi-DIC'in 6.2 dk geç zamanına sahip olduğu görülmüştür (Prost ve Thormann, 2003).

KE'nin, CYP 2C9'un enzimatik aktivitesinin tayini için uygulanabilirliğini gösteren bir çalışmada substrat olarak DIC kullanılmıştır. Çalışmada KE yöntemlerinden miselsi elektrokinetik kapiler kromatografi kullanılmış ve misel oluşturucu ajan olarak SDS eklenmiştir (Konečný ve ark., 2007).

Polimorfik özellik gösteren CYP 2C9, insan karaciğerindeki en önemli izoformlardan birisidir. Tüm insan karaciğer CYP enzimlerinin yaklaşık % 20'sini oluştururlar ve terapötik olarak önemli olan ilaçların yaklaşık % 10'unu metabolize ederler. CYP 2C9'un en belirgin aktiviteleri tolbutamid 4-hidroksilasyonu, (S)-varfarin 7-hidroksilasyonu ve DIC 4-hidroksilasyonudur. Bu çalışmada reaksiyon olarak DIC 4-hidroksilasyonunun seçilmesinin nedeni, tolbutamid metabolizmasına, diğer CYP izoformlarının da etki etmesi ve (R)-varfarinin CYP 2C9 aktivitesi üzerinde az da olsa inhibitör etkisi nedeniyle, (S)-varfarin 7-hidroksilasyonu reaksiyonu için enantiyomerik olarak saf substrata gereksinim duyulmasıdır (Konečný ve ark., 2007).

Çalışmada DIC stok çözeltisi, metanolde 50 mM derişime sahip olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu stoktan her gün taze olarak, son derişimi 100 veya 500 µM olacak şekilde, tampon çözeltisi ile seyreltmeler yapılmıştır. Tampon olarak 5.1 mM magnezyum klorür (MgCl₂) ve 0.1 M potasyum klorür (KCl) içeren, pH 7.4, 50 mM fosfat tamponu kullanılmıştır. Reaksiyonda ön inkübasyon süresi 37 °C'ta 5 dk olarak belirlenmiştir. Örneklerin toplam hacmi 0.25 veya 0.5 mL olacak şekilde reaksiyon gerçekleştirilmiştir (Konečný ve ark., 2007).

DIC ve 4'-hidroksi-DIC yüklü bileşikler olmalarına karşın, analizleri miselsi elektrokinetik kapiler kromatografi yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bunun nedeni, NADPH rejenerasyon sistemi ve CYP 2C9 enzim preparatını içeren reaksiyon karışımının, cihaza direkt enjeksiyonu olasılığıdır (Konečný ve ark., 2007).

Yöntemin kapiler elektroforetik koşullarının belirlenebilmesi için SDS derişimi, çalışma tamponunun pH'ı, uygulanan potansiyel ve kapiler sıcaklığı parametreleri incelenmiştir. Yöntemin optimum koşulları 50 mM SDS, 20 mM NaH₂PO₄, 20 mM disodyum tetraborat (pH 8.6) içeren çalışma tamponununun 24 kV potansiyel altında ve 25 °C'ta örneklerin uygulanması şeklinde belirlenmiştir. Ayırım 50 µm iç çapa sahip 56.0 cm efektif ve 64.5 cm toplam uzunlukta çıplak silika kapilerde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada UV detektör 200 nm'ye ayarlanarak kullanılmıştır. Bu koşullar altında DIC, 10 dk geç zamanına sahiptir ve toplam analiz süresi 11 dakikadır (Konečný ve ark., 2007).

GEREÇLER

Kullanılan Kimyasal Maddeler

Asetonitril	: Merck, Almanya
Borat	: BDH Chemicals Ltd., İngiltere
DIC	: Sigma, Amerika
EDTA	: Sigma, Amerika
Glasiyel asetik asit	: Merck, Almanya
1-HSA	: J. T. Baker, Hollanda
Karboksi metil selüloz	: Merck, Almanya
KBr	: Merck, Almanya
KH ₂ PO ₄	: Merck, Almanya
KS	: Astra-Zeneca, İsveç
KSSL	: Astra-Zeneca, İsveç
Laktoz	: Merck, Almanya
LNS	: Mustafa Nevzat İlaç Sanayi A.Ş., Türkiye
Magnezyum stearat	: Merck, Almanya
Metanol	: Merck, Almanya
MTP	: Astra Zeneca, İsveç
NADPH	: Sigma, Amerika
NaOH	: Merck, Almanya
Nişasta	: Merck, Almanya
Poli etilen glikol	: Merck, Almanya
Talk	: Merck, Almanya
TRIS	: Sigma, Amerika

Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı	: Arçelik, No Frost&Electronic, Türkiye
Buz Üretme Makinesi	: Kale Kilit A.Ş., Türkiye
C ₈ Kolon	: ACE, 112-1002, İngiltere
C ₁₈ Kolon	: Supelco, LC-18-DB, Amerika
Çalkalamalı Su Banyosu	: Memmert, WB10, Almanya
Erime Derecesi Tayini Cihazı	: Bornstead Electrothermal Engineering Ltd., 9300, İngiltere
Hassas Terazi	: Ohaus, E12140, İsviçre
IR	: Perkin-Elmer Spectrum 2000, Amerika
Kapiler	: Agilent Technologies, Amerika
KE	: Thermo Separation Products, Spectra Phoresis 100, Amerika
UV Detektör	: Shimadzu, SPD-10A, Japonya
Kaydedici (integratör)	: Shimadzu, CR-7A, Japonya
pH Metre	: Electro-mag, M822, Türkiye
Spektrofotometre	: Shimadzu, UV-2401, Japonya
Ultra Derin Dondurucu (-85 °C)	: New Brunswick Scientific Co., U410, Amerika
Ultra Saf Su Cihazı	: Millipore, Amerika
Ultrasonik Banyo	: Ultrasonic, LC30, Almanya
Vorteks Karıştırıcı	: Nuvemix, NM110, Türkiye
YPSK	: LC-10AT Sıvı kromatograf, Hepsi Shimadzu, Japonya RF-10AXL Floresans Detektör FCV-10ALVP Gradient Donanımlı Pompa

Class LC10A Veri İşletim Sistemi

CBM-10A İletişim Modülü

Accura, Pentium 75 Bilgisayar

Enjeksiyon loopu, Rheodyne, Amerika

YÖNTEMLER

Kullanılan Standart Maddelerin Safılıkları

Kullanılan tüm standart maddelerin safılıklarının analizi için erime dereceleri belirlenmiş ve kızıl ötesi (IR) spektrumları alınmıştır.

Erime derecesi tayini

Standart maddelerin erime derecelerinin tayini için, toz haldeki maddeler, bir ucu kapatılmış kapiler bir boru içine doldurulmuş ve erime derecesi tayin cihazında en fazla 300°C'a kadar ısıtılarak erime dereceleri saptanmıştır.

Infra red spektrofotometri

Çalışmada kullanılan standart maddelerin kontrolü için IR spektrumları alınmıştır. KSSL, KS, DIC, MTP ve LNS'nin IR spektrofotometri ile analizleri için, maddeler 1:9 (a/a) potasyum bromür (KBr) ile karıştırılıp diskleri hazırlanmış ve 400-4000 dalga sayısı (cm^{-1}) arasındaki IR spektrumları alınmıştır.

Kullanılan Standart Maddelerin Çözücüleri

Analitik çalışmalarda bir maddenin analizini gerçekleştirebilmek için ilk önce madde için en uygun çözücü ortamının belirlenmesi gerekir. KSSL ve KS'nin, KE ile analiz edilebilmesi için maddeler metanolde çözülerek istenen derişimlere seyreltilmiştir.

Analitik çalışmalarda güvenilirliği arttırabilmek için IS yöntemi kullanılmaktadır. Normal koşullarda, bir çalışma için bir IS kullanılması yeterlidir. Ancak, ilaç etkileşimlerinin incelenmesi aşamasında, incelenen madde ile IS piklerinin aynı zamanlarda gelmesi durumunda, analizi gerçekleştirmek söz konusu olamayacağı için bu çalışmanın başında, iki IS kullanılmasına karar verilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda MTP ve LNS'nin göç zamanlarının uygun olması nedeniyle, IS olarak kullanılmasına karar verilmiştir. Bu maddelerden MTP, % 50 (h/h) metanol sisteminde çözülmüştür. LNS ise suda çözünürlüğü çok, bazik ortamda kararlı olan bir madde olduğu için 0.1 M NaOH'ta çözüldükten sonra % 50 (h/h) metanol içerisinde istenen derişime seyreltilmiştir.

İlaç etkileşimleri deneylerinde kullanılmak üzere CYP 2C9 enziminin standart substratı olan DIC'in de KE ve YPSK ile analiz edilmesi gerektiği için, DIC metanolde çözülerek kullanılmıştır.

Borat, potasyum fosfat, NADPH, TRIS ve etilen diamin tetra asetik asit disodyum tuzu (EDTA) maddelerinin çözeltileri hazırlamak için çözücü olarak su kullanılmıştır.

Ultra Viyole Spektrofotometri

KE yönteminde deteksiyon UV detektörle sağlanacağından kullanılacak dalga boyuna karar verebilmek için KSSL ve KS metanolde çözülerek sırasıyla 2.07×10^{-5} M ve 2.05×10^{-5} M derişimlerde çözeltileri hazırlanmıştır. Benzer çalışma DIC, MTP ve LNS için de yapılmıştır. DIC'in metanolde, MTP'nin % 50 (h/h) metanolde ve LNS'nin 0.1 M NaOH'ta çözüldükten sonra % 50 (h/h) metanol ile seyreltilerek stok çözeltileri hazırlanmıştır. Bu stok çözeltilerden gerekli seyreltmeler yapılarak DIC'in 2.07×10^{-5} M, MTP'nin 2.21×10^{-5} M ve LNS'nin 1.47×10^{-5} M derişimdeki çözeltileri hazırlanmıştır. Belirtilen çözeltilerin hazırlandığı çözücü ortamı kör olarak kullanılmıştır.

Hazırlanan çözeltilerin 200-360 nm'ler arasında spektrumları kaydedilmiştir. Bu spektrumlardan sözü edilen maddelerin en yüksek absorbans verdiği dalga boyları belirlenmiştir.

Kapiler Elektroforez

Bu yöntemde KE'ye bağlı UV detektör ile 214 nm dalga boyunda KSSL ve KS'nin analizi, IS olarak MTP ve LNS'nin kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. DIC'in analizi için ise IS olarak yalnız MTP kullanılmıştır. Yöntemde kapiler olarak 75 µm iç çapa, 363 µm dış çapa sahip çıplak silika, efektif uzunluğu 45.9 cm ve toplam uzunluğu 70 cm olacak şekilde kullanılmıştır.

Kapiler ilk kullanımda 30 dk 1 M NaOH çözeltisi, 10 dk 0.1 M NaOH çözeltisi, 10 dk distile su ve 10 dk çalışma tamponu ile yıkanarak koşullandırılmıştır. KE cihazı her açılışında 10 dk 0.1 M NaOH çözeltisi, 10 dk distile su ve 10 dk çalışma tamponu ile yıkanmış; her kapatılışında ise 10 dk 0.1 M NaOH çözeltisi, 10 dk distile su ile yıkandıktan sonra hava çekilerek bırakılmıştır. Örneklerin analizleri arasında kullanılacak yıkama programı sırasıyla 2 dk 0.1 M NaOH, 2 dk distile su ve 2 dk çalışma tamponu şeklinde belirlenmiştir.

Optimizasyon

KE yönteminin optimizasyonu için incelenmesi gereken analitik parametreler kullanılacak tampon derişimi, pH ve çalışma tamponu bileşimidir. Aletsel parametreler ise uygulanan voltaj ve enjeksiyon süresidir.

Yöntemin optimizasyonu için standart bir örnek hazırlanmış ve tüm incelemelerde bu örnek kullanılmıştır. Bu örnekte KSSL 1.88×10^{-5} M, KS 1.92×10^{-5} M, MTP 2.01×10^{-5} M ve LNS 1.47×10^{-5} M son derişime sahip olacak şekilde hazırlanmıştır. Elde edilen veriler arasında en uygun değere karar verebilmek için göç zamanları, teorik tabaka sayısı (N) ve pik normalizasyon oranı (PNO) değerleri dikkate alınmıştır.

Borat derişimi

Borat derişiminin belirlenebilmesi için sırasıyla 5, 10, 15, 20 ve 25 mM borat derişimlerine sahip tampon çözeltiler hazırlanmıştır. Bu borat tamponlarının pH'ları, 5 N HCl çözeltilisi ile 8.50'ye ayarlanmıştır. Borat tamponları % 10 (h/h) metanol içerecek şekilde çalışma tamponu bileşimi hazırlanmıştır. Enjeksiyon süresi 1 sn ve uygulanan potansiyel 25 kV olarak seçilmiş ve her borat derişimi için standart örneğin 3 enjeksiyonu yapılmıştır.

Pik morfolojileri ve göç zamanları değerlendirilerek uygun borat derişimine karar verilmiştir.

pH

Ortamdaki borat derişimi belirlendikten sonra bu maddeler için en uygun pH'ın belirlenmesi aşamasına geçilmiştir. Bunun için ortam sırasıyla 5 N HCl çözeltilisi ile pH 7.50, 8.00, 8.25, 8.50, 8.75 ve 9.00'a ayarlanmıştır. Her bir pH'ta örnekler, % 10 (h/h) metanol içeren çalışma tamponu içerisinde, 1 sn enjeksiyon süresi ve 25 kV potansiyel uygulanarak analiz edilmiştir. Her pH düzeyi için standart örnek 3 kez analiz edilmiştir.

Pik morfolojileri ve göç zamanları değerlendirilerek yeterli ayırımın sağlandığı uygun pH seçilmiştir.

Organik çözücü yüzdesi

Maddelerin çözüldüğü sistemin tamamen veya belli bir oranda metanol içermesi nedeniyle çalışma tamponu içeriğinde de belli bir miktar metanol bulunması öngörülmüştür. Bunun için sırasıyla % 5.0, 7.5, 10.0, 12.5 ve 15.0 (h/h) düzeyinde metanol içeren çalışma tamponları hazırlanmıştır. 1 sn enjeksiyon süresi ve 25 kV potansiyel altında standart örnek, her metanol içeriği için 3 kez sisteme enjekte edilmiştir.

Organik çözücü olarak % 5 (h/h) oranında asetonitril içeren çalışma tamponu ile de 1 sn enjeksiyon süresi ve 25 kV potansiyel altında standart örnek, 3 kez analiz edilmiştir.

Uygun göç zamanlarının ve pik morfolojilerinin elde edildiği organik çözücü yüzdesi seçilmiştir.

Uygulanan potansiyel

Analitik parametrelerin belirlenmesinden sonra aletsel parametrelerin incelenmesi aşamasına geçilmiştir. Bunun için öncelikle uygulanacak olan potansiyel incelenmiştir. Optimum potansiyeli belirlemek için, 20.0, 22.5, 25.0, 27.5 ve 30 kV altında standart örnek 3 kez analiz edilmiştir. Bu sırada enjeksiyon süresi 1 sn olarak seçilmiştir.

Tüm maddelerin analizinin gerçekleştirilebildiği ve uygun göç zamanlarının elde edildiği potansiyel çalışma potansiyeli olarak seçilmiştir.

Enjeksiyon süresi

Enjeksiyon süresi, maddelerin pik alanları ve pik morfolojilerini etkileyen bir parametre olduğu için en uygun enjeksiyon süresini belirlemek amacıyla standart örnek 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 ve 1.4 saniyelik sürelerle sisteme enjekte edilmiştir. Her bir enjeksiyon süresi için standart örneğin 3'er analizi yapılmıştır.

Çalışmada pik alanları ve morfolojileri açısından en uygun enjeksiyon süresi kullanılmıştır.

Sonuçların değerlendirilmesi

Sonuçların değerlendirilebilmesi için maddelerin pik normalizasyonu (PN) değerleri kullanılmıştır. PN değeri, ilgili pikin alanının, göç zamanına bölünmesiyle elde edilmektedir. Maddeye ait PN değeri hesaplandıktan sonra, yöntemde kullanılan IS'nin PN değeri bulunmuştur. Maddenin PN değerinin, IS'nin PN değerine bölünmesiyle elde edilen değer PNO'dur ve bu tez çalışmasındaki tüm analizlerle ilgili istatistiksel değerlendirmeler PNO kullanılarak yapılmıştır.

Validasyon

Optimizasyonu gerçekleştirilen kapiler elektroforetik yöntemin geçerliliğinin gösterilebilmesi amacıyla kararlılık, doğruluk ve kesinlik, doğrusallık, tekrarlanabilirlik, duyarlılık, tutarlılık, sağlamlık ve özgünlük (seçicilik) gibi validasyon parametreleri incelenerek gerekli deneyler gerçekleştirilmiş ve hesaplamalar ICH'ye (2005) göre yapılmıştır. Sistemin uygunluğunu göstermek amacıyla N, ayırım gücü (Rs), kapasite faktörü (k') ve seçicilik faktörü (α) parametreleri hesaplanarak sistem uygunluk testleri yapılmıştır.

Kararlılık

KSSL ve KS'nin kararlılıklarını belirlemek amacıyla metanolde çözülmüş sırasıyla 1.88×10^{-5} M ve 1.92×10^{-5} M derişimdeki standart çözeltileri analiz edilmiştir.

Maddelerin kısa dönem kararlılıkları için alüminyum folyo ile sarılmış halde, 24 saat süreyle oda sıcaklığında ve + 4 °C'de bekletilmiştir. Süre sonunda maddeler 3 kez analiz edilerek sonuçlar Friedman testi ile karşılaştırılmıştır.

Maddelerin uzun dönem kararlılıkları için, standart çözelti, alüminyum folyo ile sarılmış halde, + 4 °C'de 1 ay boyunca bekletilmiş ve belirtilen süre sonunda standart çözelti ile taze hazırlanan standart çözelti 3 kez analiz edilerek sonuçlar Friedman testi ile karşılaştırılmıştır.

Doğrusallık

Yöntemin validasyonu için doğrusal bir bölgede çalışma gerekliliği nedeniyle, doğrusallık incelemesi yapılmıştır. Bunun için KSSL'nin $3.76 \times 10^{-7} - 1.88 \times 10^{-4}$ M ve KS'nin $3.83 \times 10^{-7} - 1.92 \times 10^{-4}$ M derişim aralıklarında, 15 farklı

derişimdeki çözeltileri hazırlanarak sisteme enjekte edilmiştir. Hazırlanan farklı derişimlerdeki çözeltilere IS olarak MTP ve LNS, son derişimleri sırasıyla 2.01×10^{-5} M ve 1.47×10^{-5} M olacak şekilde eklenerek sisteme verilmiştir.

Çalışılabilecek doğrusal aralık belirlendikten sonra KSSL için $1.88 \times 10^{-6} - 9.41 \times 10^{-5}$ M ve KS için $1.91 \times 10^{-6} - 9.58 \times 10^{-5}$ M artan derişim aralıklarında, 6 farklı derişimdeki çözelti, 3 set halinde hazırlanarak kalibrasyon setleri oluşturulmuştur. IS'lerin derişimleri MTP için 2.01×10^{-5} M ve LNS için 1.47×10^{-5} M'dır. Her set 3 farklı günde analiz edilerek kalibrasyon eğrilerine ait regresyon denklemi ve korelasyon katsayıları hesaplanmıştır. KE yöntemine ait kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısının önem kontrolü ve kalibrasyon eğrisinin doğrusallıktan ayrılmış önem kontrolü yapılmıştır.

Tekrarlanabilirlik

Yöntemin kesinliğinin belirlenmesi için 9.58×10^{-6} M KS, 9.41×10^{-6} M KSSL, 2.01×10^{-5} M MTP ve 1.47×10^{-5} M LNS içeren 3 grup çözelti hazırlanmıştır. Bu grupların her biri 3 farklı günde, 6 kez sisteme enjekte edilerek yöntemin tekrarlanabilirliği araştırılmış ve istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır.

Cihazın tekrarlanabilirliğinin araştırılması için 9.58×10^{-6} M KS, 9.41×10^{-6} M KSSL, 2.01×10^{-5} M MTP ve 1.47×10^{-5} M LNS içeren bir çözelti hazırlanarak 10 kez sisteme enjekte edilmiştir. Maddelere ait PNO ve göç zamanı değerleri sonuçlarının birbirine yakınlığı istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Duyarlılık

Kapiler elektroforetik yöntemin duyarlılığının belirlenmesi için, doğrusallık çalışmasında belirlenen derişimler ile oluşturulan kalibrasyon doğrusu kullanılarak LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır (ICH, 2005). Hesaplanan kalibrasyon eğrisinin, artık standart sapması GraphPad Prism 4 for Windows programı ile hesaplanmıştır. LOD ve LOQ değerlerinin bulunması için **Eşitlik 1** ve **Eşitlik 2** kullanılmıştır.

$$\text{LOD} = 3.3 \times \text{Sy.x} / a \quad (\text{Eşitlik 1})$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \text{Sy.x} / a \quad (\text{Eşitlik 2})$$

Burada, LOD: gözlenebilme sınırı; LOQ: alt tayin sınırı; Sy.x: kalibrasyon eğrisinin standart sapması; a: eğim'dir.

Tutarlılık

Geliştirilen yöntemin tutarlılığının araştırılması için 2 farklı analizci tarafından 9.58×10^{-6} M KS, 9.41×10^{-6} M KSSL, 2.01×10^{-5} M MTP ve 1.47×10^{-5} M LNS içeren 6 ayrı çözelti hazırlanarak aynı gün içinde analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar F testi ile karşılaştırılarak aradaki farkın, istatistiksel açıdan önemi kontrol edilmiştir.

Sağlamlık

Yöntemin sağlamlığının araştırılması için, 9.41×10^{-6} M KSSL, 9.58×10^{-6} M KS ile IS olarak 2.01×10^{-5} M MTP ve 1.47×10^{-5} M LNS içeren standart bir çözelti, optimize edilen parametrelerde küçük değişiklikler yapılarak analiz edilmiştir. Her parametre için standart çözelti 3 kez analiz edilmiştir. Parametrelerdeki değişikliklerin, sonuçları ne yönde etkilediği incelenerek Friedman testi ile istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır.

Doğruluk

Yöntemin doğruluğunun incelenmesi amacıyla 9.58×10^{-7} M KS ve 9.41×10^{-7} M KSSL, 9.58×10^{-6} M KS ve 9.41×10^{-6} M KSSL, 9.58×10^{-5} M KS ve 9.41×10^{-5} M KSSL içeren kalite kontrol standart çözeltilerinden her derişim düzeyi için 3'er set hazırlanmıştır. Bu çözeltilere son derişimleri sırasıyla 2.01×10^{-5} M ve 1.47×10^{-5} M olacak şekilde MTP ve LNS eklenmiştir. 3 farklı derişim düzeyinde hazırlanan 3'er set kalite kontrol standart çözeltileri, gün içi ve günler arası olacak şekilde farklı günlerde 6 kez analiz edilerek istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır.

Yöntemin tablet matriksi ortamındaki doğruluğunun belirlenmesi için 8 mg KSSL içeren tabletlere benzeyecek şekilde standart tablet matriks ortamı hazırlanmıştır. Bunun için 8 mg KSSL ile 124.2 mg yardımcı madde karışımı birleştirilerek ortalama tablet ağırlığı olan 132.2 mg elde edilmiştir. Standart tablet matriks ortamı olarak kullanılan yardımcı maddeler 1.4 mg magnezyum stearat, 79.8 mg laktoz, 6.3 mg nişasta, 18.2 mg karboksi metil selüloz, 6.4 mg poli etilen glikol ve 11.9 mg talk karışımından oluşmaktadır. Bu tartım, 10 mL metanolde çözüldükten sonra 10 dk süreyle ultrasonik banyoda bekletilmiş ve çözelti 5000 döngü/dk (rpm)'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatandan gerekli miktarlarda alınarak KSSL'nin son derişimleri sırasıyla 9.41×10^{-5} M, 9.41×10^{-6} M ve 9.41×10^{-7} M olacak şekilde metanol ile seyreltilmiştir. IS çözeltilerinin son derişimleri sırasıyla MTP için 2.01×10^{-5} M ve LNS için 1.47×10^{-5} M olacak şekilde ayarlanmıştır.

Hazırlanan 3 set çözelti 6 kez analiz edilmiş ve gerekli istatistiksel hesaplamalar yapılmıştır.

Kapiler elektroforez ile kandesartan sileksetil içeren tabletlere miktar tayini

Geliştirilen KE yönteminin KSSL açısından uygulanabilirliğini göstermek amacıyla, KSSL'nin farmasötik preparatından analizi gerçekleştirilmiştir. Bunun için yerel eczanelerden sağlanan ve 8 mg KSSL içerdiği bildirilen Ayra® (Sanovel, Türkiye) tabletleri analiz edilmiştir.

Analiz için 10 adet tablet tartılmış ve ortalama tablet ağırlığı 132.20 mg olarak bulunmuştur. Daha sonra bu tabletler havanda toz edilmiş ve bir tablete eşdeğer ağırlık tartılmıştır. Bu tartım, 10 mL metanolde çözüldükten sonra 10 dk süreyle ultrasonik banyoda bekletilmiş ve çözelti 5000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatandan gerekli miktarlarda alınarak metanol ile KSSL'nin son derişimleri sırasıyla 9.41×10^{-5} M, 9.41×10^{-6} M ve 9.41×10^{-7} M olacak şekilde

seyreltilmiştir. Her derişime ait çözelti 6 kez analiz edilmiş ve her iki IS'ye göre istatistiksel değerlendirmeler yapılmıştır.

Kandesartan sileksetil içeren tabletlerde ultra viyole spektrofotometri yöntemi ile miktar tayini ve kapiler elektroforez yöntemi ile sonuçların karşılaştırılması

KSSL'nin farmasötik preparatlarının analizinde karşılaştırma yöntemi olarak UV spektrofotometri kullanılmıştır. Standart ekleme yöntemi kullanılarak yapılan analiz için bir tablete eşdeğer ağırlıkta tartım alınarak 10 mL metanolde çözülmüştür. Daha sonra çözelti 10 dk süreyle ultrasonik banyoda bekletilmiş ve 5000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatandan gerekli miktarlarda alınarak tablet çözeltisi, son derişimi 1.69×10^{-5} M olacak şekilde seyreltilmiştir. Belirtilen tablet çözeltisinden 2.5 mL'lik kısımlar 5 ayrı deney tüpüne alınmıştır. İlk deney tüpündeki çözeltiye KSSL çözeltisi eklenmemiş ve çözelti metanol ile 7.5 mL'ye tamamlanmıştır. Diğer deney tüplerine 2.54×10^{-5} M KSSL çözeltisinden sırasıyla 0.5, 1.0, 1.5 ve 2.0 mL eklenmiş ve çözeltiler metanol ile 7.5 mL'ye tamamlanmıştır. Kör olarak metanol ortamının kullanıldığı koşullarda, derişimlere karşı, 214 nm dalga boyunda, okunan absorbans değerleri grafiğe geçirilmiş ve elde edilen doğru, x eksenini negatif yönde kesmiştir. Bu noktanın mutlak değeri kullanılarak tablet çözeltisindeki KSSL miktarı hesaplanmıştır.

KSSL'nin tabletlerinden miktar tayini için kullanılan KE ve UV spektrofotometri yöntemleri, t ve F testi kullanılarak karşılaştırılmıştır.

Diklofenak sodyumun kapiler elektroforez ile analizi

KS ile DIC'in ilaç etkileşmelerini inceleyebilmek için, DIC'in de KE ile analiz edilmesi gerektiğinden, geliştirilen kapiler elektroforetik yöntemin koşulları altında DIC analiz edilmiştir. Bu amaçla, 6.01×10^{-5} M KS, 4.60×10^{-5} M DIC, 2.14×10^{-5} M MTP ve 1.48×10^{-5} M LNS içeren bir çözelti hazırlanarak sisteme enjekte edilmiştir.

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

Geliştirilen KE yönteminin, karşılaştırılmasının yapılabilmesi için YPSK kullanılmıştır. Bu amaçla KS, DIC ve MTP'nin ayırımını sağlayan bir YPSK yöntemi geliştirilmiştir. Çalışmada floresans detektör ile deteksiyon sağlanmış ve ayırım C₁₈ kolonda gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon çalışmaları için 6.90×10^{-6} M KS, 6.96×10^{-6} M DIC ve IS olarak 7.84×10^{-6} M MTP içeren standart bir örnek hazırlanarak kullanılmıştır.

Optimizasyon

Ön deneyler sonucunda izokratik sistemle pH 3.5, % 0.01 (a/h) 1-heptan sülfonik asit (1-HSA) içeren % 57 (h/h) metanol çözeltisi hareketli faz olarak seçilmiştir. Analizde C₁₈ (3 mm iç çap, 15 cm uzunluk, 5 µm partikül boyutu) kolon kullanılmış ve akış hızı 1 mL/dk olarak belirlenmiştir. Pikler floresans detektörle uyarma dalga boyu 290 nm ve yayma dalga boyu 360 nm olacak şekilde analiz edilmiştir.

Validasyon

YPSK yönteminin optimizasyonu gerçekleştirildikten sonra kararlılık, doğrusallık, tekrarlanabilirlik, duyarlılık, tutarlılık, sağlamlık, doğruluk ve seçicilik parametreleri incelenerek yöntemin geçerliliği gösterilmiş ve hesaplamalar ICH'ye (2005) göre yapılmıştır. Sistemin uygunluğunu göstermek amacıyla N, Rs, k' ve α parametreleri hesaplanarak sistem uygunluk testleri yapılmıştır.

Kararlılık

KS ve DIC'in kararlılıklarını belirlemek amacıyla metanolde çözülmüş sırasıyla 6.90×10^{-6} M ve 6.96×10^{-6} M derişimdeki standart çözeltileri analiz edilmiştir.

Maddelerin kısa dönem kararlılıkları için alüminyum folyo ile sarılmış halde, 24 saat süreyle oda sıcaklığında ve + 4 °C'de bekletilmiştir. Süre sonunda maddeler 3 kez analiz edilerek sonuçlar Friedman testi ile karşılaştırılmıştır.

Maddelerin uzun dönem kararlılıkları için, alüminyum folyo ile sarılmış halde, + 4 °C'de 1 ay bekletilen standart çözelti ile taze hazırlanan standart çözelti 3 kez analiz edilerek sonuçlar Friedman testi ile karşılaştırılmıştır.

Doğrusallık

Yöntemin doğrusallığının incelenmesi için KS'nin 5.69×10^{-9} – 1.04×10^{-5} M aralığındaki 13 çözeltisi ve DIC'in 3.67×10^{-7} – 5.22×10^{-5} M aralığındaki 15 çözeltisi hazırlanarak 1.18×10^{-5} M MTP varlığında analizleri gerçekleştirilmiştir.

Kalibrasyon için, 3 set halinde, her çözeltide 1.18×10^{-5} M derişimde MTP bulunacak şekilde, 4.85×10^{-8} – 1.04×10^{-6} M aralığında KS ve 4.89×10^{-7} – 1.04×10^{-5} M aralığında DIC içeren 6 çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltiler 3 farklı günde analiz edilerek kalibrasyon eğrilerine ait regresyon denklemi ve korelasyon katsayıları hesaplanmıştır. YPSK yöntemine ait kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısının önem kontrolü ve kalibrasyon eğrisinin doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü yapılmıştır.

Tekrarlanabilirlik

Yöntemin tekrarlanabilirliğinin incelenmesi için 1.29×10^{-6} M KS, 3.91×10^{-6} M DIC ve 1.18×10^{-5} M MTP içeren 3 set çözelti hazırlanmıştır. Her set, 3 farklı günde 6 kez analiz edilmiştir ve istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır..

Cihazın tekrarlanabilirliğinin araştırılması için 1.29×10^{-6} M KS, 3.91×10^{-6} M DIC ve 1.18×10^{-5} M MTP içeren bir çözelti hazırlanarak 10 kez sisteme enjekte edilmiştir. Elde edilen sonuçların birbirine yakınlığı istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Duyarlılık

YPSK yönteminin duyarlılığının belirlenmesi için doğrusallık çalışmasında belirlenen derişim aralıkları kullanılarak oluşturulan kalibrasyon doğrusu kullanılarak LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır (ICH, 2005). Hesaplanan

kalibrasyon eğrisinin, artık standart sapması GraphPad Prism 4 for Windows programı ile hesaplanmıştır. LOD ve LOQ değerlerinin bulunması için **Eşitlik 1** ve **Eşitlik 2** kullanılmıştır.

Tutarlılık

Geliştirilen yöntemin tutarlılığının araştırılması için 2 farklı analizci tarafından 1.29×10^{-6} M KS, 3.91×10^{-6} M DIC ve 1.18×10^{-5} M MTP içeren 6 ayrı çözelti hazırlanarak aynı gün içinde analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar F testi ile karşılaştırılarak aradaki farkın, istatistiksel açıdan önemi kontrol edilmiştir.

Sağlamlık

Yöntemin sağlamlığının araştırılması için, 1.29×10^{-6} M KS, 3.91×10^{-6} M DIC ve 1.18×10^{-5} M MTP standart bir çözelti, optimize edilen parametrelerde küçük değişiklikler yapılarak analiz edilmiştir. Her değiştirilen parametre için 3 enjeksiyon yapılmıştır. Parametrelerdeki değişikliklerin, sonuçları ne yönde etkilediği incelenerek Friedman testi ile istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır.

In Vitro İlaç Metabolizma İncelemeleri

Mikrozomların hazırlanması

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı tarafından sağlanan sıçan karaciğerinden elde edilen mikrozomal proteinlerin hazırlanma süreci aşağıdaki gibidir:

Deney hayvanlarından çıkarılan karaciğer dokuları $0 - 4^{\circ}\text{C}$ 'de buz banyosunda ufak parçalara ayrılmıştır. Parçalara ayrılan dokular teflon cam homojenizasyon aygıtının, buza yerleştirilmiş cam kısmına koyulmuştur. Üzerine, 1 g doku başına 3.5 mL olacak şekilde, % 1.15'lik KCl çözeltisinden eklenmiştir. Homojenizatörün teflon ucuna takılan matkap 3000 rpm'de döndürülerek dokular homojenize edilmiştir. Homojenize edilen dokular santrifüj tüplerine konup $10000 \times g$ 'de 20 dk santrifüj edilmiştir. $10000 \times g$ 'de çöken doku fraksiyonları, başlıca mitokondri ve hücre çekirdeğini içermektedir. Sıvı kısımda ise endoplazmik retikulum parçaları ve çözünür halde bulunan sitoplazma vardır. Bu kısım $10000 \times g$ fraksiyonu olarak ayrılmıştır. Elde edilen $10000 \times g$ fraksiyonu, yani üst faz, daha sonra tekrar santrifüj tüplerine konularak soğutmalı yüksek devirli santrifüjde ($108000 \times g$) 1.5 saat süreyle santrifüj edilmiştir. Çöken kısım (pellet), mikrozom içermektedir. Pelletler alınarak 1 g doku için 0.5 mL olacak şekilde % 20 (h/h) gliserol ile homojenize edilmiştir. Mikrozomal fraksiyonlar -80°C 'lik derin dondurucuda saklanmıştır.

In vitro ilaç metabolizma incelemelerinde kullanılan çözeltiler ve derişimleri

In vitro ilaç metabolizma incelemelerinde kullanılmak üzere KS'nin 5.11×10^{-3} M ve DIC'in 5.09×10^{-3} M derişime sahip çözeltileri metanolde hazırlanmıştır.

52.04 mg/mL derişimdeki stok mikrozomal proteinler, pH 7.4 potasyum fosfat tamponu kullanılarak gerekli derişime seyreltilmiştir. Potasyum fosfat tamponu

USP XXIV’te belirtilen şekilde 0.2 M KH_2PO_4 ve 0.2 M NaOH’ın, pH 7.4 olacak şekilde karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Mikrozoal proteinlerin inkübasyon ortamında kullanılmak üzere 0.5 M TRIS ve 0.01 M EDTA içeren bir tampon çözeltisi hazırlanmıştır. Bu tamponun pH’ı, 7.4’e 5 N HCl çözeltisi kullanılarak ayarlanmıştır.

NADPH derişimi 2 mM olacak şekilde çalışılmıştır. Fakat NADPH’ın kararlılığının çok düşük olması nedeniyle NADPH her çalışma öncesinde, gerekli miktarda suda çözülerek hazırlanmış ve en fazla 30 dk içerisinde kullanılmıştır.

6 farklı zamanda (5, 10, 20, 30, 45 ve 60. dakikalarda) 200’er μL örnek alınıp reaksiyonun durdurulacağı öngörülerek, reaksiyon hacminin en az 1.2 mL olması gerektiği anlaşılmıştır. Ancak pipetleme sırasında daha rahat çalışabilmek amacıyla örnek hacmi 1.4 mL olarak seçilmiştir. Çalışmada küçük hacimlerden kaynaklanabilecek analizi hatalarını önlemek üzere, mümkün olan tüm maddelerin stok çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan stokların içerdiği maddeler ve oranları **Çizelge 1**’de sunulmuştur. Stokların oranlarına literatürden yararlanılarak karar verilmiştir ([http-14](http://14)). Stok S (substrat), hem KS hem de DIC için hazırlanmıştır.

Çizelge 1. *In Vitro* İlaç Metabolizma İncelemelerinde Kullanılan Stokların İçerikleri

	Su	Tampon çözeltisi (TRIS-EDTA-HCl)	Substrat	MTP
Stok A	650	100	-	-
Stok S	80	10	10	-
Stok IS	400	-	-	100

Bu durumda toplam hacmi 1.4 mL olan bir örneğin içeriği, sırasıyla şöyledir:

Stok A: 1020 μL

Mikrozoal protein: 100 μL

Stok S: 140 μL

NADPH: 140 μL

KS ile DIC’i birlikte içeren örnek ise aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:

Stok A: 880 μL

Mikrozoal protein: 100 μL

Stok S (DIC): 140 μL

Stok S (KS): 140 μL

NADPH: 140 μL

Tüm bu maddeler hazırlandıktan sonra stok A, enzim ve stok S, mikroreaksiyon tüpünde birleştirilip vorteks karıştırıcı ile 30 sn süreyle karıştırılmıştır. Reaksiyon başlatılmadan önce bu karışım 37 °C'ta 10 dk süreyle çalkalanmaya bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda 140 µL NADPH çözeltisi eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. T₀ zamanı kaydedildikten sonra bu karışımdan sırasıyla 5, 10, 20, 30, 45 ve 60. dakikalarda 200'er µL alınmış ve buz üzerinde tutulan 400 µL metanolle karıştırılarak reaksiyon durdurulmuştur. 600 µL'lik bu karışım 10 dk süreyle 5000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra bu çözelti üzerine stok IS'den 500 µL eklenerek karıştırılmıştır. Bu son karışım 5 dk süreyle 5000 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatandan dikkatlice 500 µL alınarak analiz edilmiştir.

Optimizasyon

In vitro ilaç metabolizma incelemeleri için gerekli tüm stok çözeltiler hazırlandıktan sonra, inkübasyon ortamında kullanılacak mikrozomal protein derişimi, DIC derişimi ve KS derişimi belirlenmiştir.

Mikrozomal protein derişimi

In vitro ilaç metabolizma incelemelerinde kullanılacak mikrozomal protein derişiminin belirlenmesi için sırasıyla 0.5, 1.0, 2.0, 2.5 ve 3.0 mg/mL mikrozomal protein içeren örnekler hazırlanmıştır. Bu amaçla 1020 µL stok A çözeltisi üzerine, son derişimi sırasıyla 0.5, 1.0, 2.0, 2.5 ve 3.0 mg/mL olacak şekilde potasyum fosfat çözeltisi ile seyreltilmiş mikrozomal proteinlerden 100 µL hacimde eklenmiştir. Daha sonra her karışımın üzerine 140 µL, son derişimi 50 mM olan DIC çözeltisi (stok S) eklenmiş ve karıştırıldıktan sonra 37 °C'ta 10 dk süreyle çalkalanmaya bırakılmıştır. 140 µL NADPH çözeltisi eklenerek reaksiyon başlatılmış ve t₀ zamanı kaydedilmiştir. Bu karışımdan sırasıyla 5, 10, 20, 30, 45 ve 60. dakikalarda 200'er µL alınmış ve buz üzerinde tutulan 400 µL metanolle karıştırılarak reaksiyon durdurulmuştur. 600 µL'lik bu karışım 10 dk süreyle 5000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra bu çözelti üzerine stok IS'den 500 µL eklenerek karıştırılmıştır. Bu son karışım 5 dk süreyle 5000 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatandan dikkatlice 500 µL alınarak KE ile analiz edilmiştir. Her bir derişim için 2 deney yapılmıştır.

Çalışmada 50 mM DIC içeren örnekleri, en yüksek düzeyde metabolize eden mikrozomal protein derişimi seçilmiştir.

Substrat derişimi (diklofenak sodyum)

Kullanılacak mikrozomal protein derişimine karar verildikten sonra DIC'in en fazla metabolize olduğu derişimi belirlemek için 30, 40 ve 50 mM DIC içeren örnekler hazırlanmıştır. Bu amaçla 1020 µL stok A çözeltisi üzerine, 100 µL son derişimi 3.0 mg/mL olan mikrozomal protein eklenmiştir. Daha sonra her karışımın üzerine 140 µL, son derişimleri 30, 40 ve 50 mM olan DIC çözeltisi (stok S) eklenmiştir. Bu çözeltiler karıştırıldıktan sonra 37 °C'ta 10 dk süreyle çalkalanmaya bırakılmıştır. Karışım üzerine 140 µL NADPH çözeltisi eklenerek reaksiyon başlatılmış ve t₀ zamanı kaydedilmiştir. Bu karışımdan sırasıyla 5, 10,

20, 30, 45 ve 60. dakikalarda 200'er μL alınmış ve buz üzerinde tutulan 400 μL metanolla karıştırılarak reaksiyon durdurulmuştur. 600 μL 'lik bu karışım 10 dk süreyle 5000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra bu çözelti üzerine stok IS'den 500 μL eklenerek karıştırılmıştır. Bu son karışım 5 dk süreyle 5000 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatandan dikkatlice 500 μL alınarak KE ile analiz edilmiştir. Her substrat derişimi için deney 2 kez tekrar edilerek kullanılacak DIC derişimine karar verilmiştir.

Analiz sonucunda, kullanılan mikrozomal protein içeriğindeki CYP 2C9 enzimi tarafından en fazla oranda metabolize edilen DIC derişimi seçilmiştir.

Substrat derişimi (kandesartan)

Mikrozomal protein ve DIC derişimleri belirlendikten sonra KS'nin DIC metabolizması üzerinde en çok etki gösterdiği derişimin belirlenmesi aşamasına geçilmiştir. Bunun için sırasıyla 30, 40 ve 50 mM KS içeren çözeltiler hazırlanmış ve 50 mM DIC içeren örnekler üzerine eklenmiştir. Bu örnekler, yalnız 50 mM DIC içeren örneklerle karşılaştırılmıştır. Reaksiyon ortamına her iki substratın eklenebilmesi için kullanılan stok A hacmi azaltılarak toplam hacmin değişmemesi sağlanmıştır.

Reaksiyon ortamının hazırlanabilmesi için 880 μL stok A çözeltisi üzerine, 100 μL son derişimi 3.0 mg/mL olan mikrozomal protein eklenmiştir. Stok A ve mikrozomal protein karışımından dört grup ayrı ayrı hazırlanmıştır. Bu gruplardan ilkinde son derişimi 50 mM olacak şekilde 140 μL DIC ve 140 μL daha stok A eklenmiştir. Diğer grupların her birine son derişimi 50 mM olacak şekilde 140 μL DIC eklendikten sonra son derişimleri sırasıyla 30, 40 ve 50 mM olan KS çözeltisinden (stok S) 140 μL eklenmiştir. Bu çözeltiler karıştırıldıktan sonra 37 °C'ta 10 dk süreyle çalkalanmaya bırakılmıştır. Karışım üzerine 140 μL NADPH çözeltisi eklenmesiyle reaksiyon başlatılmış ve t_0 zamanı kaydedilmiştir. Bu karışımından sırasıyla 5, 10, 20, 30, 45 ve 60. dakikalarda 200'er μL alınmış ve buz üzerinde tutulan 400 μL metanolla karıştırılarak reaksiyon durdurulmuştur. 600 μL 'lik bu karışım 10 dk süreyle 5000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra bu çözelti üzerine stok IS'den 500 μL eklenerek karıştırılmıştır. Bu son karışım 5 dk süreyle 5000 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatandan dikkatlice 500 μL alınarak direkt olarak hem KE hem de YPSK ile analiz edilmiştir. Her deney 2 kez tekrar edilmiştir.

KS ve DIC'i birlikte içeren örnekler, yalnız DIC içeren örneklerle karşılaştırılarak DIC metabolizmasını en fazla etkileyen KS derişimi seçilmiştir.

Kapiler elektroforez ile yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemlerinin karşılaştırılması

In vitro ilaç metabolizma incelemelerinde örneklerin analizi için kullanılan KE ve YPSK yöntemlerinin kesinliklerinin karşılaştırılması için F testi kullanılmıştır. F testi, KS ve DIC'i birlikte içeren örneklerin analiz sonuçlarına dayanarak yapılmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Kullanılan Standart Maddelerin Safılıkları

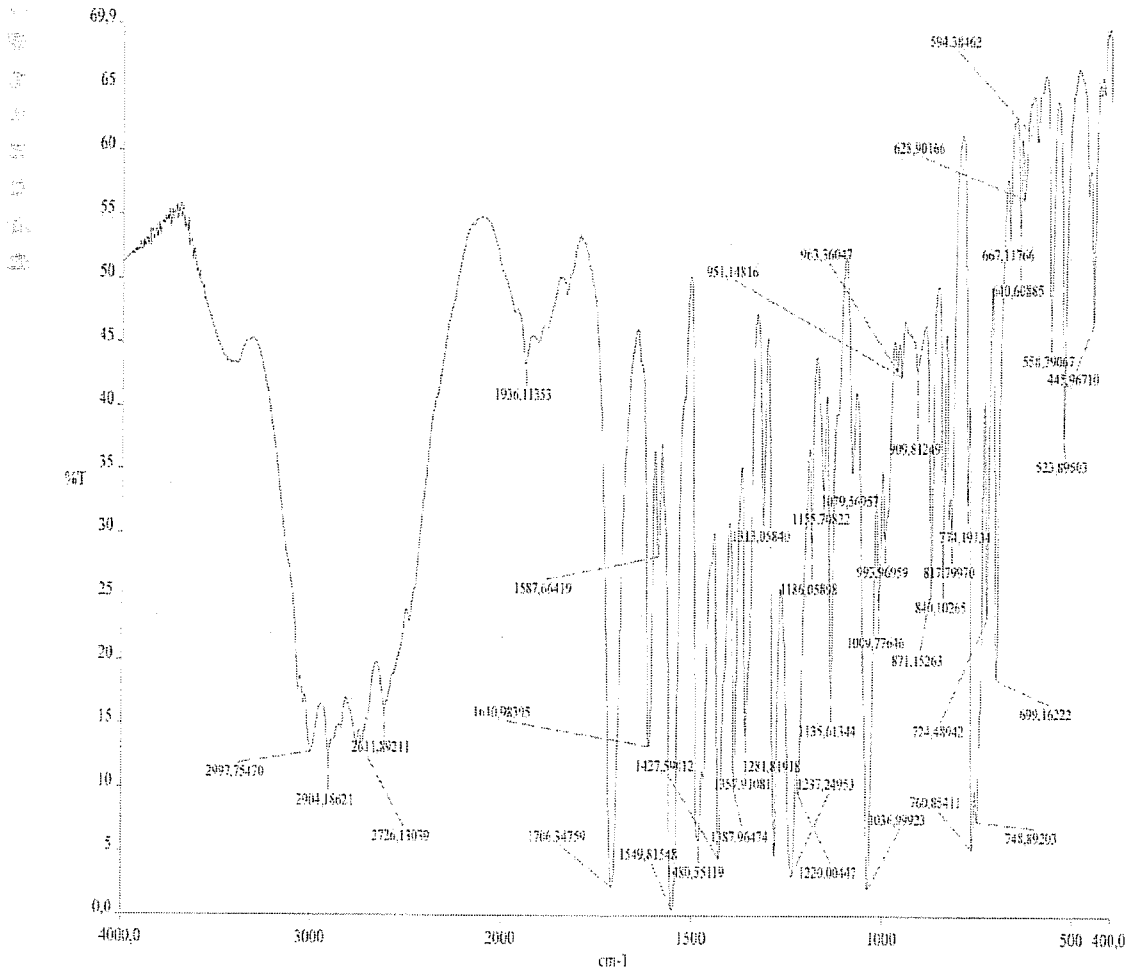
Kullanılan tüm standart maddelerin safılıklarının analizi için erime dereceleri belirlenmiş ve IR spektrumları alınmıştır.

Erime derecesi tayini

KSSL, KS, MTP, LNS ve DIC'in erime derecelerinin tayini için maddeler 300 °C'a kadar ısıtılmış ve erime dereceleri saptanmıştır. Analiz sonucunda KSSL'nin 166-168 °C'ta, KS'nin 181-183 °C'ta, MTP'nin 138 °C'ta, LNS'nin 180 °C'ta ve DIC'in 282-284 °C'ta eridiği gözlenmiştir. İncelenen maddeler için elde edilen erime dereceleri, literatür bilgileri (http-1; http-3; http-5; http-6; http-9; http-11; http-12) ile uyumlu bulunmuş ve maddelerin saf olduklarına karar verilmiştir.

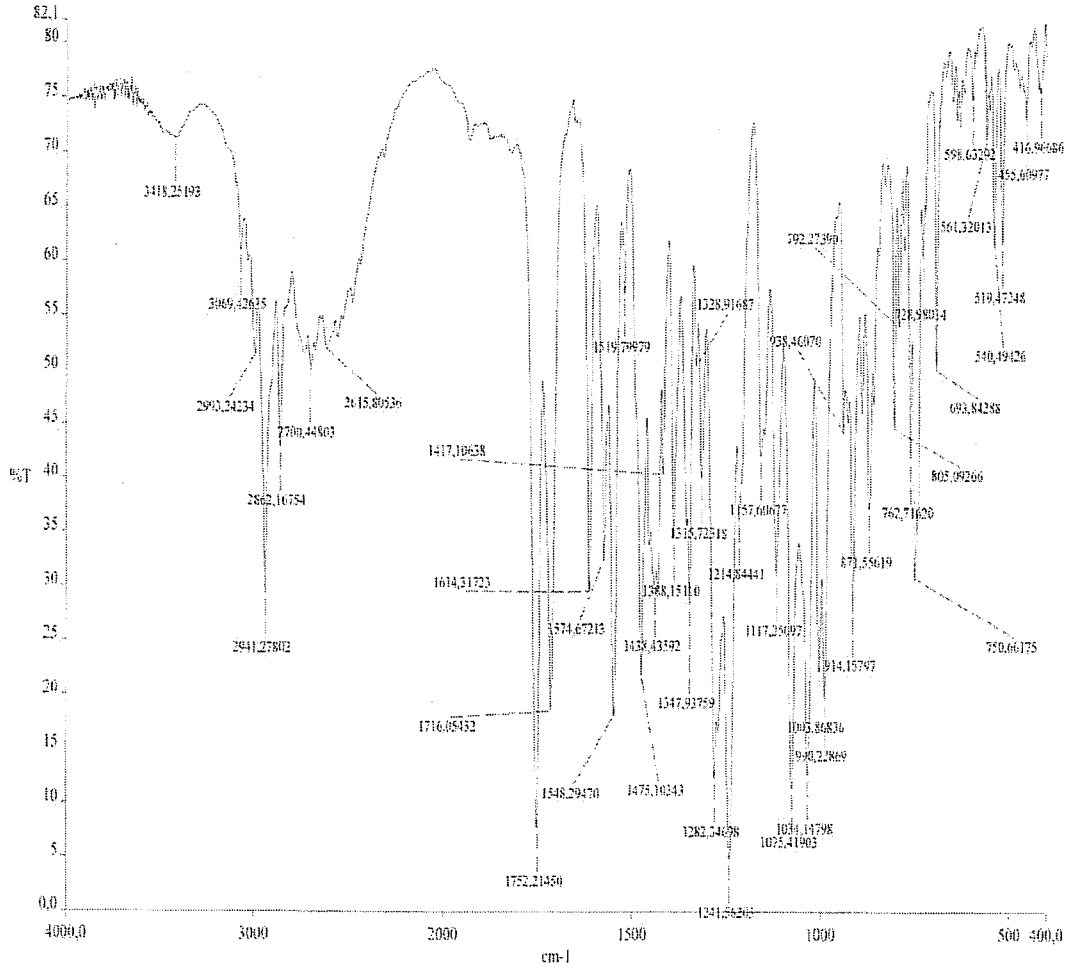
Infra red spektrofotometri

Bu çalışmada kullanılan KS, KSSL, DIC, MTP ve LNS'nin KBr diskleri hazırlanmış ve 400-4000 cm^{-1} arasındaki IR spektrumları alınmıştır. IR spektrumlarının yorumlanması Ergenç ve Gürsoy (1989) ve Erdik (2005)'ten yararlanılarak yapılmıştır. İlgili spektrumlar Şekil 10-14'te verilmektedir.



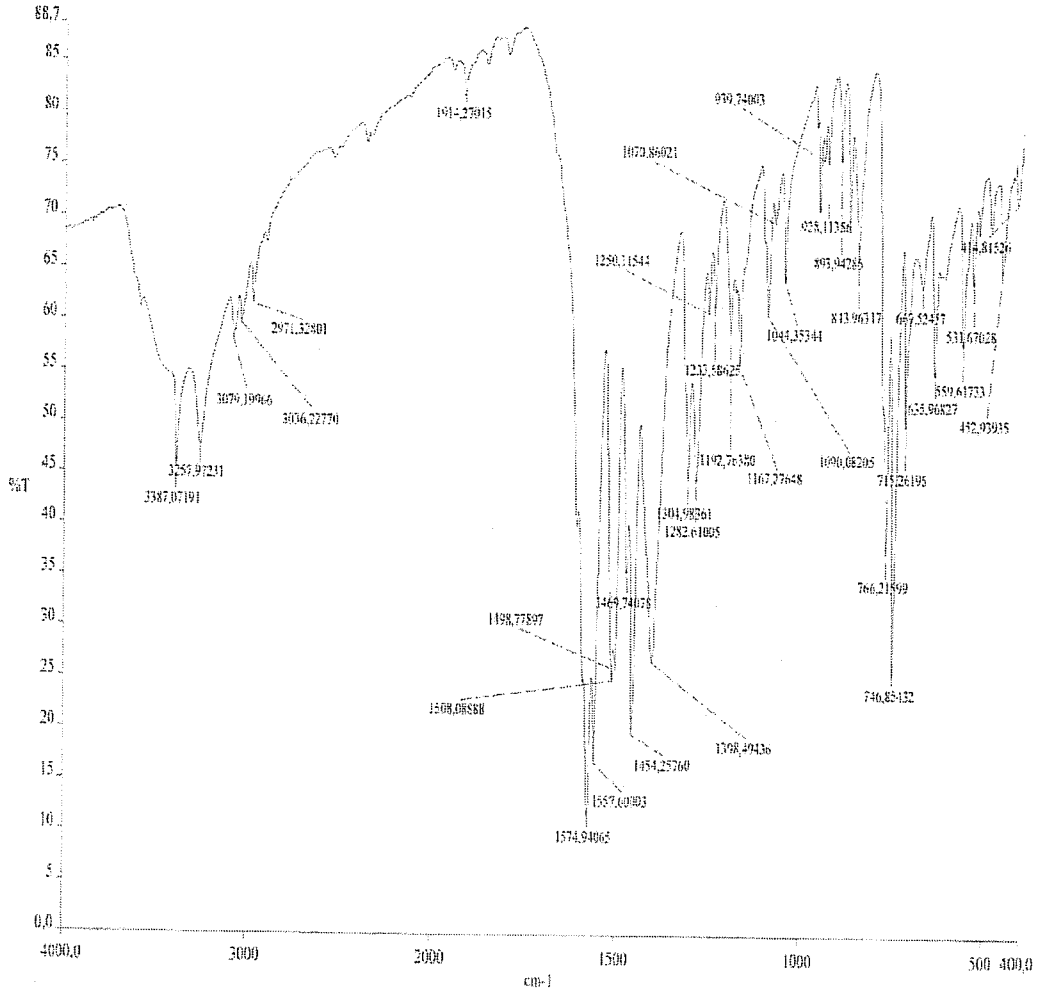
Şekil 10. Potasyum Bromür Diski Hazırlanan Kandesartanın Infra Red Spektrumu

KS'nin IR spektrumu incelendiğinde 1706 cm^{-1} 'de $\text{C}=\text{O}$ 'ya, 1036 cm^{-1} 'de $\text{C}-\text{O}$ 'ya ve 969 cm^{-1} , 840 cm^{-1} , 774 cm^{-1} , 760 cm^{-1} ve 699 cm^{-1} 'de fenil sübstitüsyonlarına ait bantlar görülmektedir.

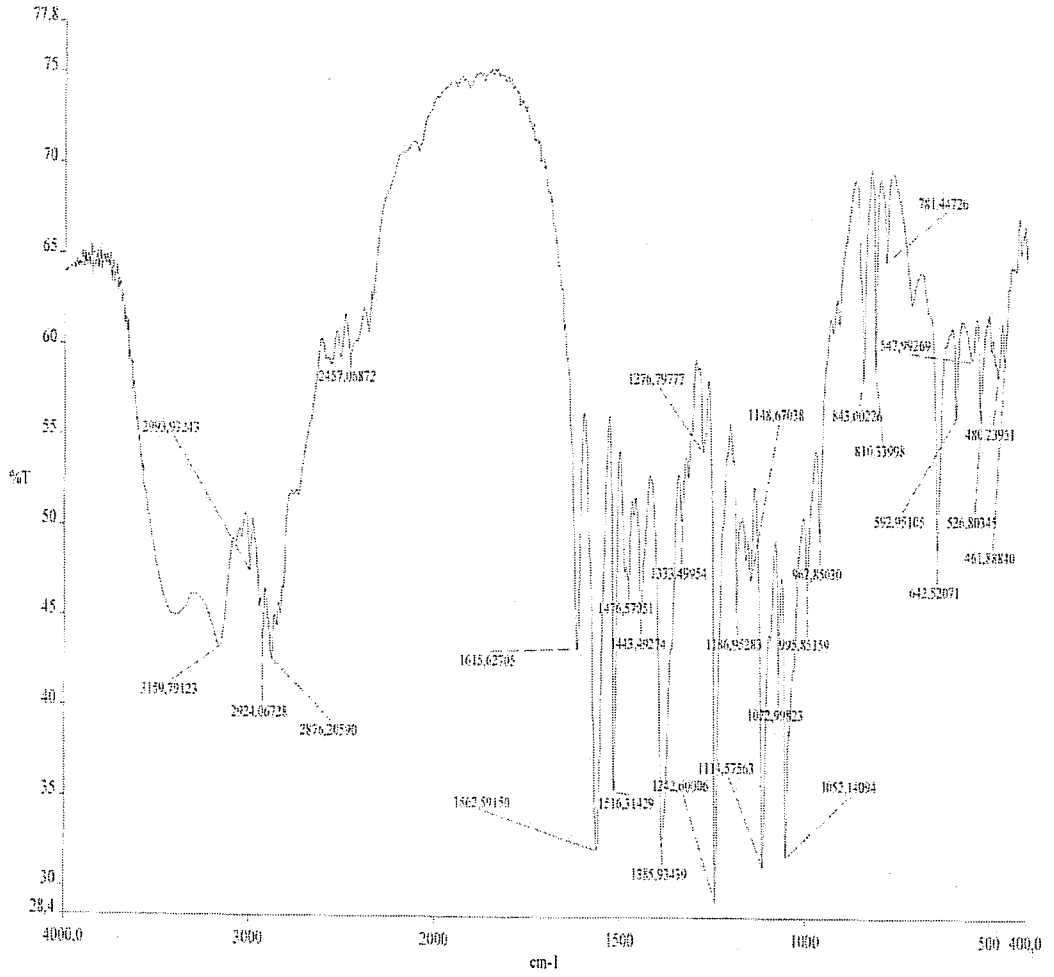


Şekil 11. Potasyum Bromür Diski Hazırlanan Kandesartan Sileksetilinin Infra Red Spektrumu

KSSL'nin IR spektrumu incelendiğinde, molekülün KS ile aynı olan ana yapısına ait, 1716 cm^{-1} 'de $\text{C}=\text{O}$, 1034 cm^{-1} 'de $\text{C}-\text{O}$, 914 cm^{-1} , 871 cm^{-1} , 762 cm^{-1} ve 750 cm^{-1} 'de fenil sübstitüsyonları ile 1752 cm^{-1} 'de sileksetil tuzundaki $\text{C}=\text{O}$ bandı ve 2941 cm^{-1} 'de spesifik siklohegzil bandı görülmektedir.

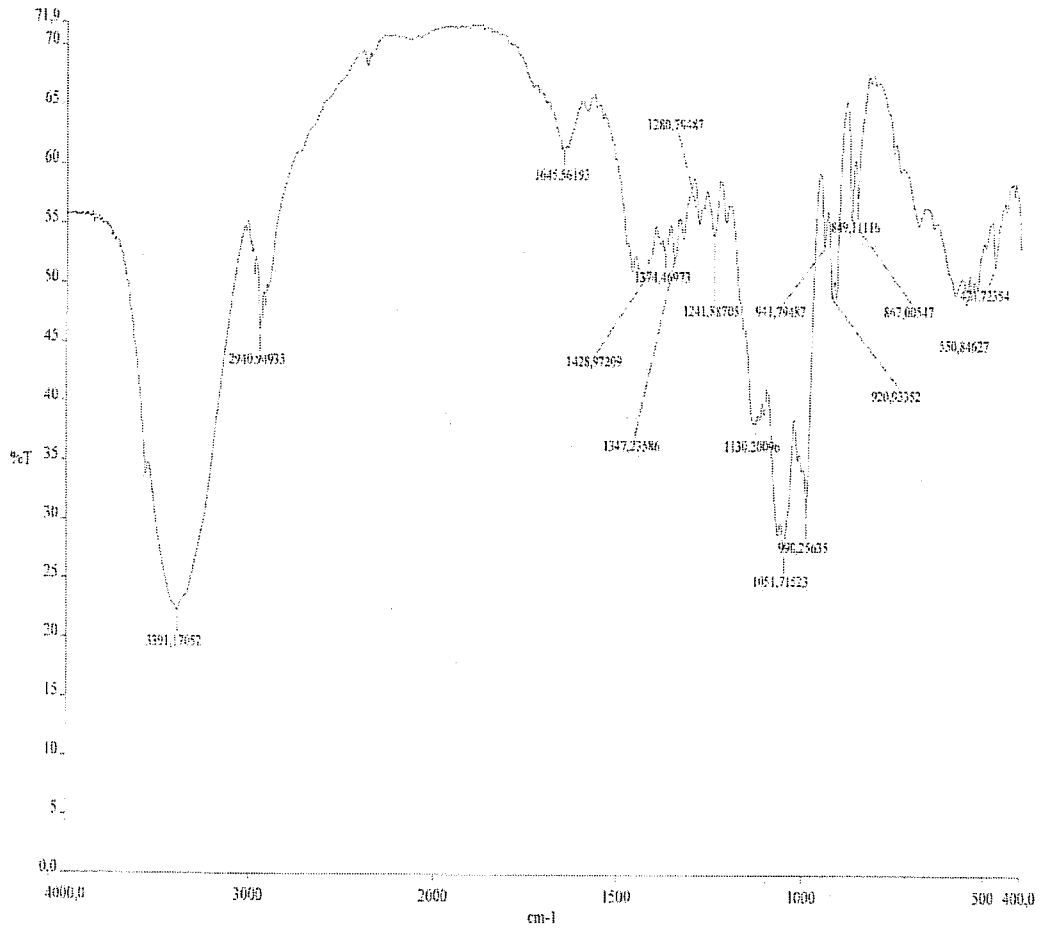


Şekil 12. Potasyum Bromür Diski Hazırlanan Diklofenak Sodyumun Infra Red Spektrumu
 DIC'in IR spektrumunda 3387 cm^{-1} ve 3257 cm^{-1} 'de NH bantları, 1574 cm^{-1} ve 1557 cm^{-1} 'de C = O bantları ve 766 cm^{-1} ve 746 cm^{-1} 'de trisübstitüe fenil bantları bulunmaktadır.



Şekil 13. Potasyum Bromür Diski Hazırlanan Metoprolol Süksinatın Infra Red Spektrumu

MTP'nin IR spektrumunda ise 1242 cm^{-1} 'de C – O, 1562 cm^{-1} 'de COO^- , 2924 cm^{-1} ve 2876 cm^{-1} 'de amin tuzundaki NH, 1052 cm^{-1} 'de OH ve 843 cm^{-1} ve 810 cm^{-1} 'de disüstitüe fenil bantları görülmektedir.



Şekil 14. Potasyum Bromür Diski Hazırlanan Lansoprazolün Infra Red Spektrumu

LNS'nin IR spektrumunda 3391 cm^{-1} 'de heteroaromatik NH bandı, 1051 cm^{-1} 'de C – O bandı ve 1130 cm^{-1} 'de S = O bandı görülmektedir.

Sonuç olarak, incelenen tüm maddelerin IR spektrumlarında ilgili maddeye ait karakteristik bantlar gözlenmiştir.

Kullanılan Standart Maddelerin Çözücüsü

Çalışmaya başlamadan önce incelenen literatürlerde KSSL ve aktif metaboliti olan KS için pek çok çözücü sistemine rastlanmıştır (Hillaert ve Van den Bossche, 2002; Zhang ve ark., 2006; Subba Rao ve ark., 2007; Erk, 2003a). Bu literatürlerin pek çoğunda çözücü olarak metanolün tercih edildiği gözlenmiştir (Zhang ve ark., 2006; Erk, 2003b; Miyabayashi ve ark., 1996; Lee ve ark., 1995). Daha ekonomik çalışma şartları sağlayabilmek amacıyla, düşük metanol yüzdeli çözücü sistemleri ile bu iki madde çözülmeye çalışılmıştır. Bunun için artan % metanol oranları çözücü sistemi olarak denenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda her iki madde için de % 30 (h/h) metanol çözücüsü uygun bulunmuştur. KSSL ve KS'nin uygun derişimlerdeki çözeltileri hazırlanarak deneme enjeksiyonlarına geçilmiştir. Bir hafta boyunca her gün yapılan enjeksiyonlar sonucunda madde piklerinin zamanla küçüldüğü ve parçalanmaya başladığı gözlenmiştir. Bu durumda yeni bir çözücü arayışına girilmiştir. Literatürlerde de yer aldığı şekilde ve yapılan deneme enjeksiyonları sonucunda maddelerin saf metanolde uzun süre

kararlı kaldıkları gözlenmiştir. Böylece KSSL ve KS için çözücü olarak saf metanolün kullanılmasına karar verilmiştir.

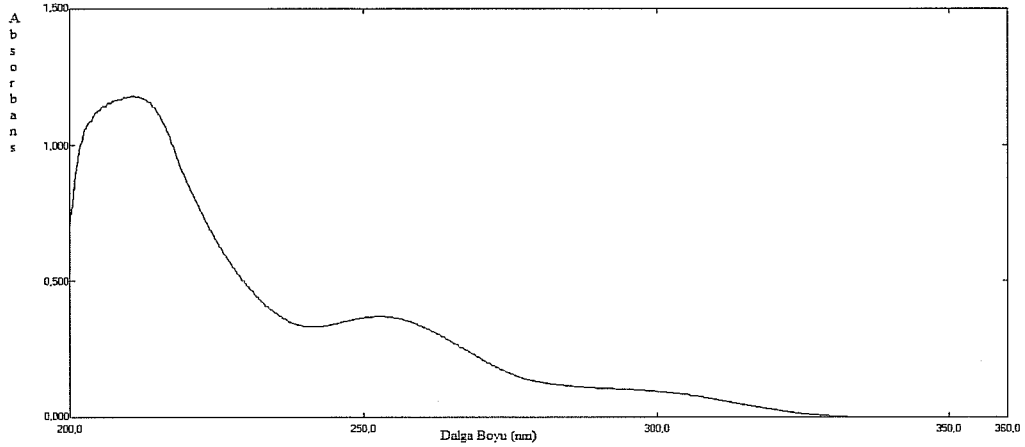
MTP ve LNS için kaynaklarda çeşitli çözücülerin kullanıldığı belirtilmiştir (http-7; http-8; http-10). Ancak, bu maddelerin çözücülerinin, KSSL ve KS'nin çözücülerine benzemesini sağlamak amacıyla, MTP ve LNS % 50 (h/h) metanol sisteminde çözülmüştür. Yapılan deneme enjeksiyonlarında LNS'nin bu çözücü sistemi ile birkaç gün içerisinde kararlılığını kaybettiği görülmüştür. Bu nedenle literatürde LNS'nin kararlı olduğu belirtilen (Yeniceli ve ark., 2004; Özalın, 1999), bazik bir ortamda çözülmesine karar verilmiş ve bu amaçla 0.1 M NaOH'ta çözüldükten sonra % 50 (h/h) metanol içerisinde istenen derişime ayarlanmıştır.

DIC için literatürlerde (Baeyens ve ark., 1995; Tang ve ark., 2000; Kumar ve ark., 2002; Konečný ve ark., 2007; Prost ve Thormann, 2003; Jin ve Zhang, 2000) kullanılan pek çok çözücü sistemi bulunmasına karşın, KSSL ve KS'nin metanolde çözülmesi ve sistemin organik çözücü olarak metanol içermesi nedenleriyle DIC'in çözünmesi için de metanol kullanılmıştır.

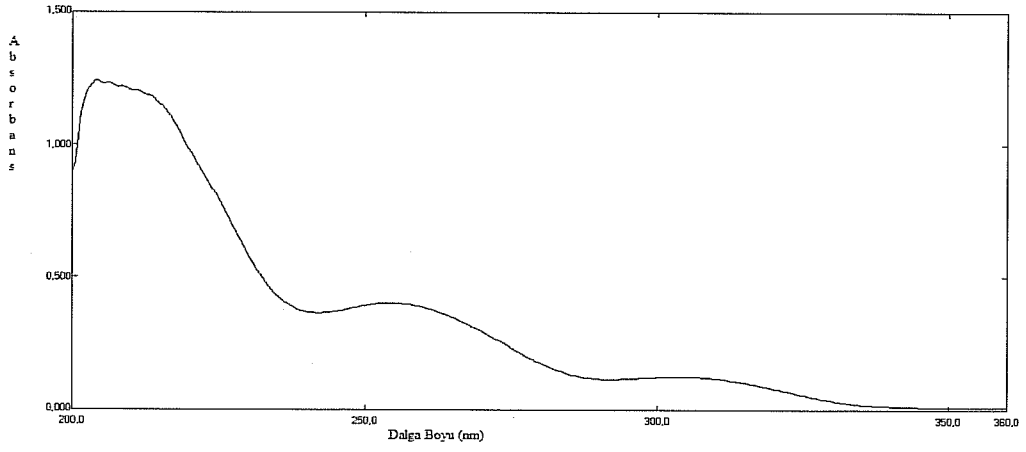
Ultra Viyole Spektrofotometri

KE yöntemi ile yapılacak analizlerde UV detektör kullanılacağı için öncelikle UV spektrofotometri ile başta KS ve KSSL olmak üzere, tüm maddeler için en uygun dalga boyu belirlenmiştir.

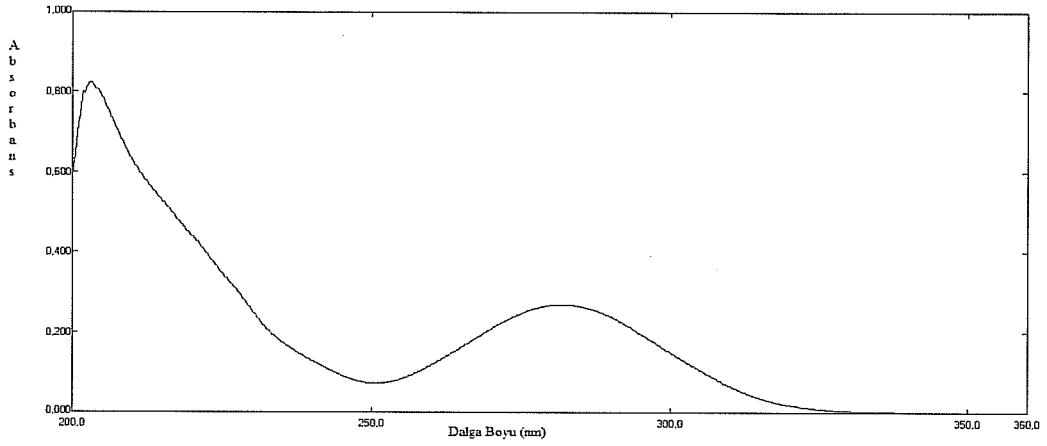
Bunun için KS'nin 2.05×10^{-5} M, KSSL'nin 2.07×10^{-5} M, DIC'in 2.07×10^{-5} M, MTP'nin 2.21×10^{-5} M ve LNS'nin 1.47×10^{-5} M derişimde çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin 200-360 nm aralığında alınan spektrumları sırasıyla Şekil 15-19'da sunulmuştur.



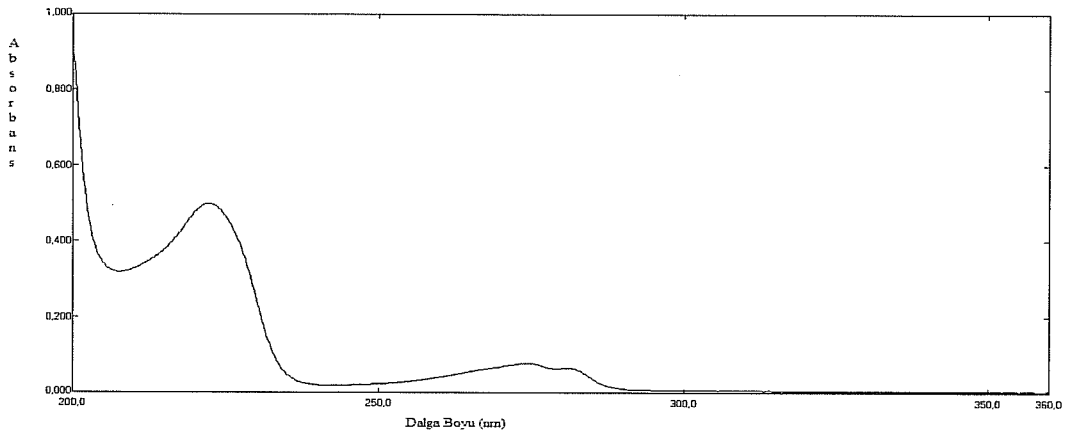
Şekil 15. Metanolde Çözölmüş 2.05×10^{-5} M Derişimdeki Kandesartanın 200-360 nm'ler Arasında Kaydedilmiş Ultra Viyole Spektrumu



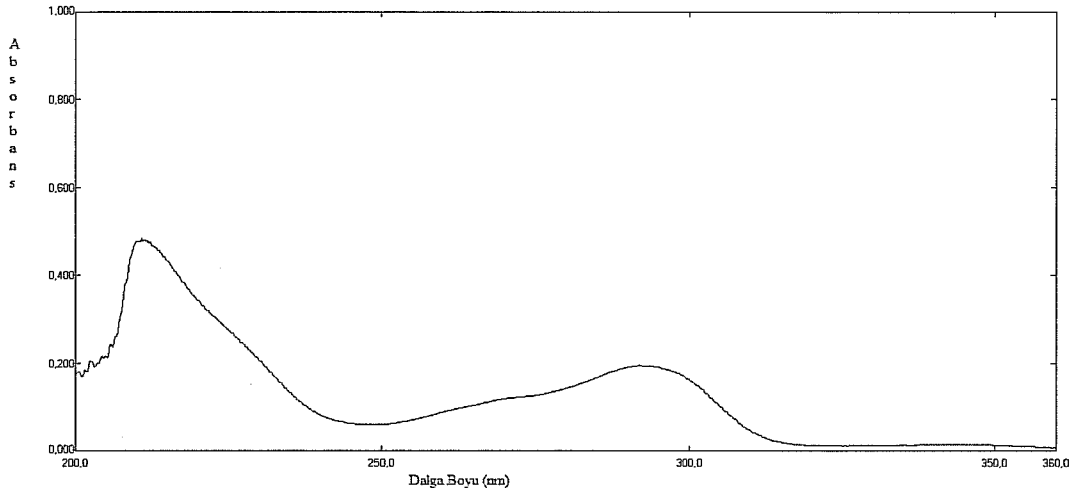
Şekil 16. Metanolde Çözölmüş 2.07×10^{-5} M Derişimdeki Kandesartan Sileksetilin 200-360 nm'ler Arasında Kaydedilmiş Ultra Viyole Spektrumu



Şekil 17. Metanolde Çözölmüş 2.07×10^{-5} M Derişimdeki Diklofenak Sodyumun 200-360 nm'ler Arasında Kaydedilmiş Ultra Viyole Spektrumu



Şekil 18. % 50 (h/h) Metanolde Çözölmüş 2.21×10^{-5} M Derişimdeki Metoprolol Süksinatın 200-360 nm'ler Arasında Kaydedilmiş Ultra Viyole Spektrumu



Şekil 19. 2.07×10^{-5} M Derişimdeki Lansoprazölün 200-360 nm'ler Arasında Kaydedilmiş Ultra Viyole Spektrumu

Elde edilen spektrumlardan yararlanılarak kullanılacak dalga boyuna karar verebilmek amacıyla her maddenin maksimum absorbans verdiği dalga boyuna ait molar ekstinksiyon katsayısı (ϵ) değerleri hesaplanmıştır. Spektrumları verilen KS, KSSL, DIC, MTP ve LNS'nin UV spektrumu ile ilgili bulgular **Çizelge 2'**de gösterilmektedir.

Çizelge 2. Maddelerin Ultra Viyole Spektrumu ile İlgili Karakteristikleri

Madde ve derişimi	Dalga Boyu-1	Dalga Boyu-2	ϵ_1	ϵ_2
KS – 2.05×10^{-5} M	211.2	252.8	57561	18048
KSSL – 2.07×10^{-5} M	204.0	254.5	60048	19468
DIC – 2.07×10^{-5} M	203.4	282.2	39807	12995
MTP – 2.21×10^{-5} M	222.2	274.8	22534	3529
LNS – 1.47×10^{-5} M	211.0	291.8	32857	13197

ϵ : Molar ekstinksiyon katsayısı

İncelenen maddelerin maksimum absorbans verdiği dalga boyları **Çizelge 2'**de verilmiştir. Ancak incelenen literatürlerde (Hillaert ve Van den Bossche, 2002; Hillaert ve ark, 2003) KS ve KSSL'nin UV detektörle analizi için 214 nm'nin kullanılması ve bu dalga boyunun elde edilen sonuçla, fazla farklılık göstermemesi nedeniyle çalışmada, maddelerin KE'ye bağlı UV detektörle analizi için 214 nm'nin kullanılmasına karar verilmiştir.

Kapiler Elektroferez

Kapiler elektroforetik yöntemde deteksiyon 214 nm dalga boyunda UV detektör ile sağlanmıştır. Yöntemde KSSL ve KS'nin analizi, IS olarak MTP ve LNS'nin kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Kapiler olarak efektif uzunluğu 45.9 cm ve toplam uzunluğu 70 cm olan 75 µm iç çapa, 363 µm dış çapa sahip çıplak silika kullanılmıştır. Yöntemin optimizasyonu ve validasyonu için gerekli parametreler incelenmiştir.

Optimizasyon

Kapiler elektroforetik yöntemin optimizasyonu için önce analitik, daha sonra da aletsel parametreler incelenmiştir. İncelenen analitik parametreler tampon derişimi, çalışma tamponunun pH'ı ve çalışma tamponu bileşimindeki organik çözücü oranıdır. Aletsel parametreler ise uygulanan potansiyel ve enjeksiyon süresidir.

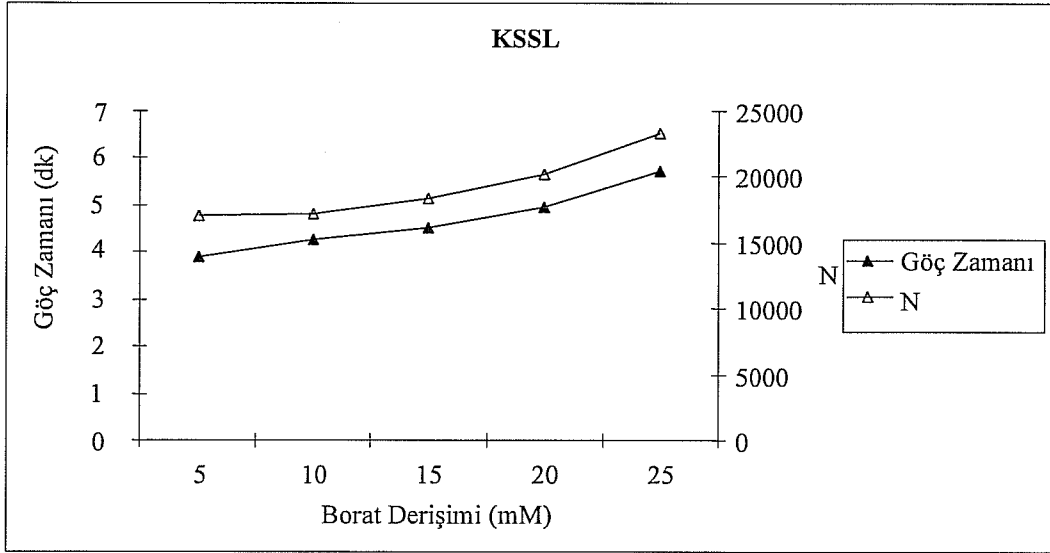
Borat derişimi

KE'de maddelerin göç zamanlarının kısalması, tampon derişiminin düşüklüğü ile sağlanabilir. Her ne kadar 10 – 100 mM düzeyindeki derişimler kullanılabilirse de mümkün olan en düşük derişimin seçilmesi önerilir (Baker, 1995).

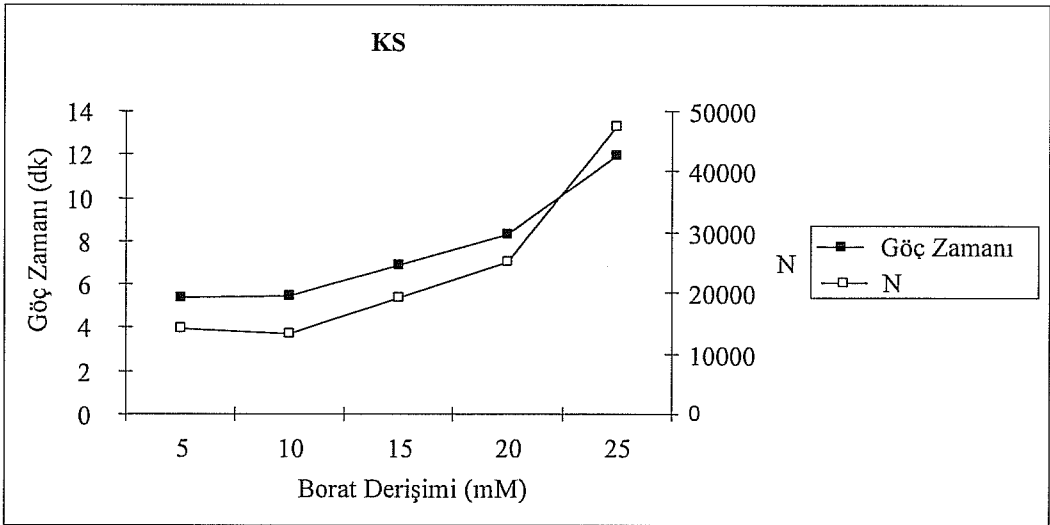
KE'de elektroforetik ayırım için analiz edilecek bileşenlerin iyonize olması gerekmektedir. Henderson-Hasselbach eşitliğine göre zayıf asidik bileşenler, bazik ortamda iyonize, asidik ortamda ise noniyonize özellik göstermektedir. Çalışmada analizi hedeflenen bileşiklerin zayıf asidik özellikte olmaları nedeniyle, analizde elektroforetik ayırımın mümkün olabilmesi için çalışma tamponunun bazik özellik göstermesi gerekmektedir. Çalışma tamponunun bazik özellik göstermesi aynı zamanda elektroozmotik hareketliliği sağladığı için daha etkili bir ayırım gerçekleştirilir. Bu nedenlerle KSSL ve KS için zayıf bazik ortam borat tamponu tercih edilmiştir.

Borat derişiminin ilgili piklerin göçleri ve sinyalleri üzerine etkileri araştırılırken maddelerin ayırımları % 10 (h/h) metanol içeren 5, 10, 15, 20 ve 25 mM borat derişimine sahip pH'ı 8.50 olan elektrolit çözeltisinde, 1 sn enjeksiyon süresi ve 25 kV potansiyel uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

Borat derişiminin, KSSL ve KS'nin göç zamanları ve bu maddeler için hesaplanan teorik tabaka sayıları üzerine etkileri **Şekil 20** ve **Şekil 21**'de sunulmuştur.



Şekil 20. Kandesartan Sileksetilin Borat Derişimine Karşı Göç Zamanı ve Teorik Tabaka Sayısı Değişimi



Şekil 21. Kandesartanın Borat Derişimine Karşı Göç Zamanı ve Teorik Tabaka Sayısı Değişimi

Çalışma tamponu bileşimindeki, tampon derişimi arttıkça, iyonik şiddetin artışına bağlı olarak elektriksel yoğunluğun ve elektroforetik çekilmenin artması ile ilgili pikler daha geç sürelerde belirir. Bu etki, bileşenlerin kapiler içerisinde daha fazla kalmalarına ve birbirine yakın yüklü bileşenlerin ayrılmasına yardımcı olur. Buna karşın yüksek tampon derişimleri analiz süresini uzatarak madde zonlarının kapiler içerisinde yayılmasına ve yayvan morfolojili piklerin oluşmasına neden olur. Yüksek tampon derişimi aynı zamanda elektriksel iletkenlikte artışa neden olarak Joule ısınmasına katkıda bulunur. Düşük tampon derişimlerinde ise düşük iyonik şiddeti değerleri ile birlikte, elektriksel yoğunluğun azalmasına bağlı olarak elektroforetik çekilme azalır ve bileşenler elektroozmotik sürüklenme ile kısa sürede detektörün önünden geçer. Böylelikle kısa analiz süreleri ve keskin pik morfolojileri gözlenebilmektedir. Buna karşın düşük tampon derişimlerinde

çalışılırken elektroforetik hareketliliğin azalması nedeniyle yük/kütle oranları birbirine yakın olan bileşenlerin ayrılmaları mümkün olmaz. Tampon derişimi optimizasyonu çalışmalarında yukarıda sözü edilen etki ve sonuçlar değerlendirilmeli ve en iyi ayırma olanak veren en düşük tampon derişimi seçilmelidir.

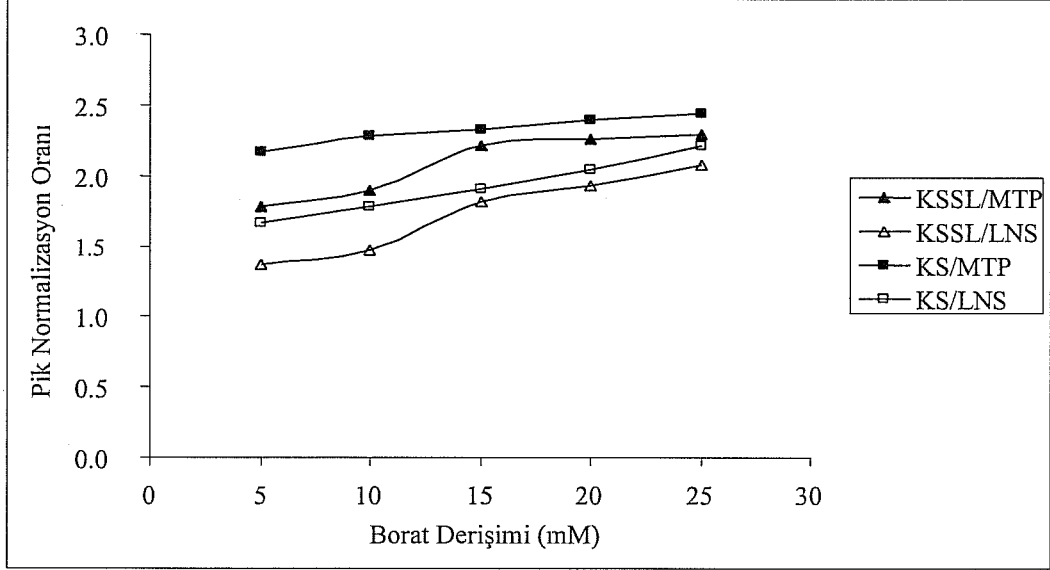
Bu çalışmada 5 mM borat derişimi kullanıldığında göç zamanlarının kısa ve pik alanlarının küçük olduğu gözlenmiştir. 25 mM borat derişimine sahip çalışma tamponu ortamı incelendiğinde ise, pik morfolojilerinin bozularak göç zamanlarının arttığı gözlenmiştir. 10-20 mM arasındaki borat derişimleri kullanılarak analize devam edilmesinin uygun olacağı görülmektedir.

Borat derişiminin KE'de kullanılan tüm standart maddelerin göç zamanları üzerine etkileri ile ilgili olarak yapılan istatistiksel değerlendirmeler ortalama (\bar{x}), standart sapma (ss) ve % bağıl standart sapma (BSS) değerlerinin hesaplanması ile Çizelge 3'te sunulmaktadır.

Çizelge 3. Borat Derişiminin Maddelerin Pik Normalizasyon Oranı Üzerine Etkileri

Borat Derişimi (mM)		KSSL/MTP	KSSL/LNS	KS/MTP	KS/LNS
5	\bar{x} (n=3)	1.780	1.369	2.173	1.670
	ss	0.037	0.014	0.075	0.043
	% BSS	2.08	1.03	3.44	2.60
10	\bar{x} (n=3)	1.895	1.472	2.284	1.775
	ss	0.016	0.006	0.034	0.004
	% BSS	0.86	0.42	1.49	0.23
15	\bar{x} (n=3)	2.214	1.814	2.331	1.910
	ss	0.025	0.011	0.018	0.004
	% BSS	1.11	0.58	0.77	0.21
20	\bar{x} (n=3)	2.262	1.928	2.394	2.041
	ss	0.025	0.006	0.072	0.046
	% BSS	1.09	0.33	3.00	2.25
25	\bar{x} (n=3)	2.292	2.080	2.444	2.218
	ss	0.031	0.030	0.135	0.124
	% BSS	1.37	1.46	5.51	5.61
\bar{x} : Ortalama, n: Deney sayısı, ss: Standart sapma, % BSS: % Bağıl standart sapma					

Çizelge 3 incelendiğinde yalnız 10 ve 15 mM borat içeren çalışma tamponu ile % 2'nin altında % BSS değerlerinin bulunduğu görülmektedir. **Çizelge 3**'teki değerler kullanılarak elde edilen değişime ait grafiksel gösterim **Şekil 22**'de sunulmaktadır.



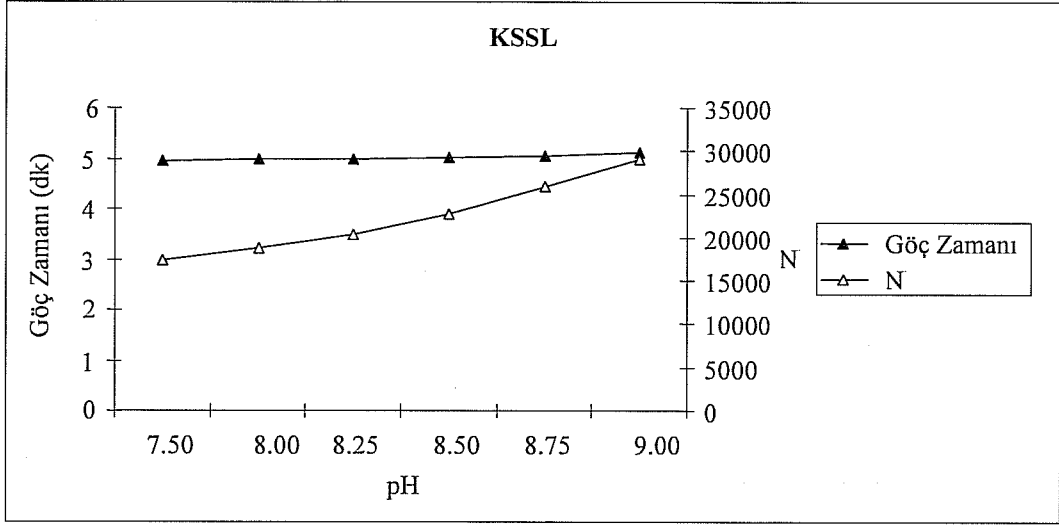
Şekil 22. Borat Derişiminin Maddelerin Pik Normalizasyon Oranı Üzerine Etkilerinin Grafiksel Gösterimi

Bu çalışmada yukarıda belirtildiği gibi, 5 mM borat derişimi kullanıldığında göç zamanlarının kısa ve pik alanlarının küçük olduğu, 25 mM borat derişimine sahip çalışma tamponunda ise, pik morfolojilerinin bozularak göç zamanlarının arttığı gözlenmiştir. 10 mM ve 15 mM borat derişimlerinde gözlenen göç zamanları ve teorik tabaka sayıları da dikkate alınarak çalışmanın devamında 15 mM borat derişiminin kullanılmasına karar verilmiştir.

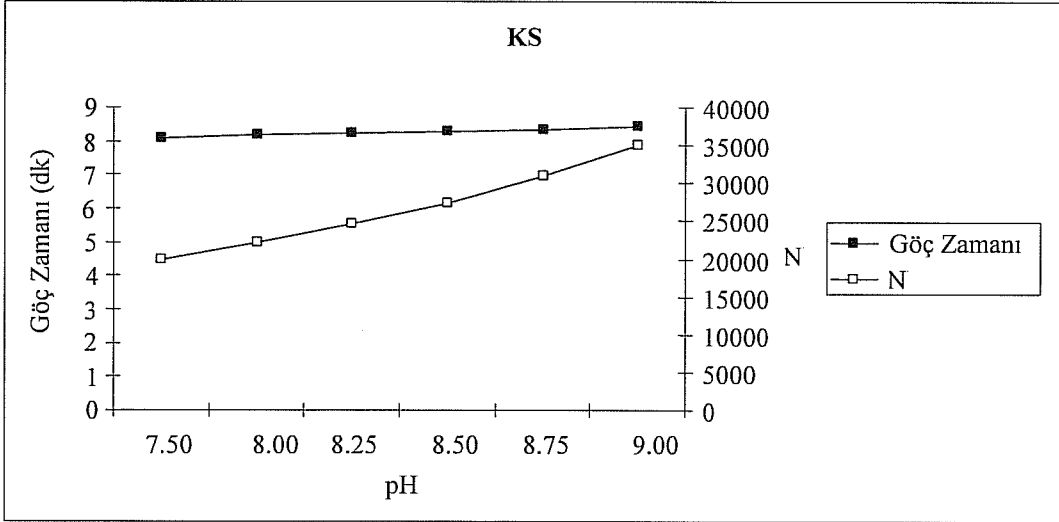
pH

Analiz için en iyi koşulların belirlenmesinde, çalışılacak ortamın pH'ı son derece önemlidir. Bunun için çalışma tamponunda borat derişimi 15 mM olacak şekilde ortamın pH'ı sırasıyla 7.50, 8.00, 8.25, 8.50, 8.75 ve 9.00'a ayarlanmıştır. Bu çalışma tamponunda ilgili madde karışımları 1 sn enjeksiyon süresi kullanılarak sisteme enjekte edilmiş, 25 kV potansiyel uygulanarak ayırım sağlanmıştır.

pH'ın, KSSL ve KS'nin göç zamanları ve bu maddeler için hesaplanan teorik tabaka sayıları üzerine etkileri **Şekil 23** ve **Şekil 24**'te sunulmuştur.



Şekil 23. Kandesartan Sileksetilin pH'a Karşı Göç Zamanı ve Teorik Tabaka Sayısı Değişimi



Şekil 24. Kandesartanın pH'a Karşı Göç Zamanı ve Teorik Tabaka Sayısı Değişimi

Şekil 23 ve 24'te görüldüğü gibi N değerleri pH'ya bağlı olarak artmakta, buna karşın göç zamanı pH ile önemli ölçüde değişmemektedir. Ayrıca genel olarak hem KSSL hem KS için birbirine benzer grafiksel özellik elde edilmiştir. pKa'sı sırasıyla 3.9 ve 6.0 olan KS ve KSSL, taranan tüm pH'larda tamamen iyonize olup elektroforetik kuvvetlerden beklenildiği gibi pKa'larına ters orantılı olarak etkilenmiştir. pH 8.75 ve pH 9.00'da KSSL ve KS'nin pik simetrisi bozulmuş, göç zamanları az ölçüde artmakla birlikte bozulan pik simetrisi nedeniyle pik alanları dolayısıyla N değerlerinde artış gözlenmiştir. Göç zamanının pH'a karşı sabit sayılabilecek davranışı pH 7.50-9.00 aralığında borat tamponunun ayırma amacıyla kullanılabilir özellikle olduğunu da göstermekle birlikte pH 8.50 değerinin üzerinde pik simetrisinin bozulmuş olması daha yüksek pH değerlerinin kullanımını sınırlandırmaktadır.

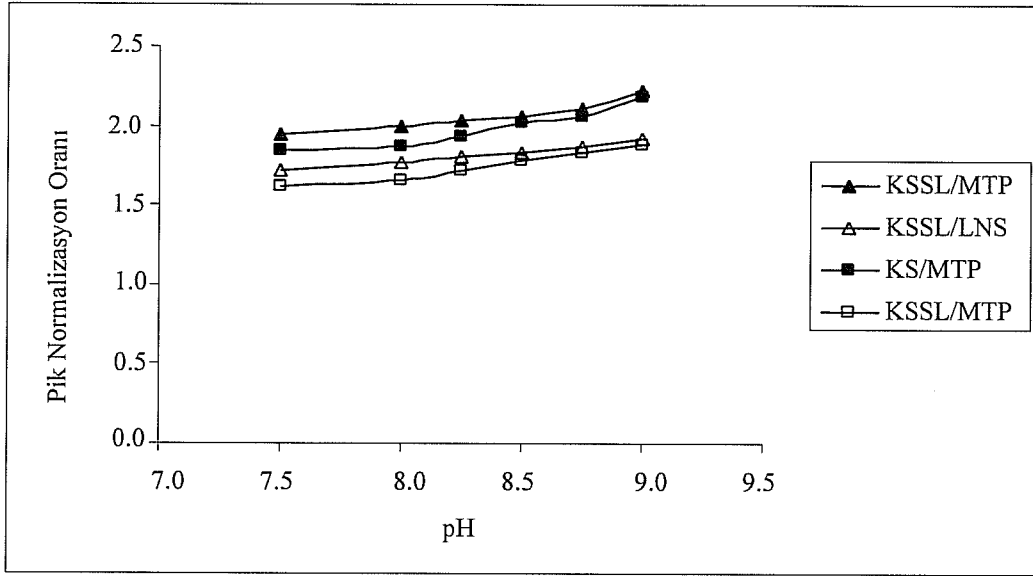
pH değişimine bağlı olarak KSSL, KS, MTP ve LNS'nin PNO kullanılarak yapılan istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 4'te verilmektedir.

Çizelge 4. pH'ın Maddelerin Pik Normalizasyon Oranı Üzerine Etkileri

pH		KSSL/MTP	KSSL/LNS	KS/MTP	KS/LNS
7.50	\bar{x} (n=3)	1.951	1.716	1.840	1.619
	ss	0.013	0.009	0.010	0.007
	% BSS	0.65	0.52	0.52	0.41
8.00	\bar{x} (n=3)	2.000	1.768	1.865	1.648
	ss	0.007	0.008	0.005	0.005
	% BSS	0.34	0.45	0.25	0.33
8.25	\bar{x} (n=3)	2.035	1.804	1.935	1.715
	ss	0.010	0.001	0.017	0.021
	% BSS	0.49	0.06	0.89	1.25
8.50	\bar{x} (n=3)	2.061	1.826	2.017	1.786
	ss	0.004	0.001	0.004	0.002
	% BSS	0.20	0.08	0.22	0.10
8.75	\bar{x} (n=3)	2.104	1.863	2.064	1.828
	ss	0.012	0.010	0.011	0.008
	% BSS	0.55	0.54	0.51	0.44
9.00	\bar{x} (n=3)	2.219	1.913	2.181	1.880
	ss	0.020	0.020	0.004	0.006
	% BSS	0.90	1.03	0.17	0.31

\bar{x} : Ortalama, n: Deney sayısı, ss: Standart sapma, % BSS: % Bağıl standart sapma

Çizelge 4'teki değerler kullanılarak elde edilen pH'a karşı PN oranlarının değişimine ilişkin grafiksel gösterim **Şekil 25**'te sunulmaktadır.



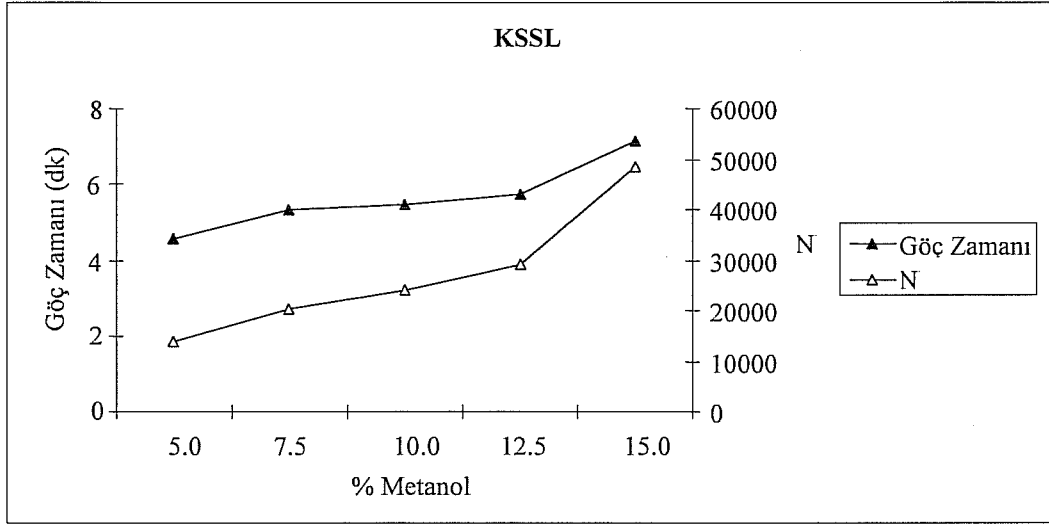
Şekil 25. pH'ın Maddelerin Pik Normalizasyon Oranı Üzerine Etkilerinin Grafikselleştirilmesi

pH 7.50'de, pKa'sı yaklaşık 8.00 olan LNS, Henderson-Hasselbach eşitliğine göre yeterince iyonize olamayarak elektroforetik kuvvetlerden etkilenmemiş ve kapilerde hızlı hareket ederek elektroozmozdan ayrılamamıştır. pH 8.00 ise, LNS'nin tamamen iyonlaşması için yeterince bazik olmadığından LNS, elektroozmozdan ayrılmış ancak pik morfolojisi beklenen özellikleri göstermemiştir. pH 8.00'den bazik pH'larda LNS tamamen iyonlaşmış ve elektroforetik çekilmeye uğrayarak elektroozmozdan sonra sinyal vermiştir. Yukarıda belirtildiği gibi, KS ve KSSL, taranan tüm pH'larda tamamen iyonize olup elektroforetik kuvvetlerden beklenildiği gibi pKa'larına ters orantılı olarak etkilenmiştir. pH 8.75 ve pH 9.00'da KSSL ve KS'nin pik simetrisi bozulması göç zamanları ve dolayısıyla alanları artmıştır. Kullanılan iki ayrı IS de dikkate alınarak yapılan değerlendirmeler sonucunda, uygun ayırım ve optimum analiz süresi ve buna bağlı olarak optimum pik morfolojisi pH değeri 8.50 olan borat tamponu ile elde edilmiştir.

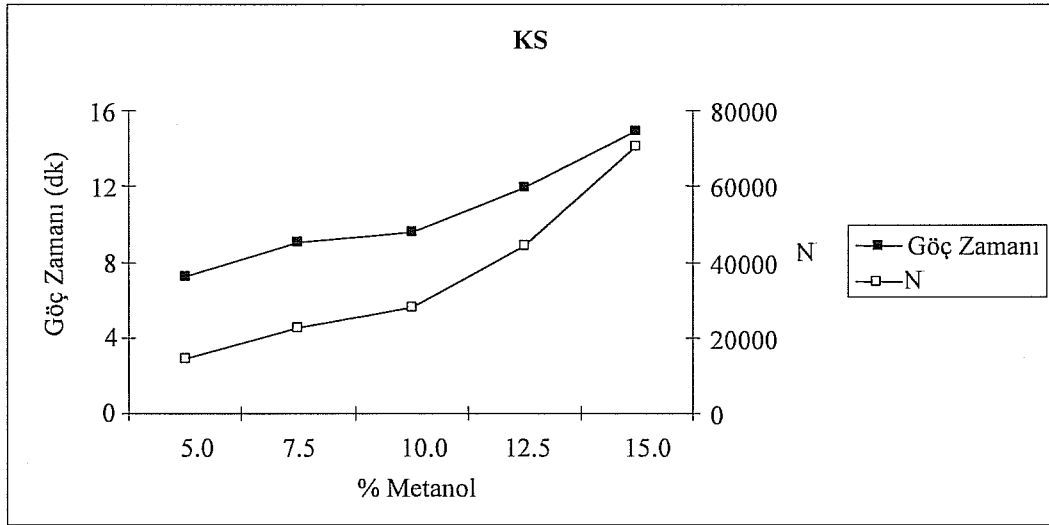
Organik çözücü yüzdesi

KE'de çalışma tamponunda organik çözücü bulundurulmasının nedeni ortam viskozitesini ayarlamak ve analiz edilecek maddelerin çalışma tamponunda çökme olasılığını önlemektir. Bu amaçla çalışma tamponuna organik çözücü katılması düşünülmüş ve organik çözücü olarak KS ve KSSL'nin çözücüsü olan metanol kullanılmıştır. pH 8.50, 15 mM borat ve % 5.0, 7.5, 10.0, 12.5 ve 15.0 (h/h) oranlarında metanol içeren çalışma tamponları ile 25 kV potansiyel altında, 1 sn enjeksiyon süresi ile örnekler sisteme enjekte edilmiştir.

Çalışma tamponuna eklenen organik çözücü miktarının, KSSL ve KS'nin göç zamanları ve bu maddeler için hesaplanan teorik tabaka sayıları üzerine etkileri **Şekil 26** ve **Şekil 27**'de sunulmuştur.



Şekil 26. Kandesartan Sileksetilin Organik Çözücü Yüzdesine Karşı Göç Zamanı ve Teorik Tabaka Sayısı Değişimi



Şekil 27. Kandesartanın Organik Çözücü Yüzdesine Karşı Göç Zamanı ve Teorik Tabaka Sayısı Değişimi

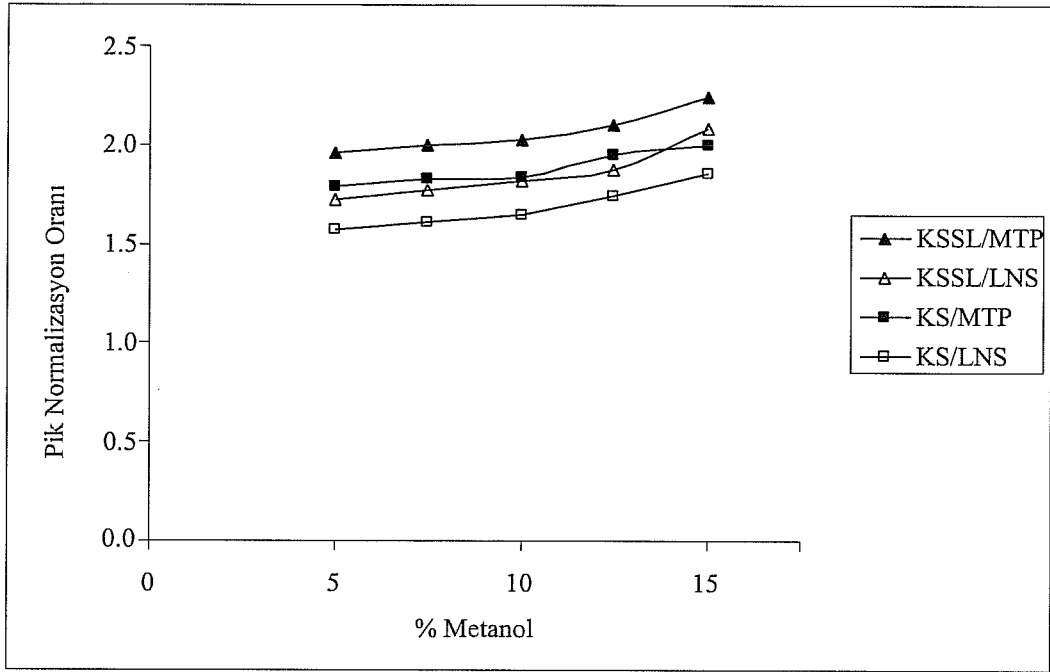
Şekil 26 ve 27'de görüldüğü gibi, metanol yüzdesinin artışına bağlı olarak hem pik alanlarında hem de göç zamanlarında artış ve benzer grafiksel karakter gözlenmiştir. Metanol yüzdesinin 7.5 ve 10 (h/h) olduğu sistemde önemli bir kararlılık gözlenmiş ancak % 10'dan (h/h) daha yüksek metanol yüzdeli taşıyıcı sistemlerde pik morfolojileri bozulmuştur.

Metanol yüzdesine bağlı olarak KSSL, KS, MTP ve LNS'nin PNO kullanılarak yapılan istatistiksel değerlendirmeleri Çizelge 5'te gösterilmektedir.

Çizelge 5. Organik Çözücü Yüzdesinin (h/h) Maddelerin Pik Normalizasyon Oranı Üzerine Etkileri

Metanol (%)		KSSL/MTP	KSSL/LNS	KS/MTP	KS/LNS
5.0	\bar{x} (n=3)	1.964	1.723	1.789	1.569
	ss	0.011	0.013	0.007	0.008
	% BSS	0.57	0.74	0.39	0.51
7.5	\bar{x} (n=3)	1.996	1.768	1.823	1.614
	ss	0.005	0.010	0.011	0.009
	% BSS	0.23	0.57	0.62	0.54
10.0	\bar{x} (n=3)	2.025	1.815	1.835	1.644
	ss	0.010	0.016	0.003	0.022
	% BSS	0.48	0.86	0.16	1.31
12.5	\bar{x} (n=3)	2.098	1.873	1.952	1.743
	ss	0.014	0.016	0.016	0.018
	% BSS	0.65	0.85	0.80	1.05
15.0	\bar{x} (n=3)	2.249	2.088	2.001	1.858
	ss	0.027	0.049	0.009	0.055
	% BSS	1.18	2.34	0.43	2.94
\bar{x} : Ortalama, n: Deney sayısı, ss: Standart sapma, % BSS: % Bağıl standart sapma					

Çizelge 5'teki değerler kullanılarak elde edilen değişim Şekil 28'de sunulmaktadır.



Şekil 28. Organik Çözücü Yüzdesinin Maddelerin Pik Normalizasyon Oranı Üzerine Etkilerinin Grafikselsel Gösterimi

Şekil 28’de görüldüğü gibi, PN oranları kullanılarak yapılan değerlendirmelerde metanol yüzdesinin artışına bağlı olarak hem pik alanlarında hem de göç zamanlarında artış gözlenmiştir. Metanol yüzdesinin 7.5 ve 10 (h/h) olduğu ortamda Çizelge 5’te görüleceği gibi % BSS değerlerinde elde edilen önemli bir kararlılık gözlenmiş ancak % 10’dan (h/h) daha yüksek metanol yüzdeleri taşıyıcı sistemlerde pik morfolojileri bozulmuştur.

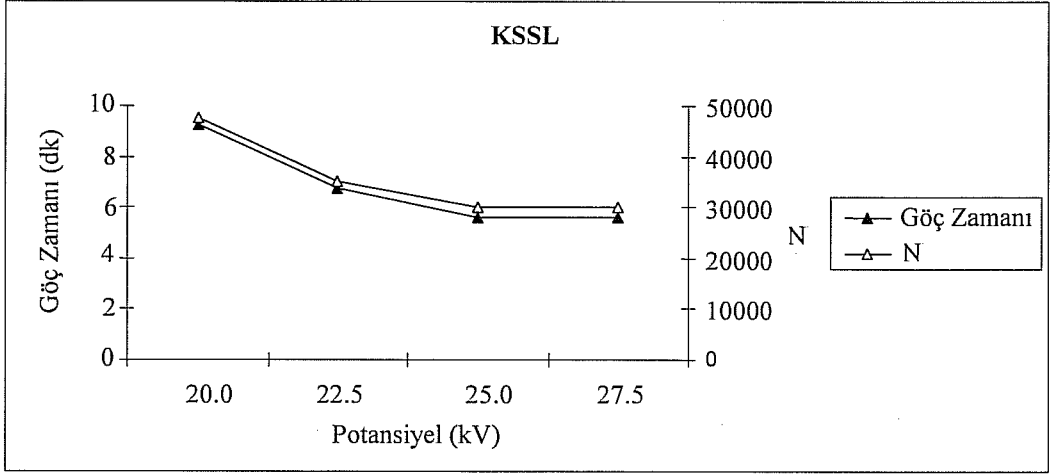
Aynı deneysel kısım organik çözücü olarak asetonitril kullanılarak da denenmiştir. Çalışma tamponuna % 5 (h/h) oranında asetonitril eklenerek gerçekleştirilen analizlerde, göç zamanlarının kabul edilemeyecek düzeylerde (> 16 dk) arttığı gözlenmiştir. Dolayısıyla daha yüksek oranda asetonitril içeren çalışma tamponları denenmemiştir.

Yukarıda belirtilen nedenler ile bu çalışmada çalışma tamponu bileşiminde organik çözücü olarak metanolün bulunmasına ve % 10 (h/h) düzeyindeki metanol içeriğinin iyi bir ayırım için yeterli olduğuna karar verilmiştir.

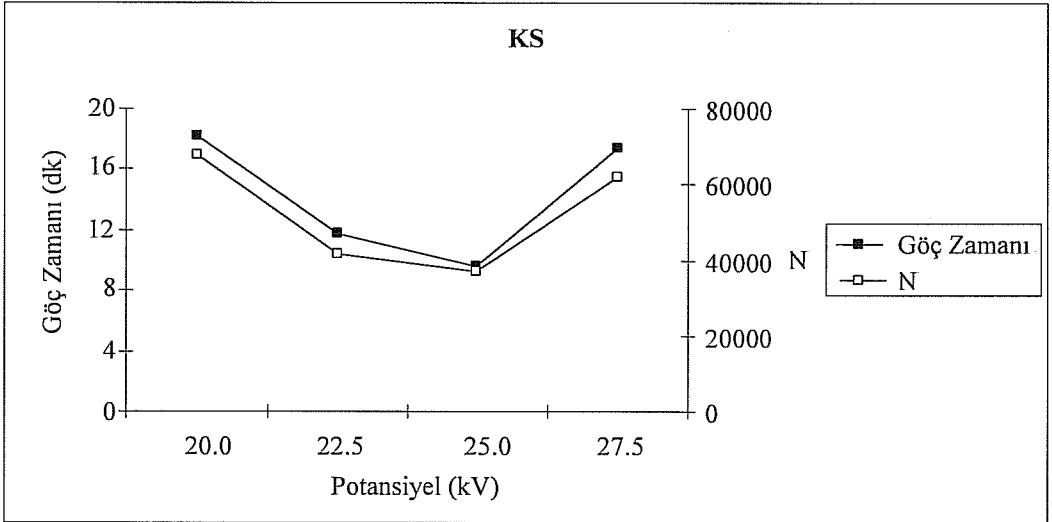
Uygulanan potansiyel

KE’de uygulanacak voltajın mümkün olan en yüksek voltaj olması istenir. Fakat bu durum aynı zamanda Joule ısınması problemine neden olur (Baker, 1995). Ayrıca, uygulanan voltaj bu çalışmada kullanılan dört maddenin ayrılması için iyi bir ayırım parametresidir. Optimum voltajı belirlemek için 15 mM borat tamponu, pH 8.50 ve % 10 (h/h) metanol içeren çalışma tamponuna 1 saniyelik yükleme ile 20.0, 22.5, 25.0, 27.5 ve 30.0 kV potansiyel uygulanarak KSSL, KS, MTP ve LNS’nin ayırımı incelenmiştir.

Uygulanan potansiyelin KSSL ve KS’nin göç zamanları ve bu maddeler için hesaplanan teorik tabaka sayıları üzerine etkileri Şekil 29 ve Şekil 30’da sunulmuştur.



Şekil 29. Kandesartan Sileksetilin Uygulanan Potansiyele Karşı Göç Zamanı ve Teorik Tabaka Sayısı Değişimi



Şekil 30. Kandesartanın Uygulanan Potansiyele Karşı Göç Zamanı ve Teorik Tabaka Sayısı Değişimi

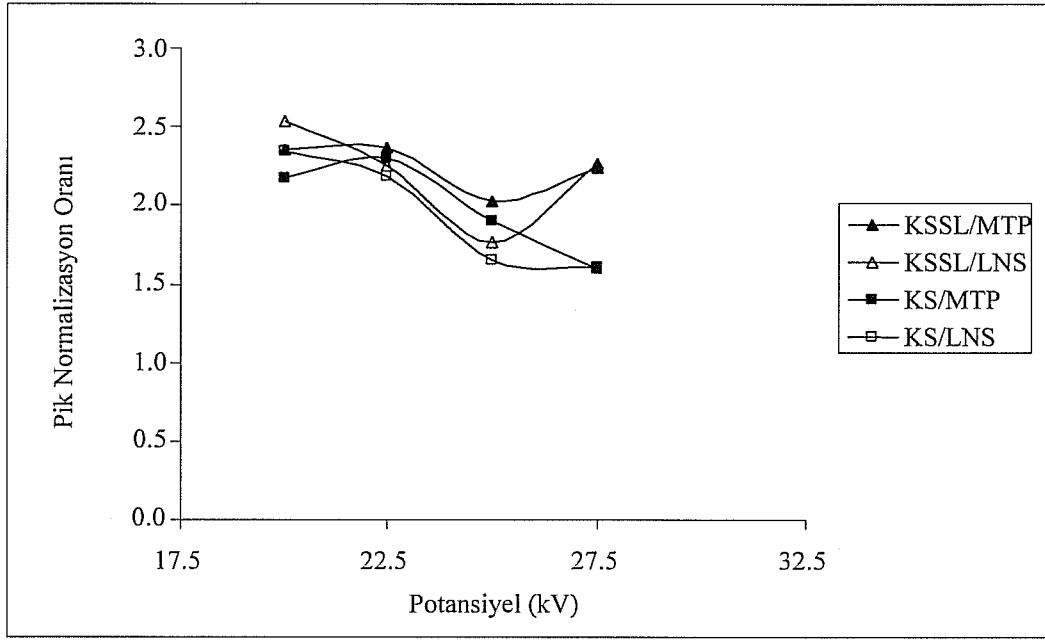
Şekil 29 ve 30'da görüldüğü gibi, artan potansiyele karşı göç zamanı ve teorik tabaka sayısı değerleri benzer şekilde yanıt üretmiştir. KSSL için potansiyel değerleri artırıldığında göç zamanı ve pik alanında azalma gözlenmiş olmasına karşın, KS 25 kV üzerinde potansiyel uygulandığında göç zamanı ve pik alanlarında artan bir yanıt vermiştir.

Elde edilen elektroferogramlardan, 20 - 30 kV aralığında uygulanan potansiyellere bağlı olarak KSSL, KS, MTP ve LNS'nin PNO'nun değişimi Çizelge 6'da verilmektedir.

Çizelge 6. Uygulanan Potansiyelin Maddelerin Pik Normalizasyon Oranı Üzerine Etkileri

Potansiyel (kV)		KSSL/MTP	KSSL/LNS	KS/MTP	KS/LNS
20.0	\bar{x} (n=3)	2.357	2.536	2.175	2.340
	ss	0.019	0.031	0.022	0.026
	% BSS	0.80	1.24	1.01	1.12
22.5	\bar{x} (n=3)	2.361	2.247	2.297	2.187
	ss	0.036	0.013	0.056	0.071
	% BSS	1.52	0.58	2.46	3.23
25.0	\bar{x} (n=3)	2.023	1.763	1.903	1.658
	ss	0.022	0.027	0.013	0.007
	% BSS	1.10	1.51	0.66	0.44
27.5	\bar{x} (n=3)	2.246	2.260	1.595	1.605
	ss	0.052	0.030	0.041	0.053
	% BSS	2.31	1.31	2.59	3.31
\bar{x} : Ortalama, n: Deney sayısı, ss: Standart sapma, % BSS: % Bağıl standart sapma					

30 kV potansiyel altında KS elektroferogramda belirmemiş ve bu nedenle yalnız 2 enjeksiyon yapılmıştır. Dolayısı ile bu voltaj değeri için istatistiksel değerlendirme yapılamamıştır. Çizelge 6'daki değerler kullanılarak elde edilen değişim Şekil 31'de sunulmaktadır.



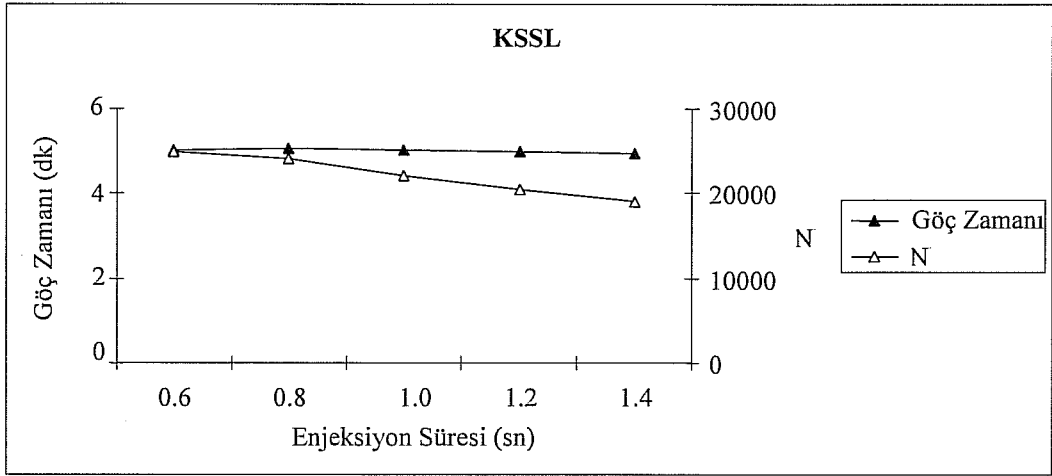
Şekil 31. Uygulanan Potansiyelin Maddelerin Pik Normalizasyon Oranı Üzerine Etkilerinin Grafikselsel Gösterimi

PNO, 20 – 25 kV'lar arasında bir azalma göstermiş, 25 kV'tan sonra yeniden artmıştır. Çalışmada kullanılabilen en yüksek potansiyel KSSL, KS, MTP ve LNS'nin en kısa sürede beliren pikler verdiği potansiyel değeri 25 kV olarak gözlenmiştir. Buna ek olarak, bu potansiyelde tekrarlanabilir göç zamanı ve sinyal şiddetlerinin gözlenmesi, Joule ısınmasının, bileşenleri göz ardı edilebilir düzeyde etkilediği sonucuna varılmasına neden olmuştur. Bu nedenlerle, çalışmada 25 kV potansiyelin kullanılmasına karar verilmiştir.

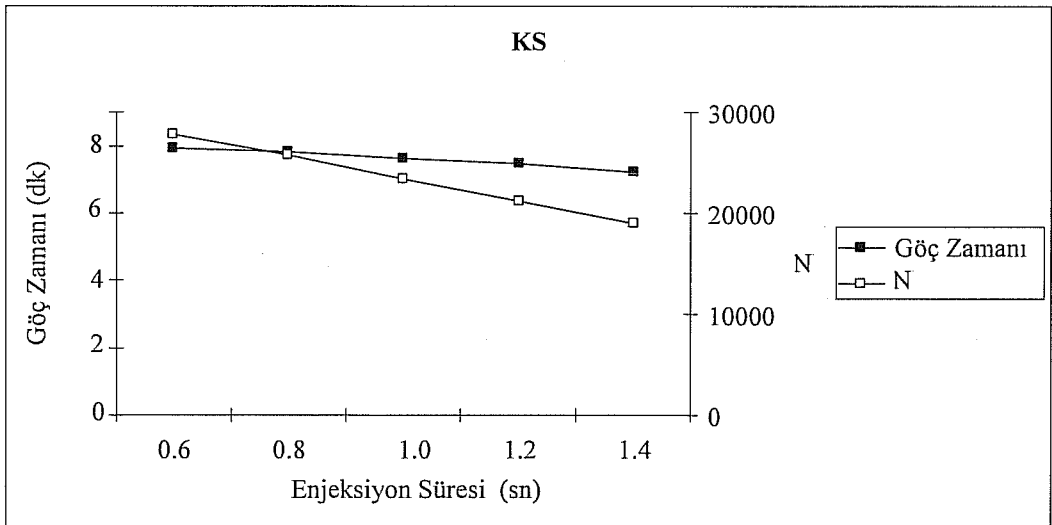
Enjeksiyon süresi

Örneklerin sisteme yüklenme süresi pik alanları ve morfolojilerini değiştireceği için incelenmesi gereken bir parametredir. Örnekler, 15 mM borat, % 10 (h/h) metanol içeren pH 8.50 çalışma tamponu ile 25 kV potansiyel altında, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 ve 1.4 saniyelik sürelerde sisteme enjekte edilmiştir.

Enjeksiyon süresinin KSSL ve KS'nin göç zamanları ve bu maddeler için hesaplanan teorik tabaka sayıları üzerine etkileri Şekil 32 ve Şekil 33'te sunulmuştur.



Şekil 32. Kandesartan Sileksetilin Enjeksiyon Süresine Karşı Göç Zamanı ve Teorik Tabaka Sayısı Değişimi



Şekil 33. Kandesartanın Enjeksiyon Süresine Karşı Göç Zamanı ve Teorik Tabaka Sayısı Değişimi

Uzun enjeksiyon sürelerinde, örnekler kapilere aşırı yüklendiğinden beklenildiği gibi piklerin simetrisi bozulmuş ve pik tabanlarının genişlediği gözlenmiştir. Bu da ayırımı olumsuz yönde etkilemiştir. Şekil 32 ve 33'te görüleceği gibi elde edilen bu sonuç enjeksiyon süresine karşı N grafiklerine azalan bir ilişki olarak yansımıştır.

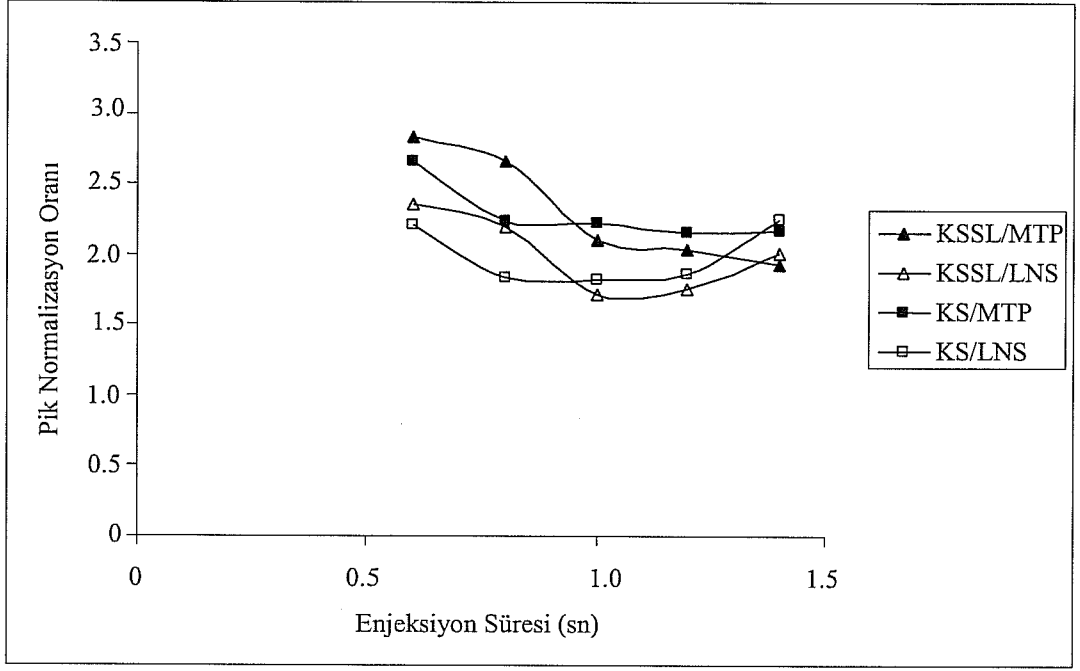
Enjeksiyon süresinin KSSL, KS, MTP ve LNS'nin PNO üzerine etkileri ile ilgili istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 7'de gösterilmiştir.

Çizelge 7. Enjeksiyon Süresinin Maddelerin Pik Normalizasyon Oranı Üzerine Etkileri

Enjeksiyon Süresi (sn)		KSSL/MTP	KSSL/LNS	KS/MTP	KS/LNS
0.6	\bar{x} (n=3)	2.839	2.356	2.667	2.213
	ss	0.038	0.013	0.054	0.007
	% BSS	1.35	0.57	2.01	0.32
0.8	\bar{x} (n=3)	2.659	2.193	2.231	1.840
	ss	0.013	0.017	0.009	0.004
	% BSS	0.48	0.78	0.41	0.20
1.0	\bar{x} (n=3)	2.103	1.720	2.229	1.824
	ss	0.006	0.007	0.014	0.003
	% BSS	0.30	0.40	0.63	0.16
1.2	\bar{x} (n=3)	2.034	1.759	2.156	1.864
	ss	0.013	0.014	0.003	0.003
	% BSS	0.64	0.81	0.15	0.15
1.4	\bar{x} (n=3)	1.932	2.003	2.172	2.252
	ss	0.004	0.010	0.050	0.062
	% BSS	0.19	0.50	2.31	2.76

\bar{x} : Ortalama, n: Deney sayısı, ss: Standart sapma, % BSS: % Bağlı standart sapma

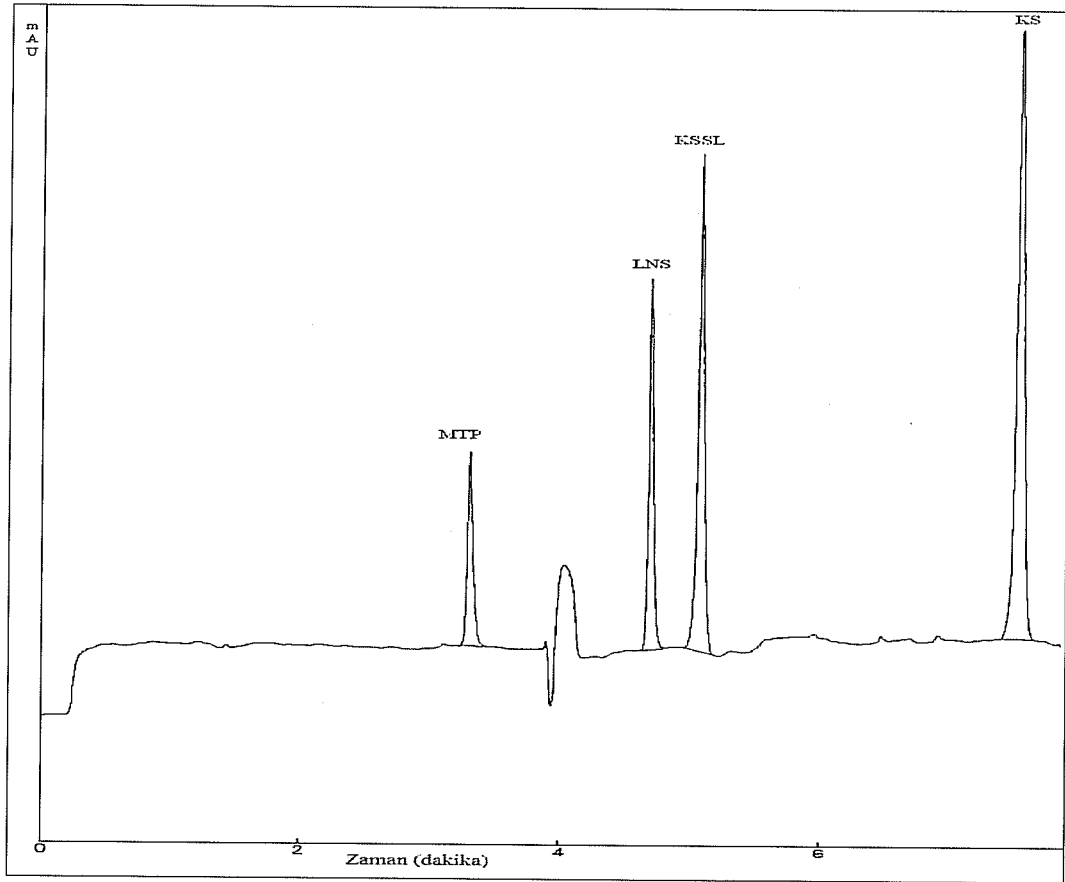
Çizelge 7'deki değerler kullanılarak elde edilen değişim Şekil 34'te sunulmaktadır.



Şekil 34. Enjeksiyon Süresinin Maddelerin Pik Normalizasyon Oranı Üzerine Etkilerinin Grafikselsel Gösterimi

Uzun enjeksiyon sürelerinde, örnekler kapilere aşırı yüklendiğinden piklerin simetriteri bozulmuş ve pik tabanlarının genişlediği gözlenmiştir. Bu da ayırımı olumsuz yönde etkilemiştir. **Çizelge 7'**de görüldüğü gibi PNO'nun en uygun % BSS değerleri, her bir PNO için 1.0 sn enjeksiyon süresinde elde edilmiştir. Bu nedenlerle, çalışmada kullanılacak enjeksiyon süresi olarak 1.0 saniyeye karar verilmiştir.

Sonuç olarak, yapılan deneyler ile KE yöntemi ile KSSL ve KS analizi için en uygun koşullar, 15 mM borat, % 10 (h/h) metanol içeren, pH'ı 8.50 olan çalışma tamponunda, 25 kV potansiyel ve 1 sn enjeksiyon süresi olacak şekilde belirlenmiştir. Belirtilen optimum koşullar altında alınan bir elektroferogram **Şekil 35'**te sunulmaktadır.



Şekil 35. Maddelerin Optimum Koşullarda Elde Edilen Elektroferogramı

Belirtilen optimum koşullar altında KSSL'nin 5.1 dk ve KS'nin 7.5 dk göç zamanına sahip olduğu gözlenmiştir. Çalışmada IS olarak kullanılan MTP 3.3 dakikada ve LNS 4.7 dakikada belirlemiştir. En yüksek akımın 200 μ A olarak kontrol edildiği sistemde analiz sırasında 59 μ A akım gözlenmiştir. 15 mM borat, % 10 (h/h) metanol içeren, pH'ı 8.50 olan çalışma tamponu için elektroozmotik hareketlilik $1.02 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sn.V}$ olarak bulunmuştur. Bu koşullar altında, elektroforetik hareketlilik, KSSL için $-1.15 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{sn.V}$, KS için $-2.45 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{sn.V}$, MTP için $1.13 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{sn.V}$ ve LNS için $-8.31 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sn.V}$ olarak hesaplanmıştır.

Validasyon

Optimum koşullar belirlendikten sonra kapiler elektroforetik yöntemin geçerliliğinin gösterilebilmesi amacıyla kararlılık, doğrusallık, tekrarlanabilirlik, duyarlılık, tutarlılık, sağlamlık, doğruluk ve seçicilik parametreleri incelenmiştir. Sistemin uygunluğunu göstermek amacıyla N, Rs, k' ve α parametreleri hesaplanarak sistem uygunluk testleri yapılmıştır.

Kararlılık

Geliştirilen KE yönteminde kullanılan standart maddelerin kararlılıkları, taze çözelti ile alüminyum folyo ile sarılı halde +4 °C'de 24 saat ve 1 ay bekletilen çözeltiler karşılaştırılarak incelenmiştir. Taze hazırlanan çözelti ile 24 saat ve 1 ay bekletilen çözeltilerin, IS'lere karşı hesaplanan PNO değerleri kullanılarak yapılan

istatistiksel değerlendirmeleri **Çizelge 8**'de verilmiştir. Sonuçlar Friedman testi ile karşılaştırılmıştır.

Çizelge 8. Kapiler Elektroforez Yöntemi ile Kandesartan Sileksetil ve Kandesartanın Kararlılık Verileri

		KSSL/MTP	KSSL/LNS	KS/MTP	KS/LNS
Taze çözelti	\bar{x} (n=3)	2.19	1.78	2.40	1.96
	ss	0.010	0.011	0.016	0.014
	% BSS	0.41	0.64	0.69	0.72
24 saat	\bar{x} (n=3)	2.18	1.79	2.38	1.95
	ss	0.012	0.003	0.010	0.012
	% BSS	0.58	0.16	0.44	0.64
1 ay	\bar{x} (n=3)	2.18	1.77	2.39	1.95
	ss	0.013	0.005	0.015	0.006
	% BSS	0.59	0.31	0.63	0.32

\bar{x} : Ortalama, n: Deney sayısı, ss: Standart sapma, % BSS: % Bağıl standart sapma

Çizelge 8'deki veriler kullanılarak Friedman testine göre yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda ortalamalar arasındaki farkın önemsiz olduğu ve P değerlerinin 0.05'ten oldukça büyük olduğu bulunmuştur. Kesinliği gösteren % BSS değerleri ise % 2'nin oldukça altındadır. KSSL ve KS'nin 1 ay boyunca +4 °C'de ve alüminyum folyoya sarılı halde kararlı oldukları söylenebilir. Çalışmada kullanılan standart maddelerin analiz süreleri dışında, alüminyum folyoya sarılı halde +4 °C'de saklanmalarına karar verilmiştir.

Doğrusallık

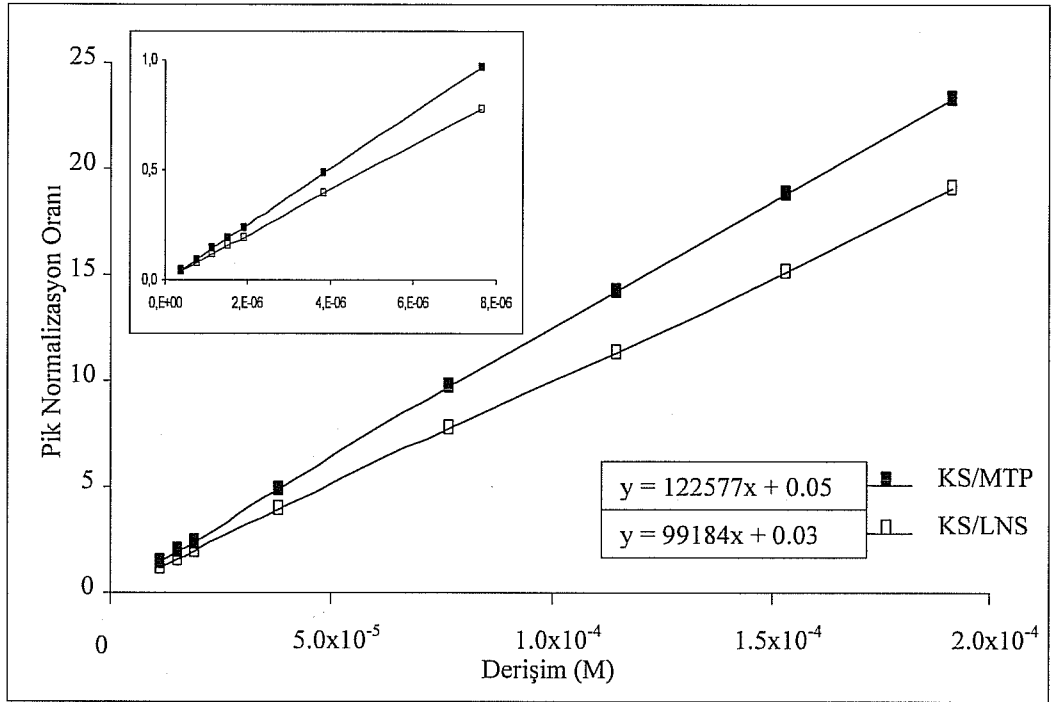
Yöntemin doğrusal olduğu aralığın belirlenebilmesi için KSSL'nin 3.76×10^{-7} – 1.88×10^{-4} M ve KS'nin 3.83×10^{-7} – 1.92×10^{-4} M derişim aralıklarındaki 15 farklı derişimde çözeltileri hazırlanarak sisteme enjekte edilmiştir. Bu enjeksiyonlar sonucu, maddelerin IS'lere karşı PNO kullanılarak yapılan istatistiksel değerlendirmeleri **Çizelge 9**'da sunulmaktadır.

Çizelge 9. Kapiler Elektroforez Yönteminin Doğrusallık Verileri

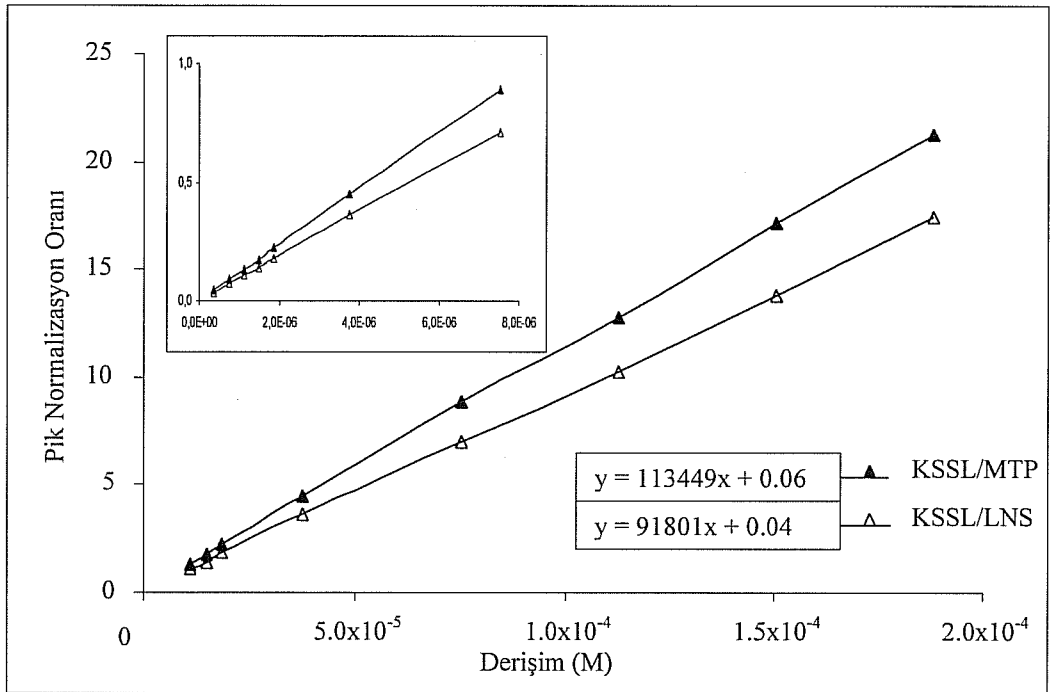
	KS/MTP	KS/LNS	KSSL/MTP	KSSL/LNS
a	122577	99184	113449	91801
b	0.05	0.03	0.06	0.04
r	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999

a: Eğim, b: Kesim, r: Korelasyon katsayısı

Çizelge 9'da belirtildiği gibi KS ve KSSL için her iki IS ile ilgili PNO hesaplandığında, belirtilen derişim aralıklarında yüksek korelasyonlu doğrular elde edilmiştir. KS ve KSSL için bu derişim aralıklarında elde edilen doğrular **Şekil 36** ve **37**'de sunulmaktadır.



Şekil 36. Kapiler Elektroforez Yönteminin Kandesartan İçin Doğrusallığının Grafikselleştirilmesi



Şekil 37. Kapiler Elektroforez Yönteminin Kandesartan Sileksetil İçin Doğrusallığının Grafikselleştirilmesi

Yöntemin doğrusal olduğu aralık dikkate alınarak KSSL için $1.88 \times 10^{-6} - 9.41 \times 10^{-5}$ M ve KS için $1.91 \times 10^{-6} - 9.58 \times 10^{-5}$ M derişim aralıklarında 6 farklı çözelti ile oluşturulan kalibrasyon setlerinin gün içi ve günler arası doğrusallığını

incelemek için 3 farklı günde analizleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmeleri **Çizelge 10'** da sunulmaktadır.

Çizelge 10. Kapiler Elektroferez Yönteminin Kalibrasyon Verileri

		Gün İçi			Günler Arası
		I. gün (n=6)	II. gün (n=6)	III. gün (n=6)	Tüm Günler (n=18)
KS/MTP	a	204600	205500	205400	205200
	b	-0.1037	-0.1149	-0.05777	-0.09210
	r	0.9999	0.9999	0.9998	0.9999
	ss a	1148	1368	1219	1491
	ss b	0.0201	0.0240	0.0214	0.0262
	Sy.x	0.0187	0.0223	0.0198	0.0486
	GAa (% 95)	± 1300	± 1550	± 1350	± 1580
	GAb (% 95)	± 0.0560	± 0.0667	± 0.0577	± 0.0706
KS/LNS	a	175300	177400	175800	176200
	b	-0.0820	-0.1081	-0.0780	-0.0893
	r	0.9999	0.9999	0.9998	0.9999
	ss a	1375	1461	1621	2002
	ss b	0.0246	0.0262	0.0469	0.0448
	Sy.x	0.0229	0.0243	0.0431	0.0653
	GAa (% 95)	± 1600	± 1650	± 3000	± 4242
	GAb (% 95)	± 0.0685	± 0.0727	± 0.0779	± 0.0947
KSSL/MTP	a	200200	199100	199300	199500
	b	0.1418	0.1430	0.1669	0.1505
	r	0.9999	0.9998	0.9999	0.9999
	ss a	1036	1719	1589	2476
	ss b	0.0313	0.0519	0.0479	0.0512
	Sy.x	0.0290	0.0481	0.0445	0.0748
	GAa (% 95)	± 2050	± 3400	± 3150	± 5750
	GAb (% 95)	± 0.1596	± 0.1376	± 0.1332	± 0.222
KSSL/LNS	a	178900	178500	175400	177600
	b	-0.0453	-0.0255	-0.0034	-0.0247
	r	0.9999	0.9998	0.9999	0.9999
	ss a	1139	1604	1083	2371
	ss b	0.0207	0.0282	0.0191	0.0312
	Sy.x	0.0186	0.0263	0.0177	0.0716
	GAa (% 95)	± 2240	± 3260	± 2400	± 3200
	GAb (% 95)	± 0.1813	± 0.1029	± 0.1010	± 0.2146

a: Eğim, b: Kesim, r: Korelasyon katsayısı, ss a: Eğimin standart sapması, ss b: Kesimin standart sapması, Sy.x: Kalibrasyon eğrisinin standart sapması, GAa: % 95 olasılıkla eğimin güven aralığı, GAb: % 95 olasılıkla kesimin güven aralığı

Çizelgeden de görüldüğü gibi gün içi ve günler arası değerlendirmelerde, her iki madde ve IS ikilisi için yüksek korelasyonlu kalibrasyon doğruları elde edilmiştir.

Geliştirilen KE yöntemine ait kalibrasyon eğrisinin doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü için yapılan istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 11 ve 12'de verilmektedir. Korelasyon katsayısının önem kontrolü ve doğrusallıktan ayrılış önem kontrolüne ait istatistiksel hesaplamalar Ek-1'de sunulmuştur.

Çizelge 11. Kapiler Elektroforez Yöntemine Ait Kalibrasyon Eğrisinin Korelasyon Katsayısının Önem Kontrolü

	KS/MTP	KS/LNS	KSSL/MTP	KSSL/LNS
n	8	8	8	8
r	0.9999	0.9998	0.9999	0.9994
Sr	0.0049	0.0086	0.0050	0.0136
t _{hesap}	202.52	116.60	199.31	73.45
t _{tablo}	2.45	2.45	2.45	2.45
n: Deney sayısı, r: Korelasyon katsayısı, Sr: Korelasyon katsayısının standart hatası				

Korelasyon katsayısının önem kontrolü için yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda, hesaplanan t değerinin, tablodan bulunan t değerinden büyük olduğu ve bu nedenle kalibrasyon eğrisi için bulunan r değerinin tesadüfi olmadığı görülmüştür.

Çizelge 12. Kapiler Elektroforez Yöntemine Ait Kalibrasyon Eğrisinin Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü

	KS/MTP	KS/LNS	KSSL/MTP	KSSL/LNS
RKT	289.29	228.06	294.39	232.22
YOAKT	289.33	228.16	294.43	232.47
RAKT	4.23×10^{-2}	1.00×10^{-1}	4.45×10^{-2}	2.58×10^{-1}
RAKO	7.05×10^{-3}	1.67×10^{-2}	4.71×10^{-3}	4.30×10^{-2}
RKO	289.29	228.06	294.39	232.22
F _{hesap}	4.10×10^4	1.36×10^4	3.97×10^4	5.39×10^3
F _{tablo}	5.99	5.99	5.99	5.99
RKT: Regresyon kareler toplamı, YOAKT: Y ortalamadan ayrılış kareler toplamı, RAKT: Regresyondan ayrılış kareler toplamı, RAKO: Regresyondan ayrılış kareler ortalaması, RKO: Regresyon kareler ortalaması				

Doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü için yapılan hesaplamalar sonucunda bulunan F değerinin, tablodan bulunan F değerinden büyük olduğu görülmüş ve dolayısı ile derişim ile detektör yanıtı arasındaki ilişkinin doğrusal olduğuna karar verilmiştir.

Tekrarlanabilirlik

KE yöntemi için kesinlik, yöntem tekrarlanabilirliği ve cihaz tekrarlanabilirliği olmak üzere iki başlıkta incelenmiştir.

Yöntemin kesinliğinin belirlenmesi için 9.58×10^{-6} M KS, 9.41×10^{-6} M KSSL, 2.01×10^{-5} M MTP ve 1.47×10^{-5} M LNS içeren 3 grup çözelti hazırlanmıştır. Bu grupların her biri 3 farklı günde 6 kez sisteme enjekte edilerek yöntemin tekrarlanabilirliği araştırılmıştır. Yöntemin kesinliği ile ilgili yapılan istatistiksel hesaplamalar **Çizelge 13**'te verilmektedir.

Çizelge 13. Kapiler Elektroforez Yönteminin Tekrarlanabilirlik Verileri

		KSSL/MTP	KSSL/LNS	KS/MTP	KS/LNS
I. gün (n=6)	\bar{x}	1.055	0.883	1.131	0.946
	ss	0.015	0.009	0.015	0.009
	% BSS	1.41	0.99	1.30	0.93
	GA (% 95)	1.055 ± 0.012	0.883 ± 0.007	1.31 ± 0.012	0.946 ± 0.007
II. gün (n=6)	\bar{x}	1.060	0.889	1.133	0.950
	ss	0.011	0.010	0.016	0.008
	% BSS	1.06	1.17	1.40	0.86
	GA (% 95)	1.060 ± 0.009	0.889 ± 0.009	1.133 ± 0.013	0.950 ± 0.007
III. gün (n=6)	\bar{x}	1.071	0.880	1.132	0.930
	ss	0.0016	0.015	0.017	0.009
	% BSS	1.53	1.72	1.52	0.94
	GA (% 95)	1.071 ± 0.013	0.880 ± 0.012	1.132 ± 0.014	0.930 ± 0.007
Tüm günler (n=18)	\bar{x}	1.062	0.884	1.132	0.942
	ss	0.015	0.012	0.015	0.012
	% BSS	1.43	1.31	1.33	1.27
	GA (% 95)	1.062 ± 0.006	0.884 ± 0.005	1.132 ± 0.006	0.942 ± 0.005

n: Deney sayısı, \bar{x} : Ortalama, ss: Standart sapma, % BSS: % Bağıl standart sapma, GA: % 95 olasılıkla güven aralığı

Yöntemin kesinlik verilerini belirten **Çizelge 13**'te gün içi ve günler arası % BSS oranlarının % 2'nin altında olduğu görülmektedir ve bu da yapılan analizlerin kesinliğinin bir ölçüsüdür.

Cihaz tekrarlanabilirliğinin incelenmesi için hazırlanan 9.58×10^{-6} M KS, 9.41×10^{-6} M KSSL, 2.01×10^{-5} M MTP ve 1.47×10^{-5} M LNS içeren standart örneğin,

10 kez sisteme enjekte edilmesiyle elde edilen analiz sonuçlarına göre, PNO kullanılarak yapılan hesaplamalar **Çizelge 14**'te verilmektedir.

Çizelge 14. Kapiler Elektroferez Cihazının Tekrarlanabilirlik Verileri

	KSSL/MTP	KSSL/LNS	KS/MTP	KS/LNS
\bar{x} (n=10)	0.135	0.944	1.065	0.885
ss	0.014	0.011	0.007	0.008
% BSS	1.27	1.19	0.72	0.93
GA (% 95)	0.135 ± 0.008	0.944 ± 0.006	1.065 ± 0.004	0.885 ± 0.005
\bar{x} : Ortalama, n: Deney sayısı, ss: Standart sapma, % BSS: % Bağıl standart sapma, GA: % 95 olasılıkla güven aralığı				

KE cihazının tekrarlanabilirliği için yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda % 2'nin altında % BSS değerleri bulunmuş ve cihaz kesinliği gösterilmiştir.

Duyarlılık

Kapiler elektroforetik yöntemin duyarlılığını belirlemek amacıyla LOD ve LOQ değerleri, **Eşitlik 1** ve **Eşitlik 2** kullanılarak hesaplanmıştır. **Çizelge 15**'te KSSL ve KS'nin her iki IS'ye göre PNO değerleri dikkate alınarak bulunan LOD ve LOQ değerleri sunulmaktadır.

Çizelge 15. Kapiler Elektroferez Yönteminin Gözlenebilme ve Alt Tayin Sınırları

	KS/MTP	KS/LNS	KSSL/MTP	KSSL/LNS
LOD (M)	3.02x10 ⁻⁷	4.31x10 ⁻⁷	4.79x10 ⁻⁷	3.85x10 ⁻⁷
LOQ (M)	9.15x10 ⁻⁷	1.3x10 ⁻⁶	1.45x10 ⁻⁶	1.17x10 ⁻⁶
LOD: Gözlenebilme sınırı, LOQ: Alt tayin sınırı				

Kaynaklarda (Hillaert ve Van den Bossche, 2002; Hillaert ve ark, 2003; Zhang ve ark., 2006) KE yöntemi ile yapılan analizlerde özellikle KS'nin başarılı bir kantitatif tayinine rastlanmamıştır. Hillaert ve Van den Bossche (2002), KE ile ARA-II'lerin ayırımını gerçekleştirdikleri çalışmada, KS'nin asidik ortamdaki düşük çözünürlüğü nedeniyle KS'yi kantitatif tayine uygun bulmamışlardır. Hillaert ve ark.'nın (2003), altı ARA II'nin ayırımını miselsi elektrokinetik kapiler kromatografik yöntemle gerçekleştirdikleri çalışmada KS, zayıf asidik ortamdaki yüksek çözünürlüğü nedeniyle IS olarak seçilmiştir. Zhang ve ark.'nın (2006), poli monolit kullanarak kapiler zon elektroferez yöntemi yaptıkları analizde, KS asidik ortamda % 50 (h/h) asetonitrilde çözülerek KS'nin çözünürlüğü artırılmış ve bu nedenle çalışmada IS olarak kullanılmıştır. Dolayısı ile incelenen bu yayınlarda KS veya KSSL için KE yöntemi ile gerçekleştirilen kantitatif bir tayin söz konusu olmayıp, LOD ve LOQ ile ilgili bilgiler verilmemiştir. Bu nedenle

geliştirilmiş olan bu yöntemin, başka bir kapiler elektroforetik çalışma ile duyarlılığı karşılaştırılmamıştır.

Tutarlılık

Geliştirilen KE yönteminin tutarlılığının araştırılması için 2 farklı analizci tarafından 9.58×10^{-6} M KS, 9.41×10^{-6} M KSSL, 2.01×10^{-5} M MTP ve 1.47×10^{-5} M LNS içeren 6 ayrı çözelti hazırlanarak aynı gün içinde analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar % geri kazanım değerleri için değerlendirilmiş ve F testi ile karşılaştırılarak aradaki farkın, istatistiksel açıdan önemi kontrol edilmiştir. Sonuçlar **Çizelge 16**'da sunulmaktadır.

Çizelge 16. Kapiler Elektroforez Yönteminin Tutarlılık Verileri

	1. Analizci				2. Analizci			
	KS/ MTP	KS/ LNS	KSSL/ MTP	KSSL/ LNS	KS/ MTP	KS/ LNS	KSSL/ MTP	KSSL/ LNS
\bar{x} (n=6)	101.81	101.04	100.21	100.60	101.69	99.46	99.96	100.25
ss	0.87	1.02	0.63	0.64	0.81	1.57	0.83	0.54
% BSS	0.85	1.01	0.64	0.62	0.80	1.58	0.83	0.53
F _{hesap}	0.75	1.04	0.39	0.41	0.65	2.47	0.69	0.28
\bar{x} : Ortalama, n: Deney sayısı, ss: Standart sapma, % BSS: % Bağlı standart sapma								

n-1 = 5 serbestlik derecesi için F kritik değeri 5.05 olarak verilmektedir. Deney sonuçları için hesaplanarak bulunan F değerleri, kritik değerden küçüktür ve yöntemin tutarlı olduğunun bir göstergesidir.

Sağlamlık

Yöntemin sağlamlığının araştırılması için, standart bir çözelti, pH, tampon derişimi, potansiyel ve dalga boyu parametrelerinde küçük değişiklikler yapılarak analiz edilmiştir. Parametrelerdeki değişikliklerin, KSSL ve KS için, sonuçları ne yönde etkilediği incelenerek istatistiksel değerlendirmeleri **Çizelge 17** ve **18**'de sunulmuştur.

Çizelge 17. Kapiler Elektroferez Yönteminin Kandesartan Sileksetil İçin Sağlamlık Verileri

	Tampon pH'ı	Tampon Derişimi (mM)	Potansiyel (kV)	Dalga Boyu (nm)	KSSL	
					$\bar{x} \pm ss$ (n=3)	% BSS
Optimum Koşullar	8.5	15	25	214	100.66 ± 0.83	0.83
1. Koşul	8.55	15	25	214	101.18 ± 0.45	0.45
2. Koşul	8.45	15	25	214	100.60 ± 0.28	0.28
3. Koşul	8.5	16	25	214	101.28 ± 0.48	0.48
4. Koşul	8.5	14	25	214	100.58 ± 0.82	0.81
5. Koşul	8.5	15	24.5	214	101.00 ± 0.42	0.42
6. Koşul	8.5	15	25.5	214	100.57 ± 0.92	0.92
7. Koşul	8.5	15	25	216	101.06 ± 0.47	0.47
8. Koşul	8.5	15	25	212	101.29 ± 0.45	0.45

\bar{x} : Ortalama, ss: Standart sapma, n: Deney sayısı, % BSS: % Bağlı standart sapma

Çizelge 18. Kapiler Elektroferez Yönteminin Kandesartan İçin Sağlamlık Verileri

	Tampon pH'ı	Tampon Derişimi (mM)	Potansiyel (kV)	Dalga Boyu (nm)	KS	
					$\bar{x} \pm ss$ (n=3)	% BSS
Optimum Koşullar	8.5	15	25	214	100.32 ± 0.83	0.83
1. Koşul	8.55	15	25	214	100.28 ± 0.29	0.29
2. Koşul	8.45	15	25	214	100.14 ± 0.94	0.94
3. Koşul	8.5	16	25	214	100.15 ± 0.78	0.78
4. Koşul	8.5	14	25	214	100.92 ± 0.43	0.43
5. Koşul	8.5	15	24.5	214	100.08 ± 0.18	0.18
6. Koşul	8.5	15	25.5	214	100.67 ± 0.77	0.77
7. Koşul	8.5	15	25	216	100.56 ± 0.65	0.64
8. Koşul	8.5	15	25	212	100.25 ± 0.71	0.70

\bar{x} : Ortalama, ss: Standart sapma, n: Deney sayısı, % BSS: % Bağlı standart sapma

Çizelge 17 ve 18'de elde edilen değerler Friedman testi ile karşılaştırıldığında ortalamalar arasındaki farkın önemsiz olduğu ve P değerlerinin 0.05'ten oldukça büyük olduğu bulunmuştur. Kesinliği gösteren % BSS değerleri ise % 2'nin oldukça altındadır. Sistemde olabilecek küçük değişikliklerin yöntemi etkilemediği ve önerilen yöntemin sağlam bir yöntem olduğu söylenebilir.

Doğruluk

Yöntemin doğruluğunun incelenmesi amacıyla 9.58×10^{-7} M KS ve 9.41×10^{-7} M KSSL, 9.58×10^{-6} M KS ve 9.41×10^{-6} M KSSL, 9.58×10^{-5} M KS ve 9.41×10^{-5} M KSSL içeren çözeltilerden her derişim düzeyi için 3'er set hazırlanmıştır. Bu çözeltilere son derişimleri sırasıyla 2.01×10^{-5} M ve 1.47×10^{-5} M olacak şekilde

MTP ve LNS eklenmiştir. 3 farklı derişim düzeyinde hazırlanan 3'er set çözelti, gün içi ve günler arası olacak şekilde farklı günlerde 6 kez analiz edilerek istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır. KS ve KSSL'nin kullanılan IS'lere karşı PNO değerleri hesaplanarak yapılan istatistiksel değerlendirmeler **Çizelge 19-22**'de sunulmuştur.

Çizelge 19. Kandesartanın Metoprolol Süksinata Karşı Kapiler Elektroforez Yöntemi ile Doğruluk Verileri

		KS/MTP	KS/MTP	KS/MTP
I. gün (n=6)	Eklenen (M)	9.57×10^{-7}	9.57×10^{-6}	9.57×10^{-5}
	Bulunan ($\bar{x} \pm ss$)	$9.91 \times 10^{-7} \pm 1.16 \times 10^{-8}$	$9.74 \times 10^{-6} \pm 8.32 \times 10^{-8}$	$9.84 \times 10^{-5} \pm 1.39 \times 10^{-6}$
	% Geri Kazanım	103.54	101.80	102.82
	% BH	3.54	1.80	2.82
	% BSS	1.17	0.85	1.41
II. gün (n=6)	Eklenen (M)	9.57×10^{-7}	9.57×10^{-6}	9.57×10^{-5}
	Bulunan ($\bar{x} \pm ss$)	$9.92 \times 10^{-7} \pm 1.12 \times 10^{-8}$	$9.73 \times 10^{-6} \pm 7.71 \times 10^{-8}$	$9.65 \times 10^{-5} \pm 2.49 \times 10^{-6}$
	% Geri Kazanım	103.63	101.68	100.82
	% BH	3.63	1.68	0.83
	% BSS	1.13	0.79	2.58
III. gün (n=6)	Eklenen (M)	9.57×10^{-7}	9.57×10^{-6}	9.57×10^{-5}
	Bulunan ($\bar{x} \pm ss$)	$1.00 \times 10^{-6} \pm 1.07 \times 10^{-8}$	$9.74 \times 10^{-6} \pm 9.06 \times 10^{-8}$	$9.75 \times 10^{-5} \pm 2.23 \times 10^{-6}$
	% Geri Kazanım	104.51	101.75	101.85
	% BH	4.51	1.75	1.85
	% BSS	1.07	0.93	2.29
Tüm günler (n=18)	Eklenen (M)	9.57×10^{-7}	9.57×10^{-6}	9.57×10^{-5}
	Bulunan ($\bar{x} \pm ss$)	$9.95 \times 10^{-7} \pm 1.14 \times 10^{-8}$	$9.74 \times 10^{-6} \pm 7.89 \times 10^{-8}$	$9.75 \times 10^{-5} \pm 2.12 \times 10^{-6}$
	% Geri Kazanım	103.90	101.75	101.84
	% BH	3.90	1.75	1.84
	% BSS	1.15	0.81	2.18
n: Deney sayısı, \bar{x} : Ortalama, ss: Standart sapma, % BH: % Bağlı hata % BSS: % Bağlı standart sapma				

Çizelge 20. Kandesartanın Lansoprazole Karşı Kapiler Elektroferez Yöntemi ile Doğruluk Verileri

		KS/LNS	KS/LNS	KS/LNS
I. gün (n=6)	Eklenen (M)	9.57×10^{-7}	9.57×10^{-6}	9.57×10^{-5}
	Bulunan ($\bar{x} \pm ss$)	$9.36 \times 10^{-7} \pm 8.83 \times 10^{-9}$	$9.67 \times 10^{-6} \pm 9.76 \times 10^{-8}$	$9.62 \times 10^{-5} \pm 9.57 \times 10^{-7}$
	% Geri Kazanım	97.80	101.03	100.51
	% BH	-2.19	1.03	0.52
	% BSS	0.94	1.00	0.99
II. gün (n=6)	Eklenen (M)	9.57×10^{-7}	9.57×10^{-6}	9.57×10^{-5}
	Bulunan ($\bar{x} \pm ss$)	$9.34 \times 10^{-7} \pm 1.32 \times 10^{-8}$	$9.52 \times 10^{-6} \pm 1.50 \times 10^{-7}$	$9.53 \times 10^{-5} \pm 1.18 \times 10^{-6}$
	% Geri Kazanım	97.61	99.47	99.53
	% BH	-2.38	-0.52	-0.47
	% BSS	1.41	1.58	1.24
III. gün (n=6)	Eklenen (M)	9.57×10^{-7}	9.57×10^{-6}	9.57×10^{-5}
	Bulunan ($\bar{x} \pm ss$)	$9.29 \times 10^{-7} \pm 1.03 \times 10^{-8}$	$9.40 \times 10^{-6} \pm 1.62 \times 10^{-7}$	$9.62 \times 10^{-5} \pm 1.08 \times 10^{-6}$
	% Geri Kazanım	97.10	98.17	100.47
	% BH	-2.89	-1.82	0.47
	% BSS	1.10	1.73	1.12
Tüm günler (n=18)	Eklenen (M)	9.57×10^{-7}	9.57×10^{-6}	9.57×10^{-5}
	Bulunan ($\bar{x} \pm ss$)	$9.33 \times 10^{-7} \pm 1.06 \times 10^{-8}$	$9.53 \times 10^{-6} \pm 1.74 \times 10^{-7}$	$9.59 \times 10^{-5} \pm 1.10 \times 10^{-6}$
	% Geri Kazanım	97.51	99.56	100.18
	% BH	-2.49	-0.44	0.18
	% BSS	1.14	1.83	1.15
n: Deney sayısı, \bar{x} : Ortalama, ss: Standart sapma, % BH: % Bağıl hata % BSS: % Bağıl standart sapma				

Çizelge 21. Kandesartan Sileksetilin Metoprolol Süksinata Karşı Kapiler Elektroforez Yöntemi ile Doğruluk Verileri

		KSSL/MTP	KSSL/MTP	KSSL/MTP
I. gün (n=6)	Eklenen (M)	9.40×10^{-7}	9.40×10^{-6}	9.40×10^{-5}
	Bulunan ($\bar{x} \pm ss$)	$9.14 \times 10^{-7} \pm 1.26 \times 10^{-8}$	$9.42 \times 10^{-6} \pm 5.90 \times 10^{-8}$	$9.61 \times 10^{-5} \pm 1.03 \times 10^{-6}$
	% Geri Kazanım	97.25	100.20	102.18
	% BH	-2.74	0.20	2.18
	% BSS	1.38	0.62	1.07
II. gün (n=6)	Eklenen (M)	9.40×10^{-7}	9.40×10^{-6}	9.40×10^{-5}
	Bulunan ($\bar{x} \pm ss$)	$9.11 \times 10^{-7} \pm 1.12 \times 10^{-8}$	$9.40 \times 10^{-6} \pm 7.81 \times 10^{-8}$	$9.45 \times 10^{-5} \pm 1.13 \times 10^{-6}$
	% Geri Kazanım	96.91	99.95	100.54
	% BH	-3.08	0.04	0.54
	% BSS	1.23	0.83	1.19
III. gün (n=6)	Eklenen (M)	9.40×10^{-7}	9.40×10^{-6}	9.40×10^{-5}
	Bulunan ($\bar{x} \pm ss$)	$9.10 \times 10^{-7} \pm 1.09 \times 10^{-8}$	$9.48 \times 10^{-6} \pm 8.56 \times 10^{-8}$	$9.55 \times 10^{-5} \pm 1.04 \times 10^{-6}$
	% Geri Kazanım	96.82	100.84	101.53
	% BH	-3.17	0.84	1.53
	% BSS	1.19	0.90	1.09
Tüm günler (n=18)	Eklenen (M)	9.40×10^{-7}	9.40×10^{-6}	9.40×10^{-5}
	Bulunan ($\bar{x} \pm ss$)	$9.12 \times 10^{-7} \pm 1.10 \times 10^{-8}$	$9.43 \times 10^{-6} \pm 7.92 \times 10^{-8}$	$9.54 \times 10^{-5} \pm 1.20 \times 10^{-6}$
	% Geri Kazanım	97.00	100.34	101.42
	% BH	-3.00	0.34	1.42
	% BSS	1.21	0.84	1.26
n: Deney sayısı, \bar{x} : Ortalama, ss: Standart sapma, % BH: % Bağıl hata % BSS: % Bağıl standart sapma				

Çizelge 22. Kandesartan Sileksetilin Lansoprazole Karşı Kapiler Elektroferez Yöntemi ile Doğruluk Verileri

		KSSL/LNS	KSSL/LNS	KSSL/LNS
I. gün (n=6)	Eklenen (M)	9.40×10^{-7}	9.40×10^{-6}	9.40×10^{-5}
	Bulunan ($\bar{x} \pm ss$)	$9.35 \times 10^{-7} \pm 1.28 \times 10^{-8}$	$9.46 \times 10^{-6} \pm 6.02 \times 10^{-8}$	$9.56 \times 10^{-5} \pm 1.14 \times 10^{-6}$
	% Geri Kazanım	99.48	100.61	101.61
	% BH	-0.51	0.61	1.62
	% BSS	1.37	0.63	1.19
II. gün (n=6)	Eklenen (M)	9.40×10^{-7}	9.40×10^{-6}	9.40×10^{-5}
	Bulunan ($\bar{x} \pm ss$)	$9.30 \times 10^{-7} \pm 1.22 \times 10^{-8}$	$9.43 \times 10^{-6} \pm 5.04 \times 10^{-8}$	$9.40 \times 10^{-5} \pm 1.07 \times 10^{-6}$
	% Geri Kazanım	98.91	100.24	100.62
	% BH	-1.08	0.24	0.62
	% BSS	1.31	0.53	1.13
III. gün (n=6)	Eklenen (M)	9.40×10^{-7}	9.40×10^{-6}	9.40×10^{-6}
	Bulunan ($\bar{x} \pm ss$)	$9.18 \times 10^{-7} \pm 9.68 \times 10^{-9}$	$9.41 \times 10^{-6} \pm 8.73 \times 10^{-8}$	$9.37 \times 10^{-5} \pm 1.29 \times 10^{-6}$
	% Geri Kazanım	97.62	100.09	99.63
	% BH	-2.37	0.09	-0.36
	% BSS	1.05	0.92	1.37
Tüm günler (n=18)	Eklenen (M)	9.40×10^{-7}	9.40×10^{-6}	9.40×10^{-5}
	Bulunan ($\bar{x} \pm ss$)	$9.28 \times 10^{-7} \pm 1.33 \times 10^{-8}$	$9.43 \times 10^{-6} \pm 6.70 \times 10^{-8}$	$9.46 \times 10^{-5} \pm 1.35 \times 10^{-6}$
	% Geri Kazanım	98.67	100.32	100.63
	% BH	-1.33	0.32	0.63
	% BSS	1.43	0.71	1.43
n: Deney sayısı, \bar{x} : Ortalama, ss: Standart sapma, % BH: % Bağlı hata % BSS: % Bağlı standart sapma				

KS ve KSSL için kalite kontrol standartları ve iki farklı IS kullanılarak yapılan değerlendirmeler sonucunda, 9.57×10^{-7} M KS ve 9.40×10^{-7} M KSSL derişimlerine karşılık gelen çözeltilerde % geri kazanım değerleri % 96 - 104 aralığında elde edilmiştir. Bu durum kullanılan seyreltik çözelti derişimlerinde detektör duyarlılığına karşılık gelen ve beklenen bir sonuçtur. Buna karşın belirtilen diğer tüm derişim değerlerinde % 100 dolayında geri kazanım ve % 2'nin altında BSS değerleri elde edilerek gün içi ve günler arası koşullarda iyi bir doğruluk ve kesinliğe sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Matriks ortamına standart KSSL'nin çeşitli derişim düzeylerinde eklemeler yapılarak ilaç formunda yapılacak deneylere temel oluşturmak üzere yöntemin doğruluğu incelenmiştir. 9.41×10^{-7} M, 9.41×10^{-6} M ve 9.41×10^{-5} M KSSL içeren çözeltiler tablet inaktif içeriğini oluşturan ve 1.4 mg magnezyum stearat, 79.8 mg laktoz, 6.3 mg nişasta, 18.2 mg karboksi metil selüloz, 6.4 mg poli etilen

glikol ve 11.9 mg talktan oluşan matriks ortamına eklenmiştir. Bu çözeltilere son derişimleri sırasıyla 2.01×10^{-5} M ve 1.47×10^{-5} M olacak şekilde MTP ve LNS eklenerek 3 farklı derişim düzeyinde hazırlanan çözeltiler, 6 kez analiz edilerek istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır. KSSL eklenmemiş matriks çözeltisinin elektroferogramı **Şekil 38b**'de verilmektedir. Elde edilen sonuçlar **Çizelge 23**'te sunulmaktadır.

Çizelge 23. Matriks Ortamına Eklenen Kandesartan Sileksetilin Kapiler Elektroforez Yöntemi ile Doğruluk Verileri

KSSL/MTP (n = 6)	Eklenen (M)	9.40×10^{-7}	9.40×10^{-6}	9.40×10^{-5}
	Bulunan ($\bar{x} \pm ss$)	$9.55 \times 10^{-7} \pm 1.25 \times 10^{-8}$	$9.44 \times 10^{-6} \pm 6.29 \times 10^{-8}$	$9.65 \times 10^{-5} \pm 1.14 \times 10^{-6}$
	% Geri Kazanım	101.56	100.43	102.68
	% BH	1.56	0.43	2.68
	% BSS	1.31	0.67	1.19
KSSL/LNS (n = 6)	Eklenen (M)	9.40×10^{-7}	9.40×10^{-6}	9.40×10^{-5}
	Bulunan ($\bar{x} \pm ss$)	$9.61 \times 10^{-7} \pm 8.43 \times 10^{-9}$	$9.36 \times 10^{-6} \pm 6.35 \times 10^{-8}$	$9.51 \times 10^{-5} \pm 1.06 \times 10^{-6}$
	% Geri Kazanım	102.25	99.49	101.11
	% BH	2.25	-0.51	1.11
	% BSS	0.88	0.68	1.12
n: Deney sayısı, \bar{x} : Ortalama, ss: Standart sapma, % BH: % Bağıl hata % BSS: % Bağıl standart sapma				

Ticari olarak pazarlanan tabletlerin sadece KSSL içermesi nedeniyle matriks ortamındaki doğruluk çalışmasında KS kullanılmamıştır. Matriks ortamına 3 farklı derişim düzeyinde eklenen KSSL içeriği ile elde edilen sonuçlar iki farklı IS ile kullanılarak değerlendirildiğinde % 100 dolayında geri kazanım ve % 2'nin altında BSS değerleri elde edilmiştir. Ayrıca elde edilen piklerin, standartların sahip olduğu karakteristikleri taşıdığı ve matriks ortamından kaynaklanan bir girişim meydana gelmediği görülmüştür. Önerilen yöntemin matriks ortamında da çeşitli derişim düzeyleri için iyi bir doğruluk ve kesinliğe sahip olduğu söylenebilir.

Seçicilik

KE yönteminin seçiciliğini göstermek amacı ile elektroferogramda birbirine en yakın iki pik olan olan KSSL ve LNS pikleri için R_s değeri hesaplanmıştır. **Çizelge 24**'te verilen bu değerin $R_s > 2$ olduğu görülmektedir. Ayrıca **Şekil 38c** ve **38d**'de matriksin herhangi bir girişime neden olmadığı görülmektedir. Hesaplanan R_s değeri ve matriksin girişim yapmaması ile literatürde belirtildiği şekilde KE yönteminin seçiciliği ve özgülüğü gösterilmiştir (ICH, 2005).

Sistem uygunluk testleri

KE yönteminin sistem uygunluk testleri N, R_s , k' ve α parametrelerinin hesaplanması ile gösterilmiştir. N değeri, tüm standart maddeler için

hesaplanmıştır. R_s değeri, elektroferogramda birbirine en yakın iki pik olan KSSL ve LNS pikleri için hesaplanmıştır. k' değeri, ölü hacmin belirlediği dakikaya en yakın zamanda gelen pik olan MTP piki için hesaplanmıştır. α değeri ise hem KSSL ve KS için, hem de KS ve DIC için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Parametreler için bulunan değerler **Çizelge 24**'te sunulmaktadır.

Çizelge 24. Kapiler Elektroforez Yönteminin Sistem Uygunluk Testleri

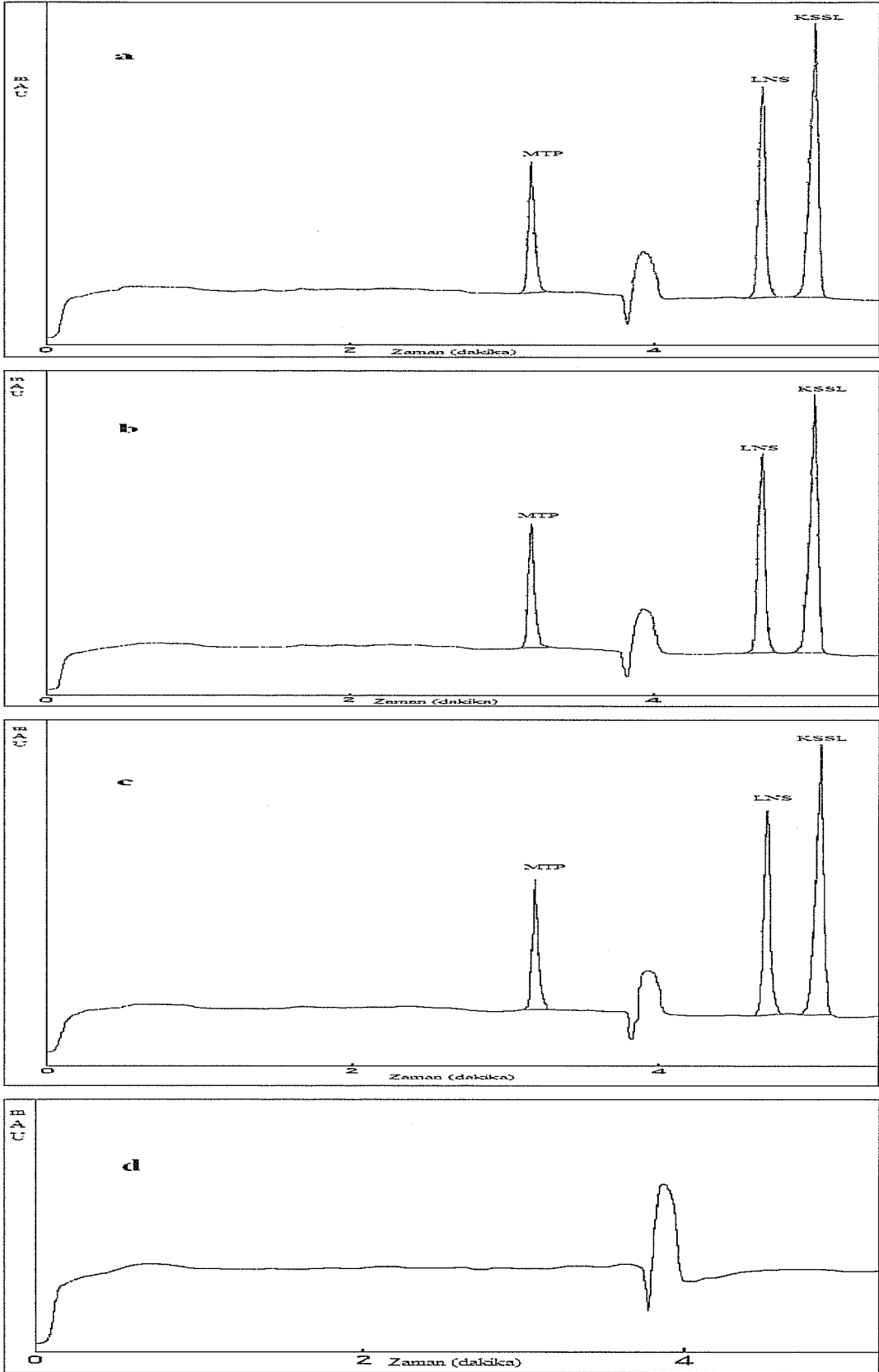
	KSSL	KS	DIC	MTP
N	31373	37066	39932	
R_s	2.85		7.27	
k'				15.45
α	1.48		1.23	
N: Teorik tabaka sayısı, R_s : Ayırım gücü, k' : Kapasite faktörü, α : Seçicilik faktörü				

Çizelge 24'te verilen değerlerin hepsi, $N > 2000$, $R_s > 1.5$, $k' > 2$ ve $\alpha > 1$ şeklinde kabul edilen kriterleri sağlamaktadır (Shabir, 2003) ve böylelikle geliştirilen KE yönteminin sistem uygunluğu gösterilmiştir.

Kapiler elektroforez ile kandesartan sileksetil içeren tabletlerde miktar tayini

Geliştirilen KE yönteminin KSSL açısından uygulanabilirliğini göstermek amacıyla, KSSL'nin farmasötik preparatından analizi gerçekleştirilmiştir. Bunun için yerel eczanelerden sağlanan ve 8 mg KSSL içerdiği bildirilen Ayra® (Sanovel, Türkiye) tabletleri analiz edilmiştir.

Analiz için 10 adet tablet tartılmış ve ortalama tablet ağırlığı 132.20 mg olarak bulunmuştur. Daha sonra bu tabletler havanda toz edilmiş ve bir tablete eşdeğer ağırlık tartılmıştır. Bu tartım, metanolde çözüldükten sonra 10 dk süreyle ultrasonik banyoda bekletilmiş ve çözelti 5000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatandan gerekli miktarlarda alınarak metanol ile KSSL'nin son derişimleri sırasıyla 9.40×10^{-5} M, 9.40×10^{-6} M ve 9.40×10^{-7} M olacak şekilde seyreltilmiştir. Her derişime ait çözelti 6 kez analiz edilmiş ve her iki IS'ye göre istatistiksel değerlendirmeler yapılmıştır. Elde edilen tablet çözeltisi elektroferogramı **Şekil 38b**'de ve istatistiksel değerlendirme sonuçları **Çizelge 25**'te verilmektedir.



Şekil 38. a: Standart Çözelti, b: Ticari Tablet Çözeltisi, c: Sentetik Tablet Çözeltisi
d: Matriks Elektroferogramları

Çizelge 25. Kandesartan Sileksetil İçeren Tabletlerde Kapiler Elektroferez ile Miktar Tayini Sonuçları

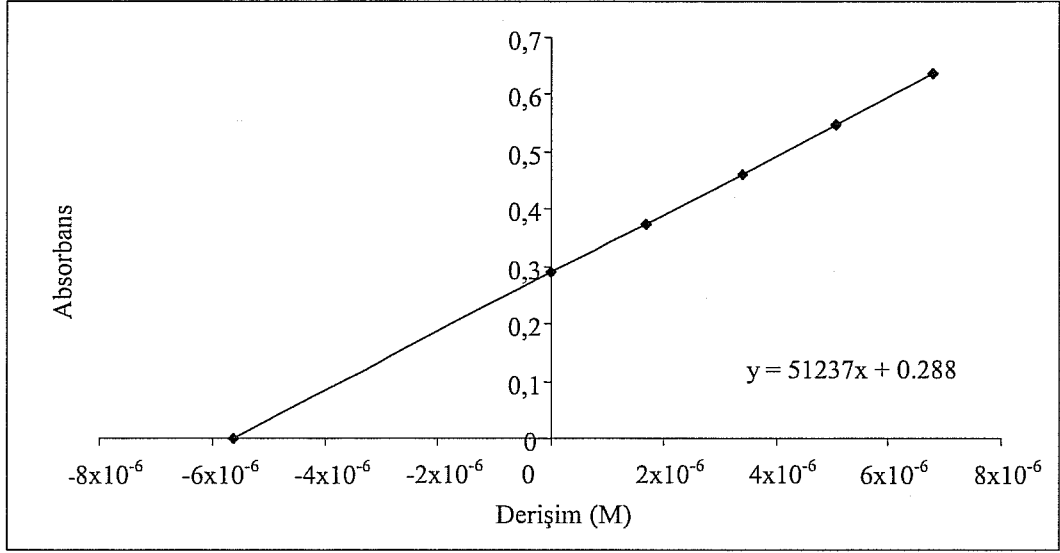
Derişim (M)		KSSL/MTP		KSSL/LNS	
		Bulunan KSSL (mg)	% Geri Kazanım	Bulunan KSSL (mg)	% Geri Kazanım
9.40x10 ⁻⁷	\bar{x} (n=6)	8.46	105.75	8.29	103.63
	ss	0.088	1.099	0.059	0.732
	% BSS	1.039	1.039	0.707	0.707
	GA (% 95)	8.46 ± 0.07	105.75 ± 0.90	8.29 ± 0.05	103.63 ± 0.60
9.40x10 ⁻⁶	\bar{x} (n=6)	8.15	101.86	8.10	101.27
	ss	0.081	1.016	0.043	0.536
	% BSS	0.997	0.997	0.530	0.530
	GA (% 95)	8.15 ± 0.06	101.86 ± 0.83	8.10 ± 0.03	101.27 ± 0.44
9.40x10 ⁻⁵	\bar{x} (n=6)	8.36	104.52	8.18	102.24
	ss	0.054	0.676	0.072	0.899
	% BSS	0.647	0.647	0.879	0.879
	GA (% 95)	8.36 ± 0.04	104.52 ± 0.55	8.18 ± 0.06	102.24 ± 0.74

\bar{x} : Ortalama, n: Deney sayısı, ss: Standart sapma, % BSS: % Bağıl standart sapma, GA: % 95 olasılıkla güven aralığı

Şekil 38b'den görüldüğü gibi tablet çözeltisi analizinde KSSL piki standart KSSL elektroferogramında elde edilen pik karakteristiklerini taşımaktadır ve matriks bileşiminden kaynaklanan bir girişim gözlenmemiştir. **Çizelge 25**'te verilen sonuçlar % KSSL içeriği bakımından USP XXIV'te belirtilen sınırlar içerisinde bulunmaktadır.

Kandesartan sileksetil içeren tabletlerde ultra viyole spektrofotometri yöntemi ile miktar tayini ve kapiler elektroferez yöntemi ile sonuçların karşılaştırılması

KSSL içeren ticari tabletlerdeki miktar tayininde KE yöntemi ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması için UV spektrofotometri yöntemi kullanılmıştır. Yöntemler bölümünde ifade edildiği gibi çalışma dalga boyu olarak 214 nm seçilmiş ve kör olarak metanol ortamı tercih edilmiştir. UV spektrofotometrik yöntemde seçicilik parametresini de göstermek amacıyla standart ekleme tekniği kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Tablet çözeltisine eklenen standart KSSL derişimlere karşı okunan absorbans değerleri arasında doğrusal bir ilişki elde edilmiş ve buna ait grafik ve ilgili eşitlik **Şekil 39**'da sunulmuştur. **Çizelge 26**'da ise eklenen standart KSSL miktarları için elde edilen doğruluk ve kesinlik verileri sunulmaktadır.



Şekil 39. Ultra Viyole Spektrofotometrik Yöntemde Standart Ekleme Tekniği ile Elde Edilen Kalibrasyon Grafiği

Çizelge 26. Ticari Tabletler Eklene Standart Kandesartan Sileksetil İçin Elde Edilen Doğruluk ve Kesinlik Verileri

Eklene KSSL (M)		Bulunan KSSL (mg)	% Geri Kazanım
1.69×10^{-6}	\bar{x} (n=5)	15.58	101.57
	ss	0.15	0.96
	% BSS	0.95	0.95
	GA (% 95)	15.58 ± 0.92	101.57 ± 0.14
3.38×10^{-6}	\bar{x} (n=5)	30.96	99.88
	ss	0.26	0.85
	% BSS	0.85	0.85
	GA (% 95)	30.96 ± 0.81	99.88 ± 0.25
5.07×10^{-6}	\bar{x} (n=5)	46.26	99.50
	ss	0.27	0.58
	% BSS	0.58	0.59
	GA (% 95)	46.26 ± 0.55	99.50 ± 0.26
6.77×10^{-6}	\bar{x} (n=5)	62.07	100.11
	ss	0.34	0.55
	% BSS	0.55	0.55
	GA (% 95)	62.07 ± 0.53	100.11 ± 0.33

\bar{x} : Ortalama, n: Deneş sayısı, ss: Standart sapma, % BSS: % Bağıl standart sapma, GA: % 95 olasılıkla güven aralığı

Çizelge 26'da görüldüğü gibi, UV spektrofotometri yöntemi ile standart ekleme tekniği kullanılarak gerçekleştirilen analiz sonuçlarında da eklene 1.69×10^{-6} - 6.77×10^{-6} M aralığındaki her derişim için yapılan beş ölçüm sonucu ve ilgili istatistiksel değerlendirme sonuçlarına göre % 100 düzeyinde geri kazanım ve %

2'nin altında % BSS değerleri bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre, UV spektrofotometrik yöntemin iyi bir doğruluk ve kesinliğe sahip olduğu söylenebilir. Ayrıca UV spektrofotometri yöntemi ile yapılan analizde, farmasötik preparatta bulunan yardımcı maddelerin herhangi bir etkileşime neden olmadığı ve bu nedenle yöntemin seçici olduğu da söylenebilir.

KSSL'nin farmasötik preparatı olan tabletlerinde miktar tayini için kullanılan UV spektrofotometri ve KE yöntemleri karşılaştırılmıştır (Gündüz, 1998). Yapılan istatistiksel değerlendirmeler **Çizelge 27**'de verilmiştir.

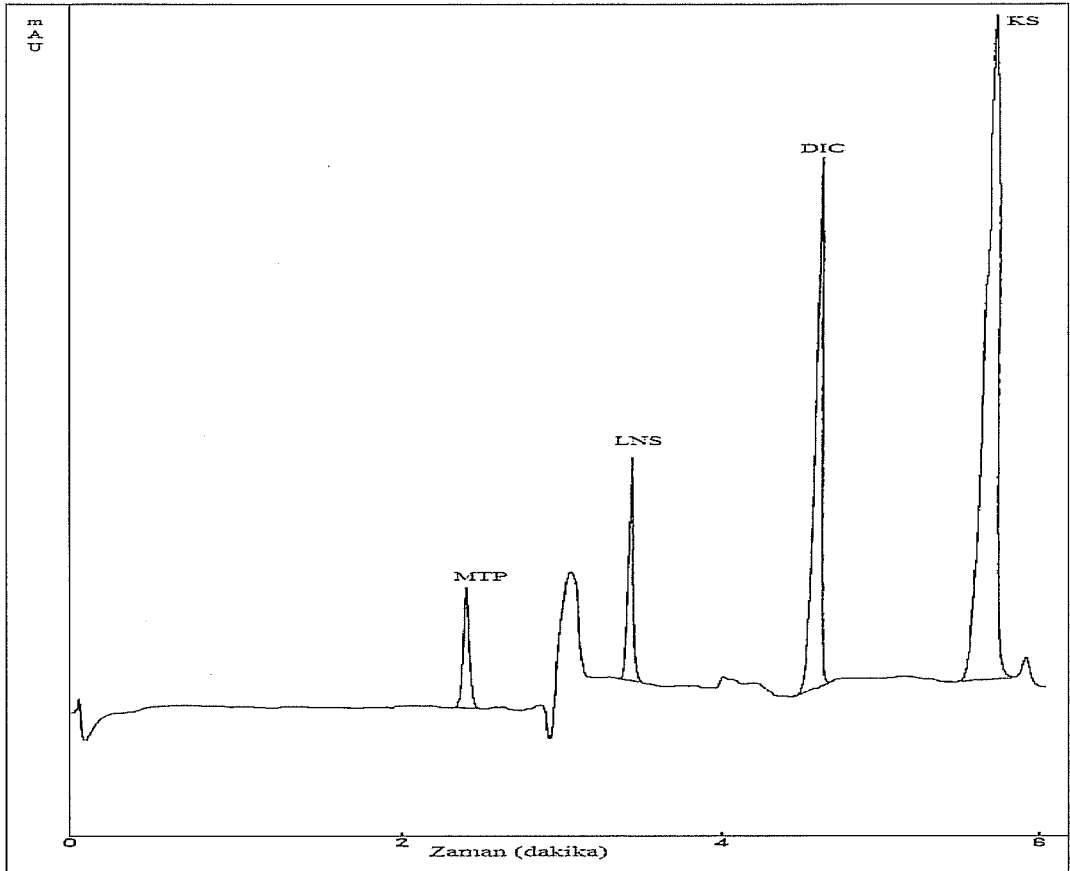
Çizelge 27. Kandesartan Sileksetil İçeren Tabletlerin Analizinde Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması

	UV	KE
\bar{x} (n=6)	8.15	8.17
ss	0.081	0.072
% BSS	0.994	0.881
t hesap	0.68	
t tablo (% 95 için n_1+n_2-2)	2.23	
varyans	0.00656	0.00518
F oran	1.27	
F tablo	5.05	
\bar{x} : Ortalama, n: Deney sayısı, ss: Standart sapma, % BSS: % Bağıl standart sapma		

Çizelge 27'de görüldüğü gibi, yöntemler için hesaplanan t ve F değerleri, kritik t ve F değerleri ile karşılaştırıldığında, % 95 güven düzeyinde ortalama KSSL içeriği ve karşılaştırılan yöntemlerin kesinlikleri arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı söylenebilir.

Diklofenak sodyumun kapiler elektroforez ile analizi

Farmakokinetik çalışmalarda KS ile DIC'in ilaç etkileşimleri inceleneceği için analiz edilecek örneklerde DIC de bulunacaktır. Dolayısıyla örneklerin KE ile analiz edilebilmesi amacı ile KS ve KSSL için geliştirilen kapiler elektroforetik sisteme DIC de eklenmiştir. 15 mM borat, % 10 (h/h) metanol içeren, pH'ı 8.50 olan çalışma tamponunda, 25 kV potansiyel ve 1 sn enjeksiyon süresi ile DIC'in 4.6 dk, MTP'nin 2.4 dk ve LNS'nin de 3.4 dk göç zamanına sahip olduğu gözlenmiştir. DIC'in göç zamanı, IS'lerin göç zamanı ile çakışmadığı için çift IS kullanma gerekliliği bu aşamada ortadan kalkmıştır. Çalışmanın bu aşamaya kadar olan kısmında MTP'nin, LNS'ye göre daha kararlı davranması nedeniyle, çalışmanın geri kalan kısmında IS olarak MTP'nin kullanılmasına karar verilmiştir. Bu koşullarda, 6.01×10^{-5} M KS, 4.6×10^{-5} M DIC, 2.14×10^{-5} M MTP ve 1.48×10^{-5} M LNS içeren bir çözeltiye ait elektroferogram **Şekil 39**'da verilmektedir. Bu koşullarda DIC için elektroforetik hareketlilik -2.48×10^{-4} cm²/sn.V olarak hesaplanmıştır.



Şekil 40. Diklofenak Sodyum'un Kapiler Elektroferez Yöntemi ile Analizi

Burada geliştirilen yöntem DIC'in kapiler elektroforetik tayini için incelenen çalışmalardan Jin ve Zhang'ın (2000) yaptıkları çalışmaya göre daha kısa, Prost ve Thormann'ın (2003) yöntemi ile ise aynı göç zamanına sahiptir. Ancak çalışmada elektrokimyasal detektör kullanıldığı için yöntemin saptama sınırı son derece düşük bulunmuştur. Zinellu ve ark. nın (2005) yaptıkları çalışmada ise göç zamanı burada geliştirilen yöntemle göre daha kısadır ancak, çalışmada daha kısa bir kapiler ile ayırım gerçekleştirilmiştir. Ayrıca incelenen bu çalışmada diyot dizisi detektör kullanılmış ve bulunan tayin ve saptama sınırları, burada geliştirilen yöntemin KS ve KSSL için hesaplanan tayin ve saptama sınırlarına yakın düzeydedir. Konečný ve ark., (2007) tarafından gerçekleştirilen analizde ise DIC analizinin gerçekleştirilebilmesi için ortama SDS eklenmiş ve DIC'in göç zamanınının 10 dk olduğu belirtilmiştir. Burada yapılan DIC analizinde ise ortama herhangi bir misel oluşturucu ajan eklenmesine gerek duyulmamış ve bu koşullar altında DIC'in 4.6 dk göç zamanına sahip olduğu gözlenmiştir.

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

KS ile DIC'in ilaç etkileşmelerinin incelenebilmesi için geliştirilen KE yöntemini, karşılaştırmak amacıyla YPSK kullanılmıştır. YPSK yöntemi ile KS, DIC ve IS olarak MTP'nin kullanıldığı bir analiz gerçekleştirilmiştir.

KE yöntemi ile DIC analizi gerçekleştirildiğinde, DIC'in IS'lerle çakışmadığı ve bu nedenle tek IS kullanılmasının yeterli olacağı görülmüştür. MTP'nin çözücü sisteminin LNS'ye göre daha basit olması, kapiler elektroforetik analiz süresince LNS'ye oranla daha kararlı davranış göstermesi ve aşağıda anlatılan şekilde seçilen dalga boyunda floresans vermesi nedenleri ile YPSK yönteminde IS olarak MTP seçilmiştir.

Optimizasyon aşamasında 6.90×10^{-6} M KS, 6.96×10^{-6} M DIC ve IS olarak 7.84×10^{-6} M MTP içeren standart bir örnek kullanılmıştır.

Optimizasyon

KE yönteminde detektör olarak UV detektör kullanıldığı için YPSK ile optimizasyon çalışmalarına da UV detektör ile başlanmıştır. KE'de 214 nm olarak belirlenen dalga boyu, YPSK için de denenmiş ve standart örnek analiz edilmiştir. Bu dalga boyunda maddelerin absorpsiyonunun büyük olmasına karşın maddelere ve IS'ye ait pik alanlarının küçük olduğu gözlenmiştir. Bunun nedeni hareketli fazın içerdiği metanol miktarının % 50 (h/h) düzeylerinde olması ve metanolden kaynaklanan UV cut-off etkisidir. UV cut-off etkisinden kurtulabilmek için 254 nm dalga boyu uygulanmıştır. Böylelikle hareketli fazdaki metanolün geçirgenliği artmış ve maddelerin UV absorpsiyonları artırılarak pik alanları büyütülmeye çalışılmıştır. Ancak, 254 nm'de KS'nin ϵ değerinin büyük olmasına karşın DIC ve MTP'nin ϵ değerlerinin çok küçük olması nedeniyle 10^{-6} M düzeyindeki maddelerin, kromatogramda istenen pik alanları elde edilememiştir. Sonuç olarak, UV detektörle 214 ve 254 nm dalga boylarında elde edilen verilerin analize uygun olmaması nedeniyle çalışmada floresans detektör kullanılmasına karar verilmiştir.

Literatürlerden yararlanılarak belirlenen bazı dalga boylarında floresans detektör ile standart örneğin analizi yapılmıştır. Bunun için floresans detektör, dalga boyları, sırasıyla uyarma ve yayma dalga boyları olmak üzere, 250 nm-380 nm (Nie ve ark., 2005), 225 nm-310 nm (Albers ve ark., 2005), 290 nm-360 nm (Baeyens ve ark., 1995; Leucuta ve ark., 2004), 260 nm-390 nm (Cagigal ve ark., 2001) ve 275 nm-310 nm'ye (Kim ve ark., 2000) ayarlanarak çalışılmıştır. İncelenen maddeler ve IS için en uygun pik morfolojileri, uyarma dalga boyunun 290 nm ve yayma dalga boyunun 360 nm olduğu koşullarda gözlenmiştir.

Çalışmada kullanılacak detektör belirlendikten sonra ayırımın gerçekleştirileceği kolon araştırılmıştır. Bu amaçla C_8 (2.1 mm iç çap, 10 cm uzunluk, 3 μ m partikül çapı) ve C_{18} (3 mm iç çap, 15 cm uzunluk, 5 μ m partikül çapı) kolonlara standart örnek enjekte edilmiştir. C_8 kolon ile yeterli ayırım sağlanamadığı için çalışmada C_{18} kolon kullanılmasına karar verilmiştir.

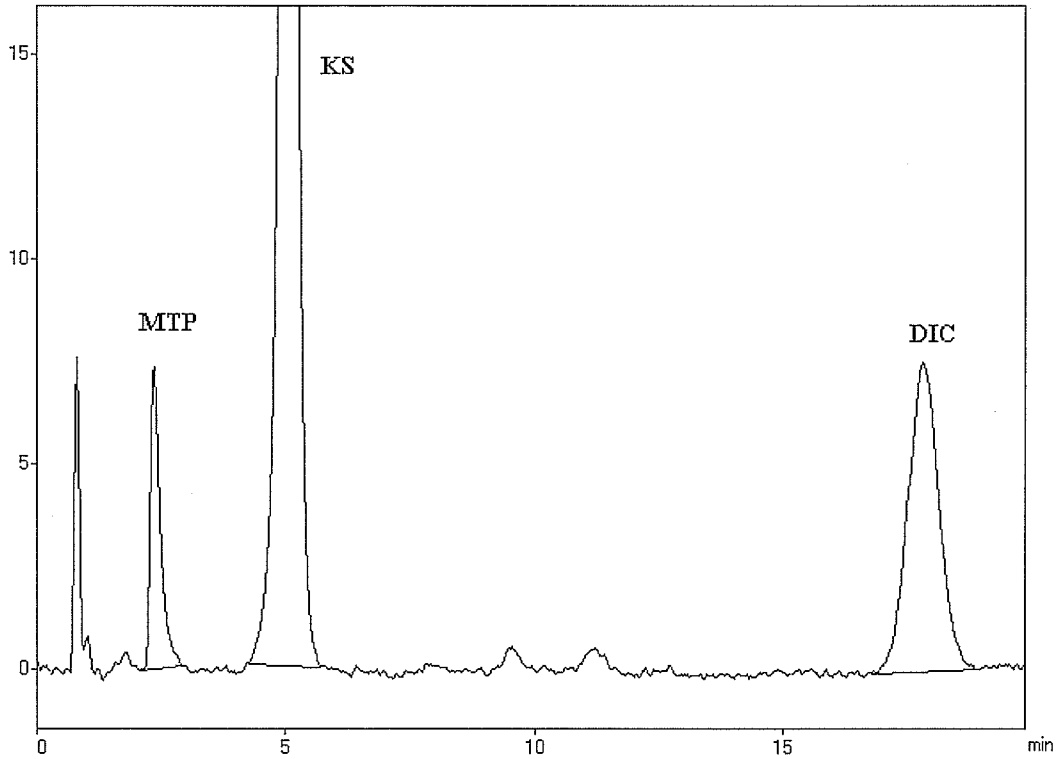
Hareketli faz içeriğinin belirlenebilmesi için öncelikle analiz edilecek bileşenlerin içerdikleri azot yapısı nedeniyle oluşabilecek olası pozitif yüklenmeleri engellemek amacıyla pH 3.50 ortamında % 0.01 (a/h) 1-HSA hareketli faza eklenmiştir. Analiz sırasında bileşenlerin üzerinde oluşabilecek pozitif yükler,

negatif yüklü silanol grupları ile etkileşip kuyruklanmalara, dolayısıyla pik morfolojilerinin bozulmasına neden olmaktadır.

Bu aşamadan sonra kullanılacak organik çözücü ve oranı araştırılmıştır. KS ve DIC metanolde çözüldüğü için hareketli faz bileşiminde organik çözücü olarak metanolün bulunmasına karar verilmiştir. Kullanılacak uygun oranın belirlenebilmesi için asetik asit ile pH'ları 3.50 olacak şekilde ayarlanmış ve % 0.01 (a/h) 1-HSA içeren hareketli faz çözeltisi % 70, % 65, % 60, % 55 ve % 50 (h/h) metanol içerecek şekilde hazırlanarak KS, MTP ve DIC içeren örnekler sisteme enjekte edilmiştir. % 60 (h/h) ve üzeri metanol içeren hareketli faz bileşimlerinde KS ve MTP'nin birbirinden ayrılmadığı gözlenmiştir. % 50 ve % 55 (h/h) metanol içeren hareketli fazlar ile tüm maddelerin ayrımı sağlanmış ancak alıkonma zamanlarının arttığı gözlenmiştir. Hem KS ile MTP'nin ayrılmasını sağlamak hem de alıkonma zamanlarını kabul edilebilir düzeye çekebilmek amacı ile % 57 (h/h) metanol içeren hareketli faz sistemi hazırlanmış ve standart örnek sisteme enjekte edilmiştir. Bu koşullar altında uygun göç zamanları ve düzgün pik morfolojileri elde edilmesi nedeni ile hareketli faz bileşiminde % 57 (h/h) oranında metanol olmasına karar verilmiştir.

Sonuç olarak 20 µL hacimde enjekte edilen örneklerin, pH 3.50, % 0.01 (a/h) 1-HSA içeren % 57 (h/h) metanol çözeltisi olarak belirlenen hareketli faz sistemi ile 1 mL/dk akış hızında ve izokratik elüsyonla ayrımı gerçekleştirilmiştir.

Bu koşullar altında alınan bir kromatogram **Şekil 41**'de sunulmaktadır.



Şekil 41. Maddelerin Optimum Koşullarda Elde Edilen Kromatogramı

Belirtilen koşullar altında KS 4.61 ± 0.03 dk, DIC 16.48 ± 0.11 dk ve MTP 2.53 ± 0.02 dk alıkonma zamanına sahiptir. Geliştirilen yöntem ile elde edilen N değerleri KS için 17400, DIC için de 40986 olarak bulunmuştur.

KS için 4.61 dk olan alıkonma zamanı değeri, IS olarak kullanılan MTP, KS ve DIC'in aynı anda tayini ve 1-HSA içeren hareketli faz bileşimine daha önce yapılan çalışmalarda rastlanmamıştır. Bu bakımdan geliştirilen YPSK yöntemi orijinallik taşımaktadır.

KS için elde edilen alıkonma zamanı, literatürlerle karşılaştırıldığında Nie ve ark. (2005), Stenhoff ve ark. (1999), González ve ark. (2002), Miyabayashi ve ark. (1996) ve Lee ve ark. (1995) tarafından geliştirilen yöntemlere göre daha kısadır. DIC için gözlenen alıkonma zamanı Baeyens ve ark. (1995) ve Kumar ve ark. (2002) tarafından geliştirilen yöntemlere daha uzun ancak, Bort ve ark. (1999) tarafından yapılan analize göre daha kısadır.

Validasyon

Optimum koşullar belirlendikten sonra YPSK yönteminin geçerliliğinin gösterilebilmesi amacıyla kararlılık, doğrusalık, tekrarlanabilirlik, duyarlılık, tutarlılık, sağlamlık, doğruluk ve seçicilik parametreleri incelenmiştir. Sistemin uygunluğunu göstermek amacıyla N, Rs, k' ve α parametreleri hesaplanarak sistem uygunluk testleri yapılmıştır.

Kararlılık

Geliştirilen YPSK yönteminde kullanılan standart maddelerin kararlılıkları, taze çözelti ile alüminyum folyoya sarılı halde $+4$ °C'de 24 saat ve 1 ay bekletilen çözeltiler karşılaştırılarak incelenmiştir. Taze hazırlanan çözelti ile 24 saat ve 1 ay bekletilen çözeltilerin, MTP'ye karşı hesaplanan PNO değerleri kullanılarak yapılan istatistiksel değerlendirmeleri **Çizelge 28**'de verilmiştir.

Çizelge 28. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi ile Kandesartan ve Diklofenak Sodyumun Kararlılık Verileri

		KS/MTP	DIC/MTP
Taze çözelti	\bar{x} (n=3)	4.96	0.32
	ss	0.023	0.005
	% BSS	0.48	1.53
24 saat	\bar{x} (n=3)	4.95	0.32
	ss	0.009	0.005
	% BSS	0.19	1.75
1 ay	\bar{x} (n=3)	4.96	0.32
	ss	0.025	0.05
	% BSS	0.51	1.63

\bar{x} : Ortalama, n: Deney sayısı, ss: Standart sapma, % BSS: % Bağıl standart sapma

Friedman testine göre yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda ortalamalar arasındaki farkın önemsiz olduğu ve P değerlerinin 0.05'ten oldukça

büyük olduğu bulunmuştur. Kesinliği gösteren % BSS değerleri ise % 2'nin oldukça altındadır. KSSL ve KS'nin 1 ay boyunca +4 °C'de ve alüminyum folyoya sarılı halde kararlı oldukları söylenebilir. Çalışmada kullanılan standart maddelerin analiz süreleri dışında alüminyum folyoya sarılı halde +4 °C'de saklanmalarına karar verilmiştir.

Doğrusallık

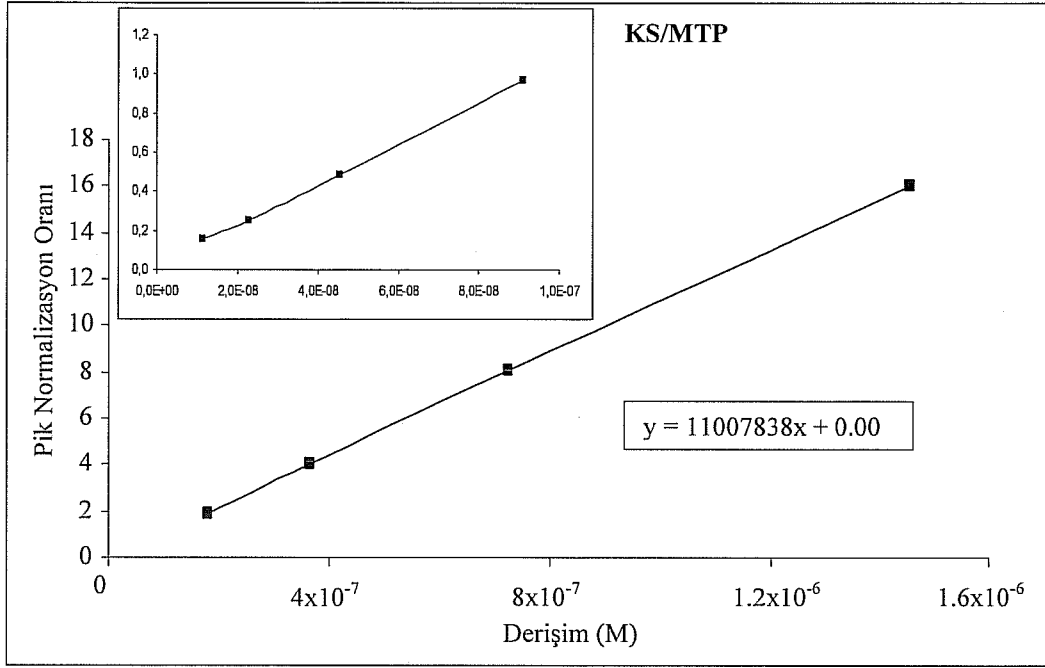
Yöntemin doğrusallığının incelenmesi için KS'nin $5.69 \times 10^{-9} - 1.04 \times 10^{-5}$ M aralığındaki 13 çözeltisi ile DIC'in $5.73 \times 10^{-9} - 5.22 \times 10^{-5}$ M aralığındaki 15 çözeltisinin enjeksiyonları yapılmıştır. KS için $1.14 \times 10^{-8} - 1.46 \times 10^{-6}$ M aralığı, DIC için de $3.67 \times 10^{-7} - 3.91 \times 10^{-5}$ M aralığının yöntem için doğrusal olduğu bulunmuştur. Belirtilen aralıklarda KS ve DIC için IS olarak kullanılan MTP'ye karşı, PNO dikkate alınarak yapılan istatistiksel değerlendirmeler **Çizelge 29**'da sunulmuştur.

Çizelge 29. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yönteminin Doğrusallık Verileri

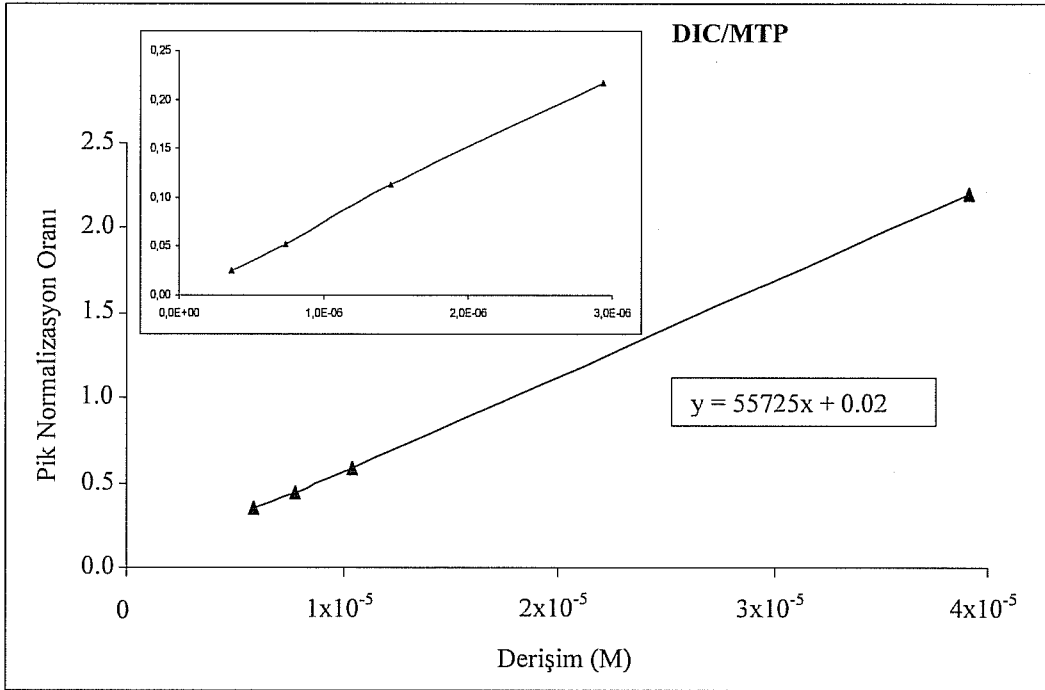
	KS/MTP	DIC/MTP
a	11007838	55699
b	0.00	0.02
r	0.9999	0.9992

a: Eğim, b: Kesim, r: Korelasyon katsayısı

KS için $1.14 \times 10^{-8} - 1.46 \times 10^{-6}$ M, DIC için de $3.67 \times 10^{-7} - 3.91 \times 10^{-5}$ M aralığı dikkate alınarak yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda, yöntemin, belirtilen derişim aralıklarında yüksek korelasyon katsayılı doğrulara sahip olduğu görülmüştür. KS ve DIC için, IS olarak MTP'nin kullanıldığı yöntemin doğrusallık incelemesine ait grafikler sırasıyla **Şekil 42 ve 43**'te sunulmuştur.



Şekil 42. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yönteminin Kandesartan İçin Doğrusallığın Grafiksel Gösterimi

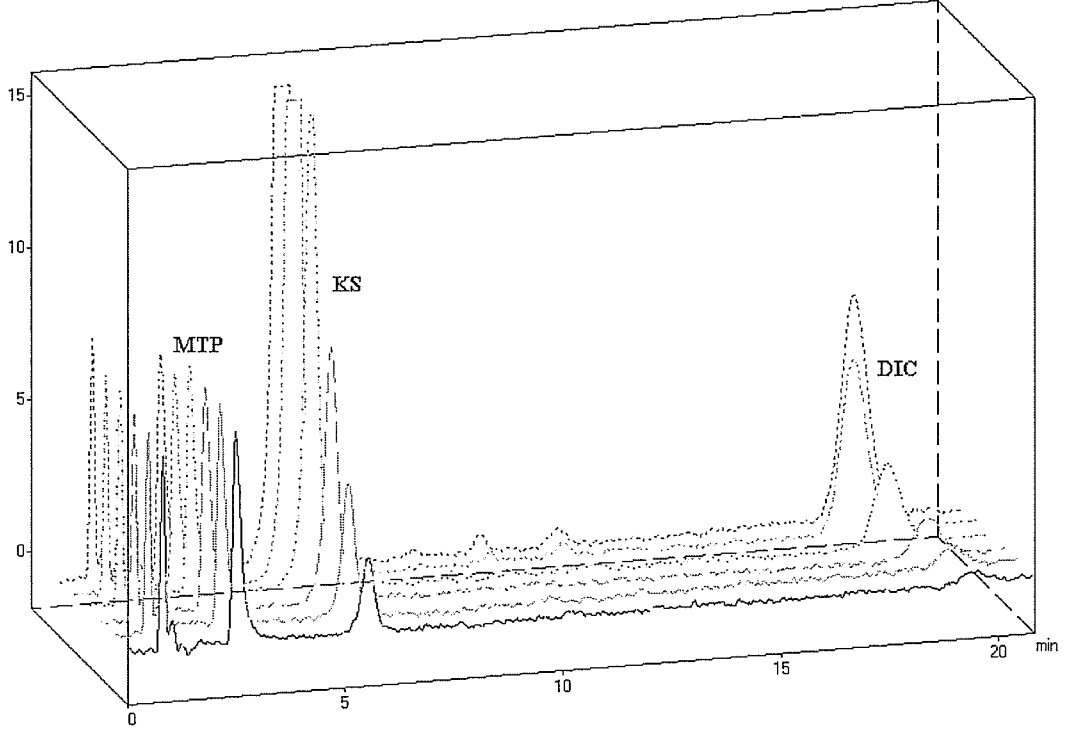


Şekil 43. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yönteminin Diklofenak Sodyum İçin Doğrusallığın Grafiksel Gösterimi

YPSK yöntemi ile gerçekleştirilen analizlerde KS'nin $1.14 \times 10^{-8} - 1.46 \times 10^{-6}$ M ve DIC'in de $3.67 \times 10^{-7} - 3.91 \times 10^{-5}$ M aralığında doğrusal olduğu gözlenmiştir.

Yöntemin doğrusal olduğu aralıktan yola çıkılarak hazırlanan KS'nin $4.85 \times 10^{-8} - 1.04 \times 10^{-6}$ M ve DIC'in $4.89 \times 10^{-7} - 1.04 \times 10^{-5}$ M aralığındaki 6 çözeltisinden

oluşan ve her bir çözeltinin 1.18×10^{-5} M derişimde MTP içerdiği, 3 kalibrasyon seti, 3 farklı günde analiz edilerek gün içi ve günler arası istatistiksel hesaplamaları yapılmıştır. Şekil 44'te bu kalibrasyon setlerinden biri görülmektedir.



Şekil 44. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yönteminin Gün İçi Kalibrasyon Analizlerinden Birinin Grafikselleştirilmesi

Kalibrasyon setleri ile ilgili olarak yapılan gün içi ve günler arası hesaplamalar Çizelge 30'da sunulmaktadır.

Çizelge 30. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yönteminin Kalibrasyon Verileri

		Gün İçi			Günler Arası
		I. gün (n=6)	II. gün (n=6)	III. gün (n=6)	Tüm Günler (n=18)
KS / MTP	a	38690	38950	39310	38980
	b	0.0046	0.0006	0.0028	0.0027
	r	0.9998	0.9999	0.9998	0.9997
	ss a	486	362	547	1070
	ss b	0.0027	0.0020	0.0028	0.0061
	Sy.x	0.0041	0.0016	0.0024	0.0041
	GSa (% 95)	± 1320	± 1025	± 1035	± 1530
	GSb (% 95)	± 0.004	± 0.0006	± 0.0028	± 0.0160
DIC / MTP	a	4566000	4595000	4560000	4601000
	b	0.0042	-0.0018	-0.0138	-0.0252
	r	0.9995	9.9998	0.9997	0.9996
	ss a	65010	35260	61651	115752
	ss b	0.0337	0.0183	0.0319	0.0646
	Sy.x	0.0313	0.0174	0.0231	0.0426
	GSa (% 95)	± 167500	± 90500	± 158500	± 243600
	GSb (% 95)	± 0.0865	± 0.0468	± 0.0820	± 0.1371
a: Eğim, b: Kesim, r: Korelasyon katsayısı, ss a: Eğimin standart sapması, ss b: Kesimin standart sapması, Sy.x: Kalibrasyon eğrisinin standart sapması, GSa: % 95 olasılıkla eğimin güven aralığı, GSb: % 95 olasılıkla kesimin güven aralığı					

Yapılan istatistiksel değerlendirmeler ile, kalibrasyon setlerinin, gün içi ve günler arasında yüksek korelasyon katsayılı kalibrasyon eşitlikleri verdiği görülmüştür.

Geliştirilen YPSK yöntemine ait kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısının önem kontrolü ve doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü için yapılan istatistiksel değerlendirmeler **Çizelge 31** ve **32**'de verilmektedir. Korelasyon katsayısının önem kontrolü ve doğrusallıktan ayrılış önem kontrolüne ait istatistiksel hesaplamalar **Ek-1**'de sunulmuştur.

Çizelge 31. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemine Ait Kalibrasyon Eğrisinin Korelasyon Katsayısının Önem Kontrolü

	KS/MTP	DIC/MTP
n	6	6
r	0.9940	0.9954
Sr	0.0387	0.0339
t hesap	25.72	29.41
t tablo	2.78	2.78
n: Deneş sayısı, r: Korelasyon katsayısı, Sr: Korelasyon katsayısının standart hatası		

Korelasyon katsayısının önem kontrolü için yapılan istatistiksel değeriendirmeler sonucunda, hesaplanan t değeriinin tablodan bulunan t değeriinden büyük olduğu ve bu nedenle kalibrasyon eğrisi için bulunan r değeriinin tesadüfi olmadığı görülmüştür.

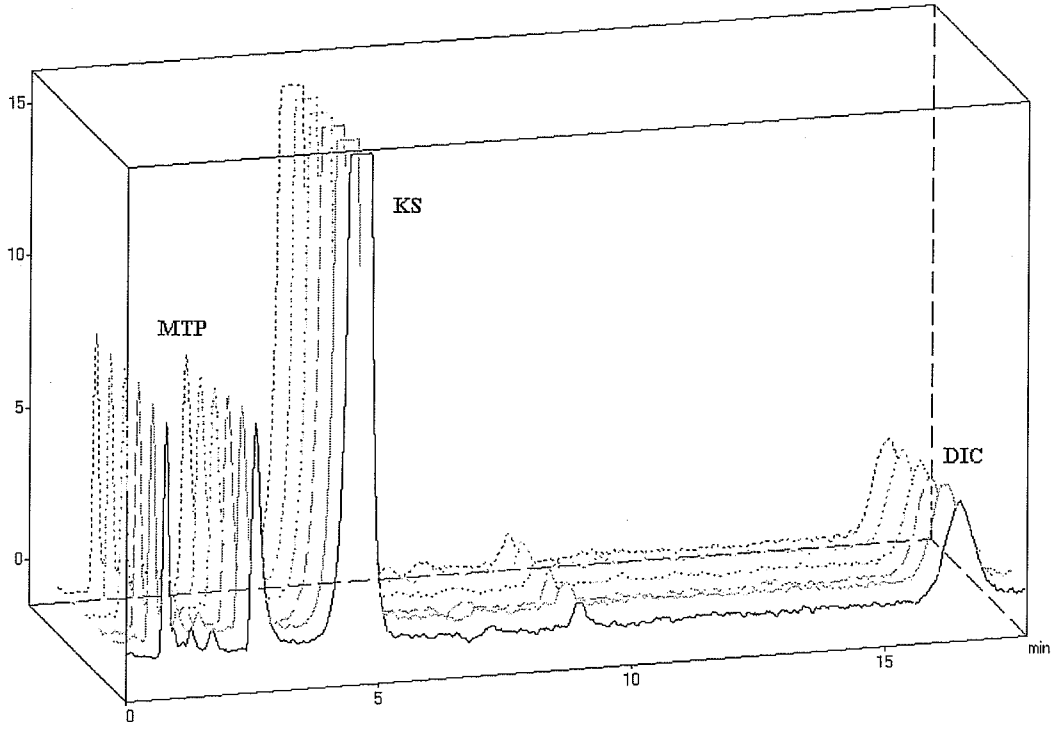
Çizelge 32. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemine Ait Kalibrasyon Eğrisinin Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü

	KS/MTP	DIC/MTP
RKT	15.61	0.13
YOAKT	15.70	0.13
RAKT	9.43×10^{-2}	6.15×10^{-4}
RAKO	2.36×10^{-2}	1.54×10^{-4}
RKO	15.61	0.13
F hesap	6.61×10^2	8.65×10^2
F tablo	7.71	7.71
RKT: Regresyon kareler toplamı, YOAKT: Y ortalamadan ayrılış kareler toplamı, RAKT: Regresyondan ayrılış kareler toplamı, RAKO: Regresyondan ayrılış kareler ortalaması, RKO: Regresyon kareler ortalaması		

Doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü için yapılan hesaplamalar sonucunda bulunan F değeriinin, tablodan bulunan F değeriinden büyük olduğu görülmüş ve dolayısı ile derişim ile detektör yanıtı arasındaki ilişkinin doğrusal olduğuna karar verilmiştir.

Tekrarlanabilirlik

Yöntemin kesinliğinin belirlenmesi aşamasında 1.29×10^{-6} M KS, 3.91×10^{-6} M DIC ve 1.18×10^{-5} M MTP içeren 3 grup çözeltinin, 3 farklı günde 6 kez enjeksiyonu yapılmıştır. Bu gruplardan birine ait gün içi 6 enjeksiyonun grafiği Şekil 45'te sunulmaktadır.



Şekil 45. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yönteminin Gün İçi Kesinliğinin Grafikselsel Gösterimi

3 gün süresince yapılan toplam 18 enjeksiyona ait istatistiksel değerlendirmeler **Çizelge 33**'te sunulmaktadır.

Çizelge 33. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yönteminin Kesinlik ve Doğruluk Verileri

		KS/MTP	DIC/MTP
I. gün (n=6)	\bar{x}	7.576	0.197
	ss	0.121	0.003
	% BSS	1.60	1.75
	% BH	3.12	2.90
	GA (% 95)	7.576 ± 0.099	0.197 ± 0.003
II. gün (n=6)	\bar{x}	7.387	0.193
	ss	0.131	0.002
	% BSS	1.78	1.40
	% BH	2.44	2.12
	GA (% 95)	7.387 ± 0.108	0.193 ± 0.002
III. gün (n=6)	\bar{x}	7.446	0.197
	ss	0.094	0.003
	% BSS	1.26	1.39
	% BH	3.17	3.15
	GA (% 95)	7.446 ± 0.077	0.197 ± 0.002
Tüm günler (n=18)	\bar{x}	7.470	0.196
	ss	0.136	0.003
	% BSS	1.82	1.76
	% BH	2.92	2.73
	GA (% 95)	7.470 ± 0.056	0.196 ± 0.001

n: Deney sayısı, \bar{x} : Ortalama, ss: Standart sapma, % BSS: % Bağıl standart sapma, % BH: % Bağıl hata, GA: % 95 olasılıkla güven aralığı

Çizelge 33 incelendiğinde geliştirilen yöntemin gün içi ve günler arası % BSS değerlerinin % 2'den küçük olduğu ve dolayısıyla yüksek kesinliğe sahip olduğu söylenebilir. Belirtilen derişim düzeylerinde doğruluğun değerlendirilmesi için yapılan hesaplamalarda bulunan değerler % bağıl hata cinsinden ifade edilmiştir ve bu değerler literatürde verilen sınırların oldukça altındadır (Shabir, 2003).

Cihaz tekrarlanabilirliğinin incelenmesi için hazırlanan 1.29×10^{-6} M KS, 3.91×10^{-6} M DIC ve 1.18×10^{-5} M MTP içeren standart örnek, 10 kez sisteme enjekte

edilmiştir. Elde edilen sonuçların birbirine yakınlığı, PNO kullanılarak değerlendirilmiş ve yapılan hesaplamalar **Çizelge 34**'te verilmiştir.

Çizelge 34. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Cihazının Tekrarlanabilirlik Verileri

	KS/MTP	DIC/MTP
\bar{x} (n=10)	7.490	0.195
ss	0.051	0.003
% BSS	0.69	1.58
GA (% 95)	7.490 ± 0.029	0.195 ± 0.001
n: Deneysel sayı, \bar{x} : Ortalama, ss: Standart sapma, % BSS: % Bağıl standart sapma, GA: % 95 olasılıkla güven aralığı		

YPSK cihazının tekrarlanabilirliği için yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda % 2'nin altında % BSS değerleri bulunmuş ve cihaz kesinliği gösterilmiştir.

Duyarlılık

YPSK yönteminin LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanması için **Eşitlik 1** ve **2** kullanılmıştır. **Çizelge 35**'te yöntemin hem KS hem de DIC'in, MTP'ye karşı PN oranları kullanılarak hesaplanan LOD ve LOQ değerleri sunulmaktadır.

Çizelge 35. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yönteminin Gözlenebilirlik ve Alt Tayin Sınırları

	KS/MTP	DIC/MTP
LOD (M)	1.72x10 ⁻⁸	2.46x10 ⁻⁷
LOQ (M)	5.22x10 ⁻⁸	7.47x10 ⁻⁷
LOD: Gözlenebilirlik sınırı, LOQ: Alt tayin sınırı		

Geliştirilen YPSK yönteminin duyarlılığı literatürlerle karşılaştırıldığında KS için bulunan LOD değerinin Lee ve ark. nın (1995) idrar örnekleri için geliştirdikleri yöntemden daha düşük olduğu görülmüştür. DIC açısından karşılaştırıldığında yöntem, Baeyens ve ark. nın (1995) geliştirdiği yöntemle göre çok daha duyarlıdır. Geliştirilen yöntem, KS için yapılan diğer çalışmalarla (Stenhoff ve ark., 1999; González ve ark., 2002; Miyabayashi ve ark., 1996; Nie ve ark., 2005) karşılaştırıldığında daha az duyarlı olmakla birlikte KS ve DIC'in birlikte analizinin gerçekleştirilmesi açısından özgün bir yöntemdir. Ayrıca analiz öncesinde uzun işlemler gerektiren bu yöntemlerde daha karmaşık ve pahalı hareketli fazlar ve kolonlar kullanılmıştır.

Tutarlılık

Geliştirilen yöntemin tutarlılığının araştırılması için 2 farklı analizci tarafından 1.29 x 10⁻⁶ M KS, 3.91 x 10⁻⁶ M DIC ve 1.18 x 10⁻⁵ M MTP içeren 6 ayrı çözelti

hazırlanarak aynı gün içinde analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar % geri kazanım değerleri için değerlendirilmiş ve F testi ile karşılaştırılarak aradaki farkın, istatistiksel açıdan önemi kontrol edilmiştir. Sonuçlar **Çizelge 36'**da sunulmaktadır.

Çizelge 36. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yönteminin Tutarlılık Verileri

	1. Analizci		2. Analizci	
	KS/MTP	DIC/MTP	KS/MTP	DIC/MTP
\bar{x} (n=6)	101.77	101.84	103.18	104.17
ss	1.61	1.52	1.27	1.54
% BSS	1.58	1.49	1.23	1.48
F hesap	2.57	2.31	1.62	2.36

n: Deneysel sayısı, \bar{x} : Ortalama, ss: Standart sapma, % BSS: % Bağıl standart sapma

n-1=5 serbestlik derecesi için F kritik değeri 5.05 olarak verilmektedir. Deneysel sonuçları için hesaplanarak bulunan F değerleri kritik değerden küçüktür ve yöntemin tutarlı olduğunun bir göstergesidir.

Sağlamlık

Yöntemin sağlamlığının araştırılması için, 1.29×10^{-6} M KS, 3.91×10^{-6} M DIC ve 1.18×10^{-5} M MTP standart bir çözelti, hareketli fazın pH'ı, hareketli fazdaki organik çözücü oranı ve uyarma ve yayma dalga boyu parametrelerinde küçük değişiklikler yapılarak analiz edilmiştir. KS ve DIC için parametrelerdeki değişikliklerin, sonuçları ne yönde etkilediği incelenerek yapılan istatistiksel değerlendirmeler **Çizelge 37** ve **38'**de sunulmuştur.

Çizelge 37. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yönteminin Kandesartan İçin Sağlamlık Verileri

	pH	% Metanol	Dalga Boyu (nm)		KS	
			Uyarma	Yayma	$\bar{x} \pm ss$ (n=3)	% BSS
Optimum Koşullar	3.5	57	290	360	100.39 ± 0.42	0.42
1. Koşul	3.55	57	290	360	102.64 ± 0.54	0.53
2. Koşul	3.45	57	290	360	101.75 ± 1.32	1.29
3. Koşul	3.5	57.5	290	360	102.58 ± 1.61	1.57
4. Koşul	3.5	56.5	290	360	103.07 ± 0.53	0.51
5. Koşul	3.5	57	290	361	101.57 ± 1.42	1.39
6. Koşul	3.5	57	290	359	102.02 ± 1.37	1.34
7. Koşul	3.5	57	291	360	101.21 ± 0.91	0.90
8. Koşul	3.5	57	289	360	101.80 ± 1.33	1.30

\bar{x} : Ortalama, ss: Standart sapma, n: Deneysel sayısı, % BSS: % Bağıl standart sapma

Çizelge 38. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yönteminin Diklofenak Sodyum İçin Sağlık Verileri

	pH	% Metanol	Dalga Boyu (nm)		DIC	
			Uyarma	Yayma	$\bar{x} \pm ss$ (n=3)	% BSS
Optimum Koşullar	3.5	57	290	360	101.61 ± 0.71	0.70
1. Koşul	3.55	57	290	360	102.35 ± 0.74	0.72
2. Koşul	3.45	57	290	360	101.90 ± 0.85	0.83
3. Koşul	3.5	57.5	290	360	102.69 ± 0.31	0.30
4. Koşul	3.5	56.5	290	360	102.11 ± 0.82	0.80
5. Koşul	3.5	57	290	361	101.60 ± 0.99	0.97
6. Koşul	3.5	57	290	359	102.66 ± 1.19	1.16
7. Koşul	3.5	57	291	360	102.73 ± 0.84	0.82
8. Koşul	3.5	57	289	360	101.77 ± 0.85	0.84

\bar{x} : Ortalama, ss: Standart sapma, n: Deney sayısı, % BSS: % Bağlı standart sapma

Çizelge 37 ve 88’de elde edilen değerler Friedman testi ile karşılaştırıldığında ortalamalar arasındaki farkın önemsiz olduğu ve P değerlerinin 0.05’ten oldukça büyük olduğu bulunmuştur. Kesinliği gösteren % BSS değerleri ise % 2’nin oldukça altındadır. Sistemde olabilecek küçük değişikliklerin yöntemi etkilemediği ve önerilen yöntemin sağlam bir yöntem olduğu söylenebilir.

Seçicilik

YPSK yönteminin seçiciliğini göstermek amacı ile kromatogramda birbirine en yakın iki pik olan KS ve MTP pikleri için Rs değeri hesaplanmıştır. Çizelge 39’da verilen bu değer Rs > 2 olduğu görülmektedir. Ayrıca ve Şekil 48 ve 49’da matriksin herhangi bir girişime neden olmadığı görülmektedir. Hesaplanan Rs değeri ve matriksin girişim yapmaması ile literatürde belirtildiği şekilde YPSK yönteminin seçiciliği ve özgünlüğü gösterilmiştir (ICH, 2005).

Sistem uygunluk testleri

YPSK yönteminin sistem uygunluk testleri N, Rs, k’ ve α parametrelerinin hesaplanması ile gösterilmiştir. N değeri, tüm standart maddeler için hesaplanmıştır. Rs değeri, elektroferogramda birbirine en yakın iki pik olan KS ve MTP pikleri için hesaplanmıştır. k’ değeri, ölü hacmin belirlediği dakikaya en yakın zamanda gelen pik olan MTP piki için hesaplanmıştır. α değeri ise KS ve DIC için hesaplanmıştır. Parametreler için bulunan değerler Çizelge 39’da sunulmaktadır.

Çizelge 39. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yönteminin Sistem Uygunluk Testleri

	KS	DIC	MTP
N	17400	40986	
Rs	3.39		
k’			2.57
α	2.19		

N: Teorik tabaka sayısı, Rs: Ayırım gücü, k’: Kapasite faktörü, α : Seçicilik faktörü

Çizelge 39'da verilen değerlerin hepsi, $N > 2000$, $R_s > 1.5$, $k' > 2$ ve $\alpha > 1$ şeklinde kabul edilen kriterleri sağlamaktadır (Shabir, 2003) ve böylelikle geliştirilen YPSK yönteminin sistem uygunluğu gösterilmiştir.

***In Vitro* İlaç Metabolizma İncelemeleri**

KSSL, gastrointestinal kanaldan geçişi sırasında hidroliz olarak aktif metaboliti olan KS'ye dönüştürülür. Bu nedenle ilaç etkileşmeleri çalışmalarında KSSL'in analizinin yapılması zorunluluğu bulunmamaktadır ve deneysel süreçte KSSL tayini deneysel işlemlerde yer almamaktadır.

KS, karaciğerde CYP 2C9 enzimi tarafından metabolize edilerek inaktif metabolitine dönüştürülür. DIC ise yine karaciğerde CYP 2C9 enzimi tarafından metabolize edilen ve CYP 2C9 enzimi için standart substrat olarak kabul edilmiş substratlardan birisidir. Enzim kinetiği çalışmalarında oluşan ürünün artması ya da substratın azalması incelebilir. Bu çalışmada KS ve DIC'in, CYP 2C9 tarafından metabolize edildikten sonra oluşan ürünlerinin standartları bulunmadığı için, *in vitro* ortamdaki incelemeler substratların azalması grafiklerine dayanmaktadır.

Farmakokinetik çalışmalarda kullanılacak çözeltiler ve derişimlerinin belirlenebilmesi için yapılan literatür araştırmalarına göre kullanılacak mikrozomal protein derişiminin 0.2 – 4.0 mg/mL aralığında olabileceği görülmüştür (Zhang ve ark., 2008). Kullanılacak NADPH çözeltisinin ise en az 1 mM derişime sahip olması gerektiği görülmüştür (Bort ve ark., 1999; Zhang ve ark., 2008; Kumar ve ark. 2006). Organik çözücü düzeyi literatürlerde en fazla % 1 olarak bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2008; Chauret ve ark., 1998; Tang ve ark., 2000). Bu tür *in vitro* çalışmalarda tampon sistemi olarak daha çok TRIS-HCl veya potasyum fosfat gibi tampon sistemlerinin kullanıldığı görülmüştür (Zhang ve ark., 2008; Tang ve ark., 2000; Kumar ve ark., 2002; Prost ve Thormann, 2003; Konečný ve ark., 2007; Kumar ve ark. 2006; Taavitsainen ve ark., 2000; Chauret ve ark., 1998).

Literatürde farklı zamanlarda birden çok örnek toplandığı zaman deneylerin 2 tekrarlı, tek bir zamanda örnek toplandığı zaman deneylerin, 3 tekrarlı olarak yapılması önerilmiştir (Zhang ve ark., 2008). Ayrıca incelenen literatürlerde, örneklerin 37 °C'a ulaşabilmeleri için gereken ön inkübasyon süresinin 1-15 dk arasında değiştiği görülmüştür (Zhang ve ark., 2008; Tang ve ark., 2000; Konečný ve ark., 2007; Kumar ve ark. 2006; Kumar ve ark., 2002; Bort ve ark., 1999). Biyolojik çalışmalarda proteinleri uzaklaştırmak için süzme, organik çözücü ile çöktürme veya asit kullanarak çöktürme yapılabilir (Zinellu ve ark., 2005). *In vitro* ilaç etkileşmeleri çalışmalarında ise bu amaçla ve aynı zamanda reaksiyonu durdurmak amacıyla organik çözücü olarak genellikle asetonytril veya metanol kullanılmıştır (Tang ve ark., 2000; Bort ve ark., 1999; Kumar ve ark., 2002; Zhang ve ark., 2008)

Bu literatür bilgilerinin ışığında optimizasyon çalışmalarına başlanmıştır.

Optimizasyon

In vitro çalışmalarda reaksiyonun başlayabilmesi için en az 1 mM olması gerektiği belirtilen NADPH derişimi, yapılan ön çalışmalarda 2 mM kullanıldığında, reaksiyonun başlaması için yeterli düzeye ulaştığı ve daha yüksek derişimlere gerek olmadığı gözlenmiştir.

KS ve DIC'in çözücüsünün metanol olması nedeniyle çalışmada organik çözücü olarak metanol kullanılmıştır. Reaksiyon ortamına metanol sadece sözü edilen substratların eklenmesi ile girmiştir. Bunun dışında herhangi bir şekilde enzimin bulunduğu ortama organik çözücü eklenmemiştir. Gerekli seyreltmeler düşünüldüğünde bu çalışmada organik çözücü yüzdesi % 1 düzeyinde ve dolayısı ile kabul edilebilir sınırlar içerisinde.

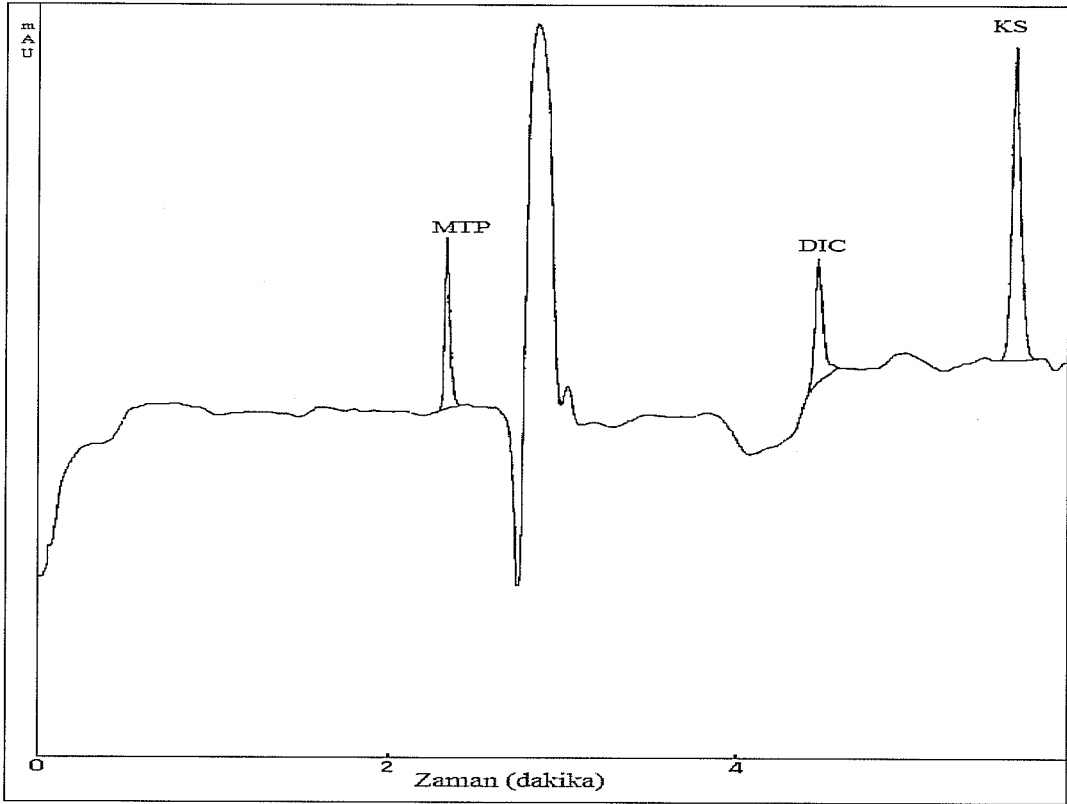
Çalışmada kullanılacak mikrozomal protein derişimlerini istenen düzeye seyreltebilmek için potasyum fosfat tamponu kullanılmıştır. Bu tamponun hazırlanabilmesi için USP XXIV'te belirtildiği gibi, 0.2 M KH₂PO₄ ve 0.2 M NaOH çözeltileri pH'ı 7.4 olacak şekilde uygun oranda karıştırılmıştır. Reaksiyon ortamında ise 0.5 M TRIS ve 0.01 M EDTA çözeltilerinin karışımının 5 N HCl ile pH'ı 7.4'e ayarlanarak hazırlanan TRIS-EDTA-HCl tamponu kullanılmıştır.

DIC'in CYP 2C9 ile metabolize olması incelenirken farklı zamanlarda birden çok örneğin toplanması tercih edilmiştir. Yapılan ön deneyler ile en fazla 1 saatlik bir sürede DIC'in anlamlı azalma düzeylerine ulaştığına ve bu sürede DIC'in CYP 2C9 tarafından metabolize edildiğine karar verilmiştir. Bu süre içerisinde 5, 10, 20, 30, 45 ve 60. dakikalarda örnekler toplanarak analiz edilmiştir.

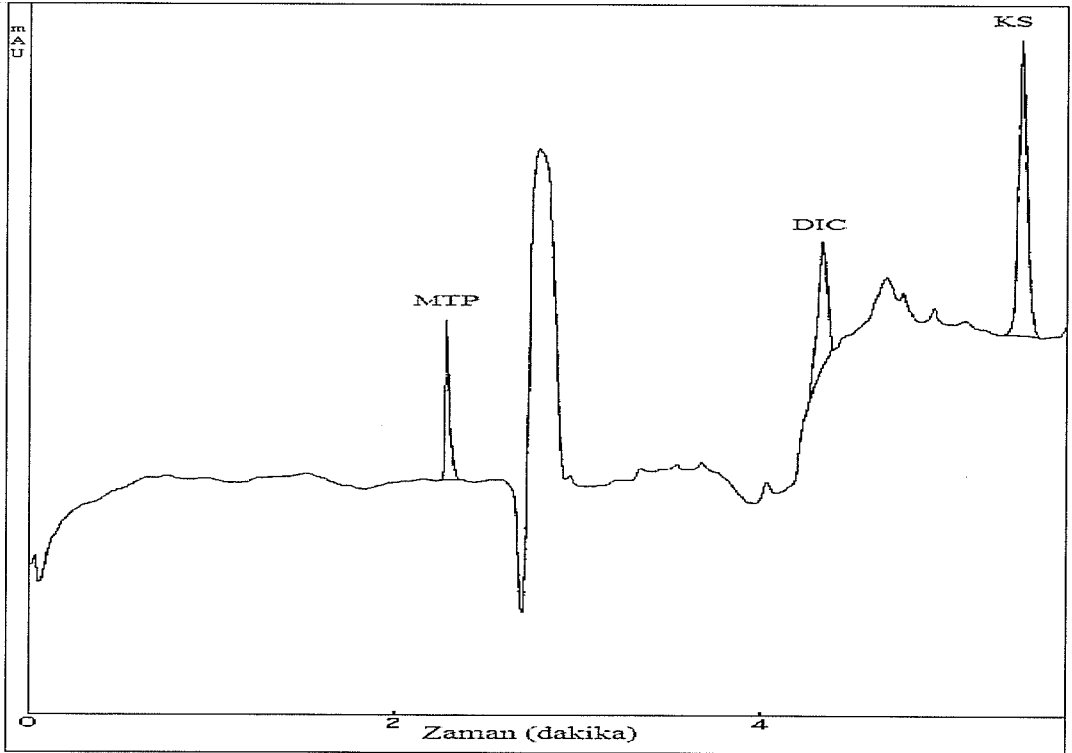
Ön inkübasyon süresinin belirlenebilmesi için örnekler çalkalamalı su banyosunda 5 dk ve 10 dk bekletilmiştir. Bu denemeler sonucunda, örneklerin 37 °C'a ulaşabilmeleri için 10 dk bekletilmesinin daha uygun olduğuna karar verilmiştir.

KS ve DIC'in çözücülerinin metanol olması ve kapiler elektroforetik ve yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemlerin analiz koşullarında organik çözücü olarak metanol kullanılması göz önünde bulundurularak çalışmada reaksiyonun durdurulması için metanol kullanılmasına karar verilmiştir. 200 µL örnek hacmi için 400 µL metanol kullanılarak reaksiyon durdurulmuştur.

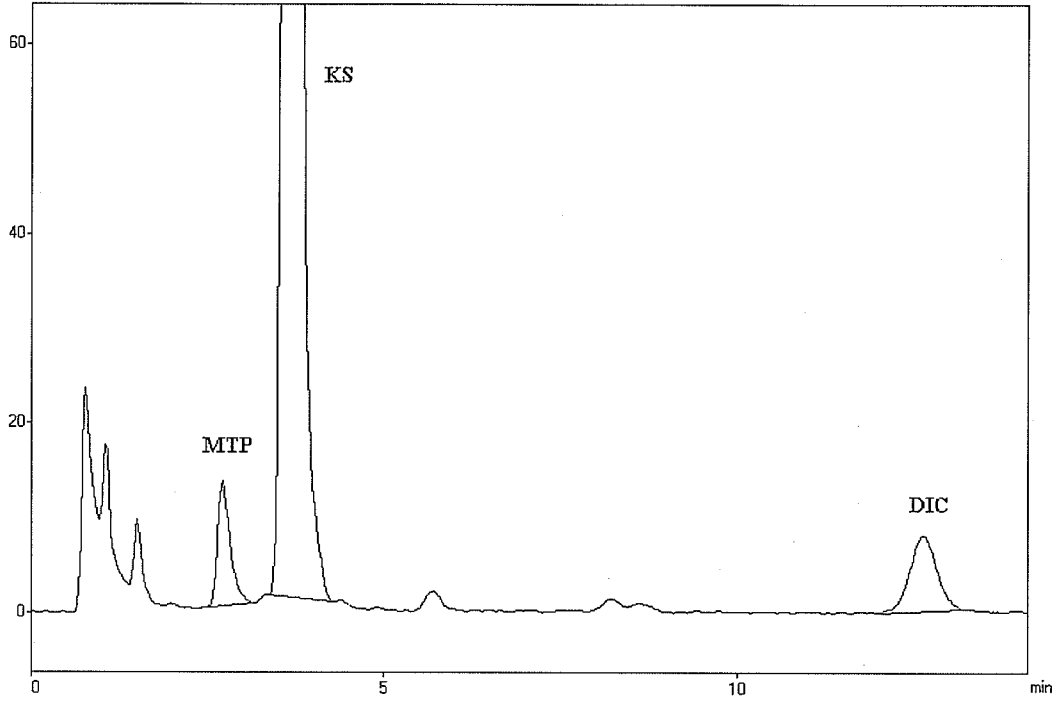
Bort ve ark.nın (1999) yaptığı çalışmada DIC'in minör oksidatif yollarının belirlenmesi için örneklerin analizi amacı ile iki YPSK yöntemi geliştirilmiştir. NADPH ve mikrozomal proteinin analiz yönteminde herhangi bir girişime neden olup olmadığını araştırmak amacı ile NADPH'sız ve proteinsiz örnekler hazırlanarak analiz edilmiştir. Bu çalışmadan hareketle *in vitro* çalışmada optimizasyon aşamasına geçmeden önce, deney ortamında bulunan mikrozomal proteinlerin ve reaksiyonu başlatmak için kullanılan NADPH'ın analiz edilecek maddelerle herhangi bir girişim yapıp yapmadığını gözlemek için 2 grup boş çözelti hazırlanmıştır. İlk gruptaki örnekler mikrozomal protein yerine aynı hacimde stok A eklenmiştir. İkinci gruptaki örnekler ise NADPH yerine, yine aynı hacimde NADPH'ın çözücüsü olarak kullanılan su eklenmiştir. Her iki grup örnek de hem KE hem de YPSK ile analiz edilmiştir. Elde edilen elektroferogram ve kromatogramlar **Şekil 46-49'**da verilmektedir.



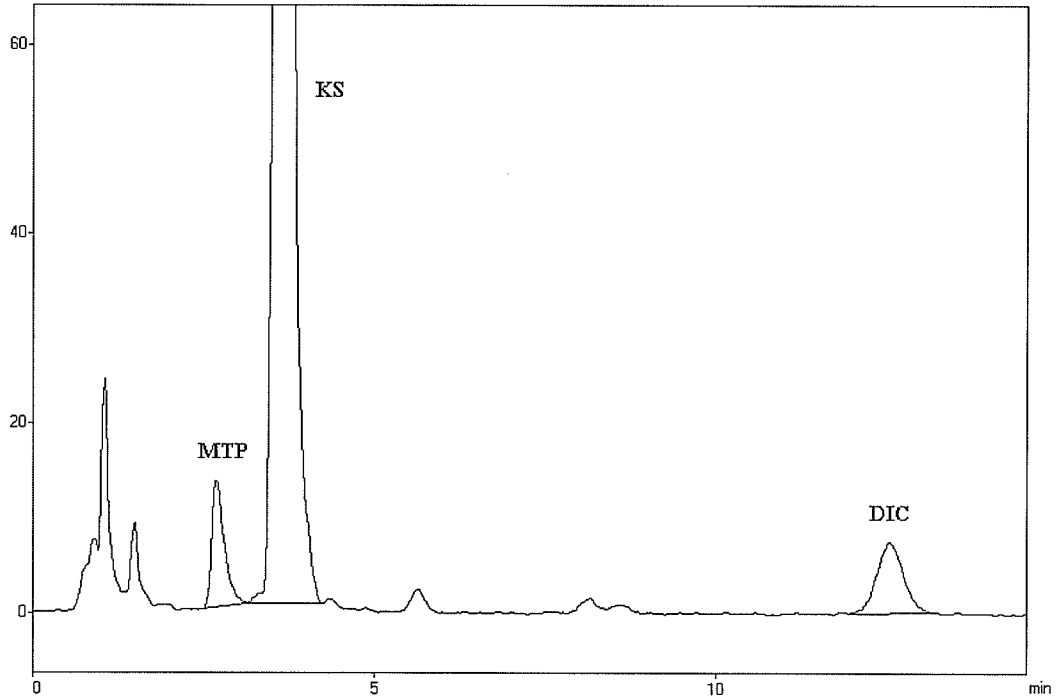
Şekil 46. Kapiler Elektroferez Yöntemiyle İncelenen Mikrozomal Proteinsiz Örneğe Ait Elektroferogram



Şekil 47. Kapiler Elektroferez Yöntemiyle Reaksiyon Başlatıcı Ajan Kullanılmadan İncelenen Örneğe Ait Elektroferogram



Şekil 48. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemiyle İncelenen Mikrozomal Proteinsiz Örneğe Ait Kromatogram



Şekil 49. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemiyle Reaksiyon Başlatıcı Ajan Kullanılmadan İncelenen Örneğe Ait Kromatogram

Şekil 46-49'da verilen elektroferogram ve kromatogramlar incelendiğinde, gerek mikrozomal protein kullanılmadan hazırlanan örneklerin, gerekse NADPH eklenmeden hazırlanan örneklerin, hem KE hem de YPSK ile analizlerinde,

analizi bozacak şekilde herhangi bir girişime neden olmadıkları görülmüş ve önerilen yöntemlerin ölçümlerin duyarlı olarak yapılmasına olanak sağlayacak kadar spesifik olduğuna karar verilmiştir.

Çalışma süresince mikrozomal proteinler -80 °C'ta saklanmıştır. Deney yapılacak günlerde gerekli miktarda protein -20 °C'lık buzdolabına aktarılmıştır. Deneyden hemen önce oda sıcaklığına gelmesi sağlanmış ve bekletilmeden kullanılmıştır. NADPH çözeltisi ise kararlılık problemi nedeniyle deneylerden hemen önce ve genellikle ön inkübasyon sürecinde taze hazırlanarak kullanılmıştır. Ayrıca çalışmada DIC metabolitlerinin analizi gerçekleştirilmediği için, ilaç etkileşimleri deneyleri DIC'in metabolize olarak azalması prensibine göre gerçekleştirilmiştir.

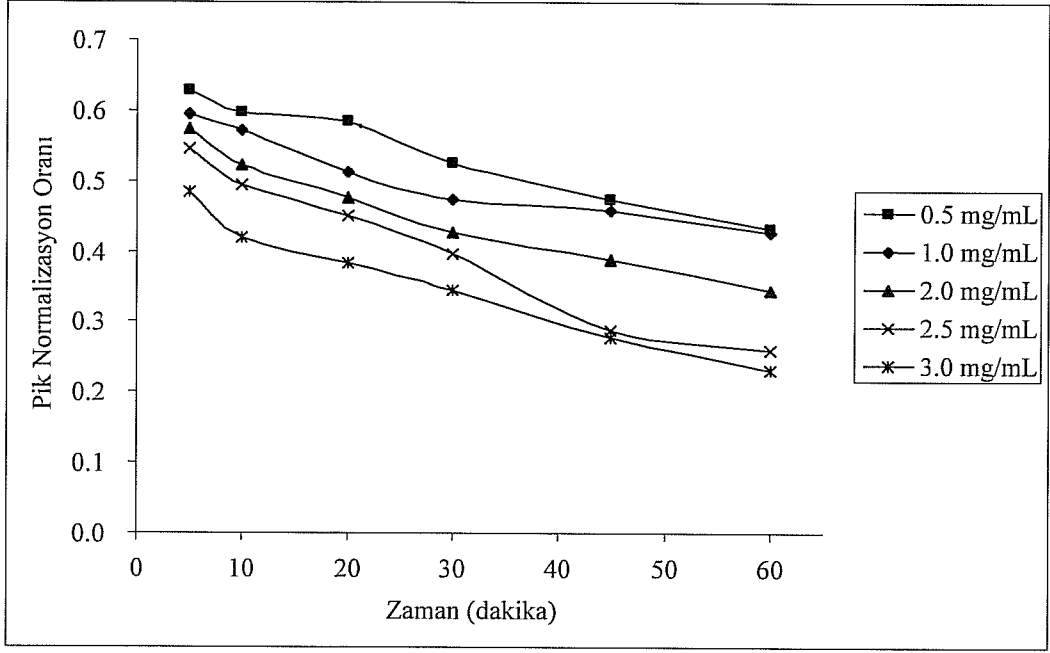
Bu çalışma koşulları belirlendikten sonra sırasıyla mikrozomal protein derişimi, substrat olarak DIC derişimi ve DIC'in CYP 2C9 enzimi tarafından metabolize edilmesini en fazla etkileyen KS derişiminin belirlenmesi aşamasına geçilmiştir.

Mikrozomal protein derişimi

İnkübasyon ortamlarında mikrozomal protein derişiminin 0.2 – 4.0 mg/mL kullanılması gerektiği (Zhang ve ark., 2008) ve bu aralıkta mikrozomal protein derişimlerini kullanan çeşitli literatürler (Tang ve ark., 2000; Kumar ve ark., 2002; Prost ve Thormann, 2003; Taavitsainen, 2001; Yamazaki ve ark., 1997) incelendikten sonra kullanılacak mikrozomal protein derişimine karar verebilmek için 0.5, 1.0, 2.0, 2.5 ve 3.0 mg/mL derişimde mikrozomal protein içeren örnekler hazırlanmıştır. 60 dk içerisinde, CYP 2C9 tarafından DIC'in metabolize edilmeden ortamda kalan miktarı, KE ile analiz edilerek kullanılacak mikrozomal protein derişimine karar verilmiştir.

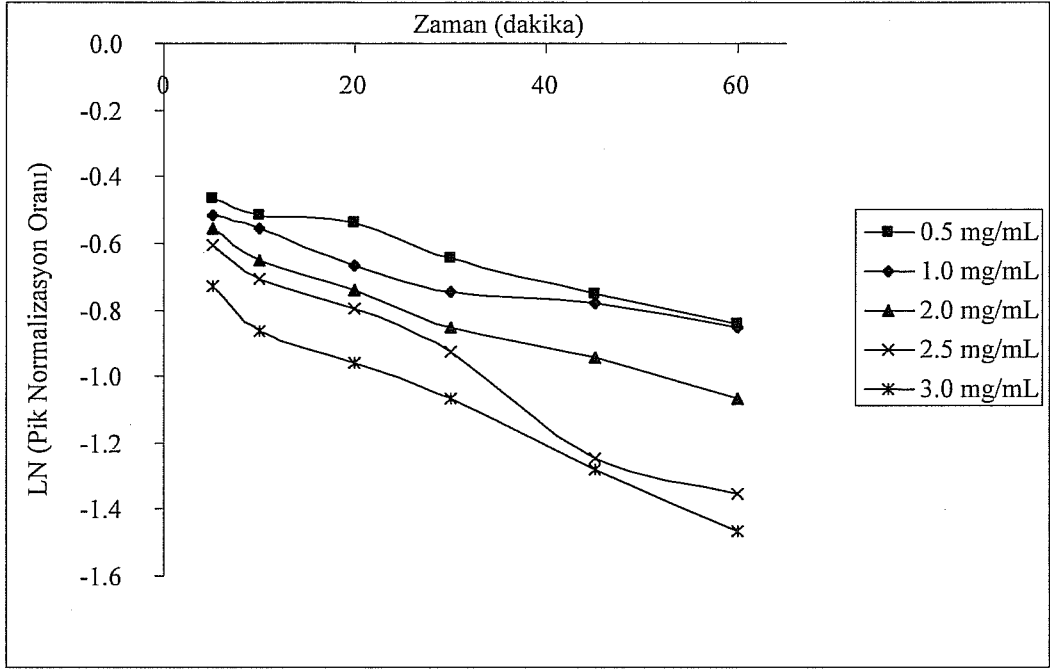
Bunun için 52.04 mg/mL derişimdeki mikrozomal protein stok çözeltisi, potasyum fosfat tamponu ile istenen derişimlere seyreltilerek her inkübasyon ortamına 100 µL mikrozomal protein eklenmiştir. İnkübasyon ortamı için 1020 µL stok A üzerine, 100 µL mikrozomal protein eklendikten sonra, 140 µL DIC eklenmiştir. DIC'in ortamdaki son derişimi 50 mM'dır. Bu inkübasyon karışımı 37 °C'ta 10 dk çalkalanmaya bırakılmıştır. Sonra 140 µL NADPH çözeltisi ile reaksiyon başlatılmıştır. NADPH eklenmesiyle inkübasyon toplam hacmi 1.4 mL olmuştur. NADPH eklenmesinin hemen ardından mikroreaksiyon tüpleri yine 37 °C'ta çalkalanmaya devam edilmiştir. T₀ zamanı kaydedildikten sonra 5, 10, 20, 30, 45 ve 60. dakikalarda 200'er µL örnek alınarak her örneğin üzerine 400 µL metanol eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Gerekli santrifüj işlemleri ve IS'nin ortama eklenmesinden sonra örnekler KE ile analiz edilmiştir. Bu deney prosedürü her mikrozomal protein derişimi için 2 tekrarlı olarak yapılmış ve hesaplamalarda bu değerlerin ortalaması kullanılmıştır.

DIC'in MTP'ye göre PNO değerleri hesaplandıktan sonra mikrozomal protein derişimine karşı çizilen grafik **Şekil 50**'de sunulmaktadır.



Şekil 50. Kapiler Elektroforez Yöntemi ile Mikrozomal Protein Derişimi Analizinin Grafıksel Gösterimi

İncelenen mikrozomal protein derişimlerinin analizlerinde, 5. dk sonuçları ile 60. dk sonuçları karşılaştırıldıklarında, zaman içerisinde en büyük fark 3.0 mg/mL mikrozomal protein içeren örneklerde gözlenmiştir. **Şekil 50**'de görüldüğü gibi, DIC'in MTP'ye karşı PNO kullanılarak elde edilen eğride, 3.0 mg/mL derişimde mikrozomal protein içeren örnekte DIC'in en yüksek oranda metabolize olduğu gözlenmiştir. 60 dk sonunda ortamda metabolize edilmeden kalan DIC miktarının, diğer mikrozomal protein derişiminde daha yüksek gözlenmesine karşın, 3.0 mg/mL mikrozomal protein derişiminde daha belirgin bir metabolizma eğrisi elde edilmiştir. **Şekil 51**'de bu mikrozomal protein derişimlerine karşı PNO değerlerinin, doğrusallaştırılması amacıyla çizilen logaritmik grafik sunulmaktadır.



Şekil 51. Kapiler Elektrozefrez Yöntemi ile Mikrozomal Protein Derişimi Analiz Sonuıların Logaritmik Grafiği

Mikrozomal protein derişimlerine karşı PN oranlarının ln değerleri kullanılarak elde edilen grafikte, 3.0 mg/mL mikrozomal protein derişimine sahip örneğin en doğrusal eğrilerden biri olduğu Şekil 51’de görölmektedir. Çizelge 40’ta da bu derişimlere karşı PN oranlarının ln değerlerinin kullanılmasıyla elde edilen grafiğe yönelik istatistiksel değerlendirmeler sunulmaktadır.

Çizelge 40. Kapiler Elektrozefrez Yöntemi ile Mikrozomal Protein Derişimi Analiz Verileri

	0.5 mg/mL	1.0 mg/mL	2.0 mg/mL	2.5 mg/mL	3.0 mg/mL
a	-0.0069	-0.0060	-0.0089	-0.0141	-0.0128
b	-0.4296	-0.5179	-0.5504	-0.5409	-0.6980
r	0.9944	0.9687	0.9905	0.9899	0.9919

a: Eğim, b: Kesim, r: Korelasyon katsayısı

Çizelge 40’taki sonuçlarda 3.0 mg/mL mikrozomal protein derişimine sahip örnekler ile yüksek korelasyon katsayılı doğrulardan birinin elde edildiği görölmüştür. 3.0 mg/mL mikrozomal protein derişimine sahip örneğin yukarıda sayılan nedenlerle çalışmada kullanılmasına karar verilmiştir.

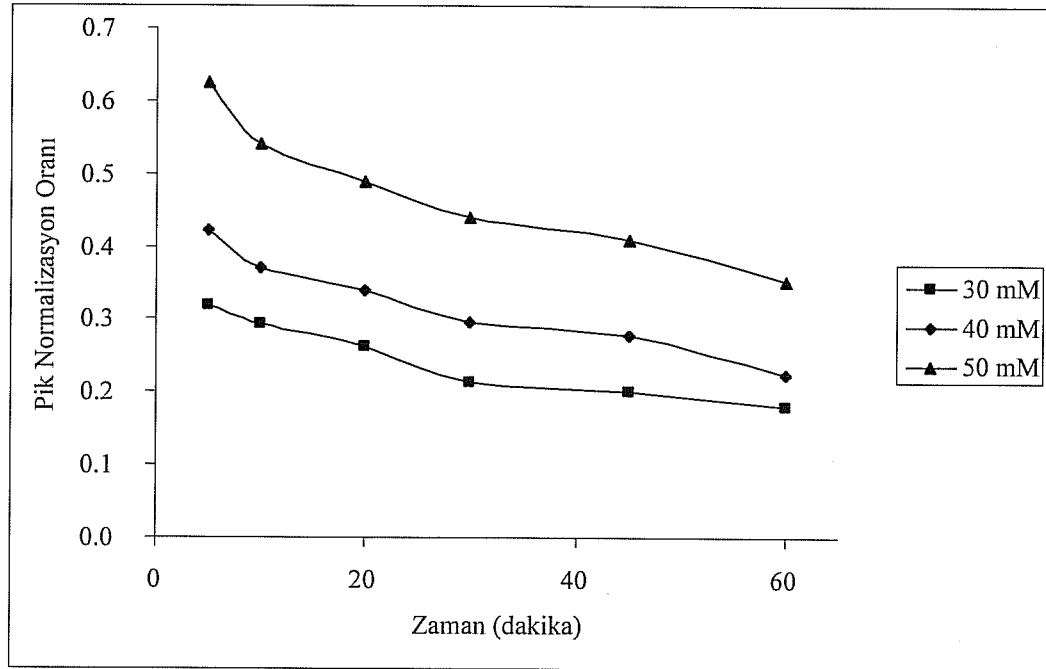
Substrat derişimi (diklofenak sodyum)

Mikrozomal protein derişimine karar verildikten sonra kullanılacak substrat derişimine karar verilmesi aşamasına geçilmiştir. Bu amaçla CYP 2C9 için standart bir substrat olan DIC’in 30, 40 ve 50 mM düzeyindeki çözeltilerini içeren örnekler hazırlanmıştır. 60 dk içerisinde, CYP 2C9 tarafından DIC’in metabolize

edilmeden ortamda kalan miktarı, KE ile analiz edilerek kullanılacak substrat derişimine karar verilmiştir.

Bunun için 52.04 mg/mL derişimdeki mikrozomal protein stok çözeltisi potasyum fosfat tamponu ile son derişimi 3 mg/mL olacak şekilde seyreltilerek her inkübasyon ortamına 100 µL eklenmiştir. İnkübasyon ortamı için 1020 µL stok A üzerine, 100 µL mikrozomal protein eklendikten sonra 140 µL DIC eklenmiştir. DIC'in inkübasyon ortamındaki son derişimleri sırasıyla 30, 40 ve 50 mM olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu inkübasyon karışımı 37 °C'ta 10 dk çalkalamalı su banyosunda bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda 140 µL NADPH çözeltisi ile reaksiyon başlatılmış ve inkübasyon karışımı yine su banyosuna yerleştirilmiştir. T₀ zamanı kaydedildikten sonra 5, 10, 20, 30, 45 ve 60. dakikalarda 200'er µL örnek alınmış ve üzerlerine 400 µL metanol eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Gerekli santrifüj işlemleri ve IS'nin ortama eklenmesinden sonra örnekler KE ile analiz edilmiştir. Bu deney prosedürü her mikrozomal protein derişimi için 2 tekrarlı olarak yapılmış ve hesaplamalarda bu değerlerin ortalaması kullanılmıştır.

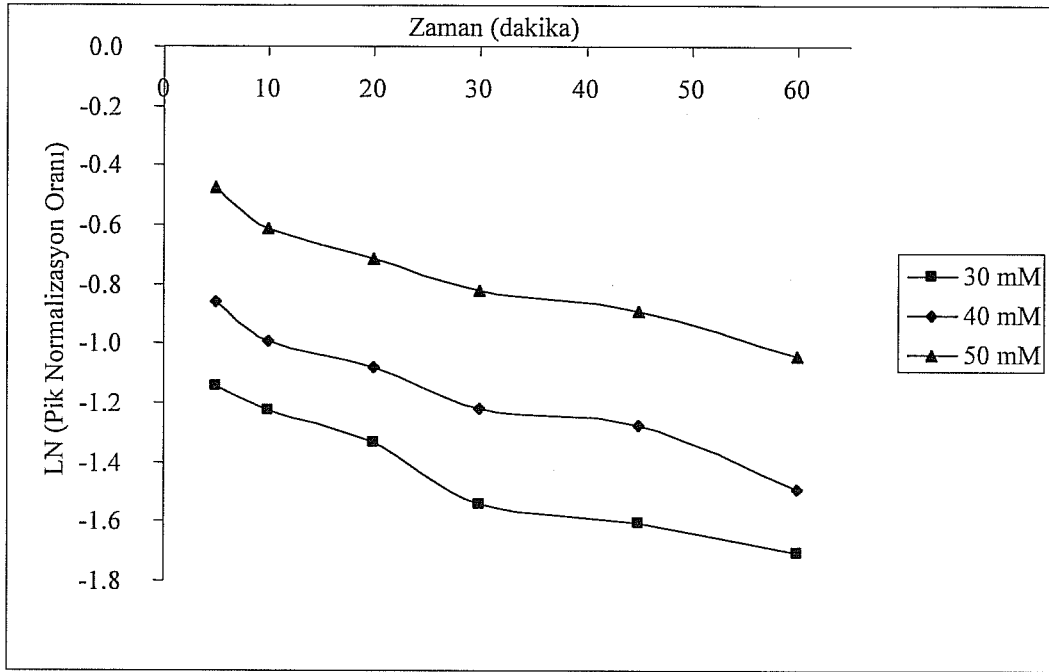
DIC'in MTP'ye göre PNO değerleri hesaplandıktan sonra ortamda metabolize edilmeden kalan DIC (substrat) derişimine karşı çizilen grafik **Şekil 52**'de sunulmaktadır.



Şekil 52. Kapiler Elektrozefrez Yöntemi ile Substrat Derişimi (Diklofenak Sodyum) Analizinin Grafikscl Gösterimi

3.0 mg/mL mikrozomal protein derişimi için, substrat olarak 30, 40 ve 50 mM derişimde DIC çözeltilerini içeren örneklerden, 60 dk içinde en büyük azalış 50 mM DIC içeren örnekte gözlenmiştir. 60 dk sonunda CYP 2C9 tarafından metabolize edilemeden ortamda kalan en yüksek DIC miktarı, 50 mM DIC içeren örneğe aittir. **Şekil 53**'te zamana karşı, bu substrat derişimleri için hesaplanan

PNO değerleri ile elde edilen eğrilerin, doğrusallaştırılması amacıyla çizilen logaritmik grafik sunulmaktadır.



Şekil 53. Kapiler Elektropherez Yöntemi ile Substrat Derişimi (Diklofenak Sodyum) Analiz Sonuçlarının Logaritmik Grafiği

Şekil 53'teki logaritmik değerler kullanılarak elde edilen doğrular için yapılan istatistiksel hesaplamalar Çizelge 41'de verilmektedir.

Çizelge 41. Kapiler Elektropherez Yöntemi ile Substrat Derişimi (Diklofenak Sodyum) Analiz Verileri

	30 mM	40 mM	50 mM
a	-0.0104	-0.0104	-0.0094
b	-1.1309	-0.8588	-0.4923
r	0.9729	0.9823	0.9768

a: Eğim, b: Kesim, r: Korelasyon katsayısı

Çizelge 41 incelendiğinde 3.0 mg/mL mikrozomal protein derişimi ve incelenen substrat derişimleri için elde edilen tüm eğrilerin yüksek korelasyon katsayısına sahip olduğu görülmektedir. Ancak, substrat derişimleri arasında t=0 anı ile t=60 dk aralığında, CYP 2C9 tarafından en fazla oranda metabolize edilen DIC'in 50 mM derişimine sahip örnektir. Dolayısı ile ortamda CYP 2C9 tarafından metabolize edilmeden kalan en yüksek DIC oranı da, 60 dk sonunda, 50 mM DIC içeren örnekte bulunmuştur. t=0 anı ile t=60 dk aralığında DIC'in metabolizma eğrisinde gözlenen değişimin fazla olması analitik açıdan, elde edilen sonuçların karşılaştırılması ve analizci kaynaklı hataların en aza indirilmesinde önem

taşımaktadır. Ortamda metabolize edilmeden kalan DIC miktarının yüksek olması kullanılan analitik yöntemin duyarlılığı ve miktar tayininin yapılabilmesi açısından önemli olduğu için çalışmada substrat derişimi olarak 50 mM DIC içeren örneklerin kullanılmasına karar verilmiştir.

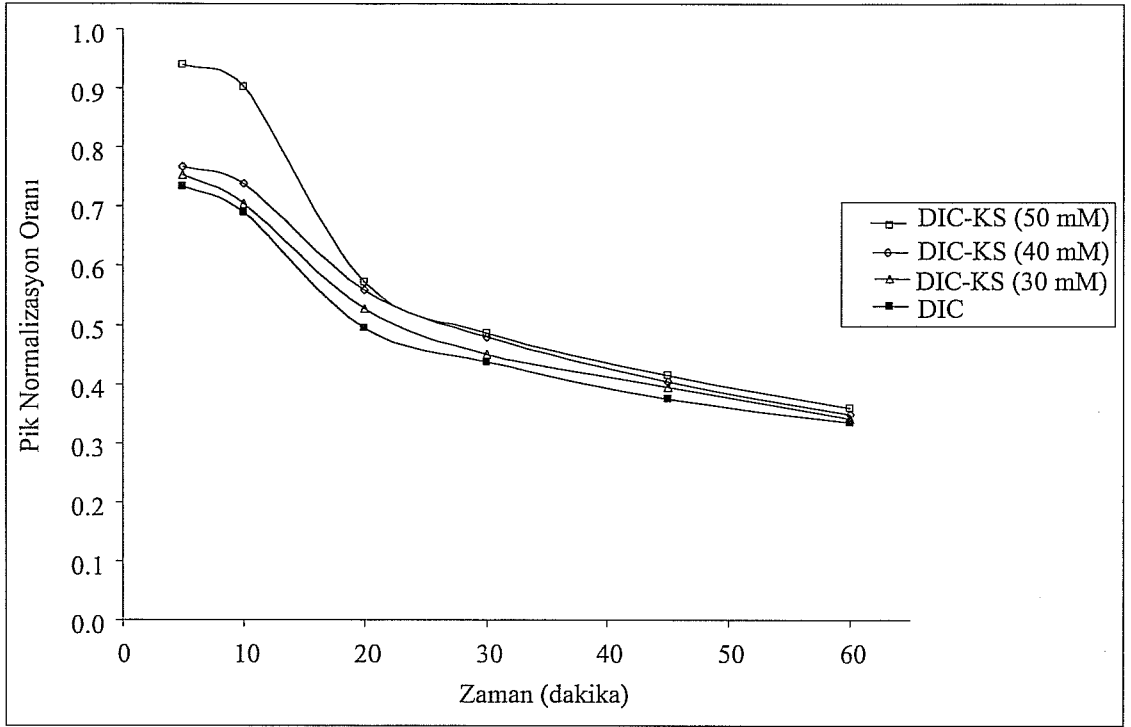
Substrat derişimi (kandesartan)

Substrat olarak kullanılacak DIC derişimi belirlendikten sonra KS'nin CYP 2C9 ve DIC metabolizması üzerindeki etkisinin gözlenebilmesi için kullanılacak KS derişimi araştırılmıştır.

Bu amaçla 3.0 mg/mL mikrozomal protein ve yalnız 50 mM DIC içeren örnekler hazırlanmıştır. Daha sonra 3.0 mg/mL mikrozomal protein, 50 mM DIC ve sırasıyla 30, 40 ve 50 mM düzeyinde KS içeren 3 grup örnek hazırlanmıştır. Belirtilen 3 grup örnek için KE ve YPSK yöntemleri ile elde edilen sonuçlar, yine aynı yöntemlerle analiz edilen yalnız 50 mM DIC içeren örneklerle karşılaştırılmıştır.

Bunun için 52.04 mg/mL derişimdeki mikrozomal protein stok çözeltisi, potasyum fosfat tamponu ile son derişimi 3.0 mg/mL olacak şekilde seyreltilerek her inkübasyon ortamına 100 µL eklenmiştir. İnkübasyon ortamına 880 µL stok A üzerine 100 µL 3.0 mg/mL son derişime sahip mikrozomal protein eklendikten sonra 140 µL DIC (son derişimi 50 mM) eklenmiştir. Bu karışımın üzerine 140 µL KS eklenmiştir. KS'nin örneklerdeki son derişimi sırasıyla 30, 40 ve 50 mM olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu inkübasyon karışımı 37 °C'ta 10 dk çalkalanmaya bırakıldıktan sonra 140 µL NADPH çözeltisi ile reaksiyon başlatılmıştır. T₀ zamanı kaydedildikten sonra 5, 10, 20, 30, 45 ve 60. dakikalarda 200'er µL örnek alınarak 400 µL metanol ile reaksiyon durdurulmuştur. Gerekli santrifüj işlemleri ve IS'nin ortama eklenmesinden sonra örnekler KE ve YPSK ile analiz edilmiştir. Bu deney prosedürü her mikrozomal protein derişimi için 2 tekrarlı olarak yapılmış ve hesaplamalarda bu değerlerin ortalaması kullanılmıştır.

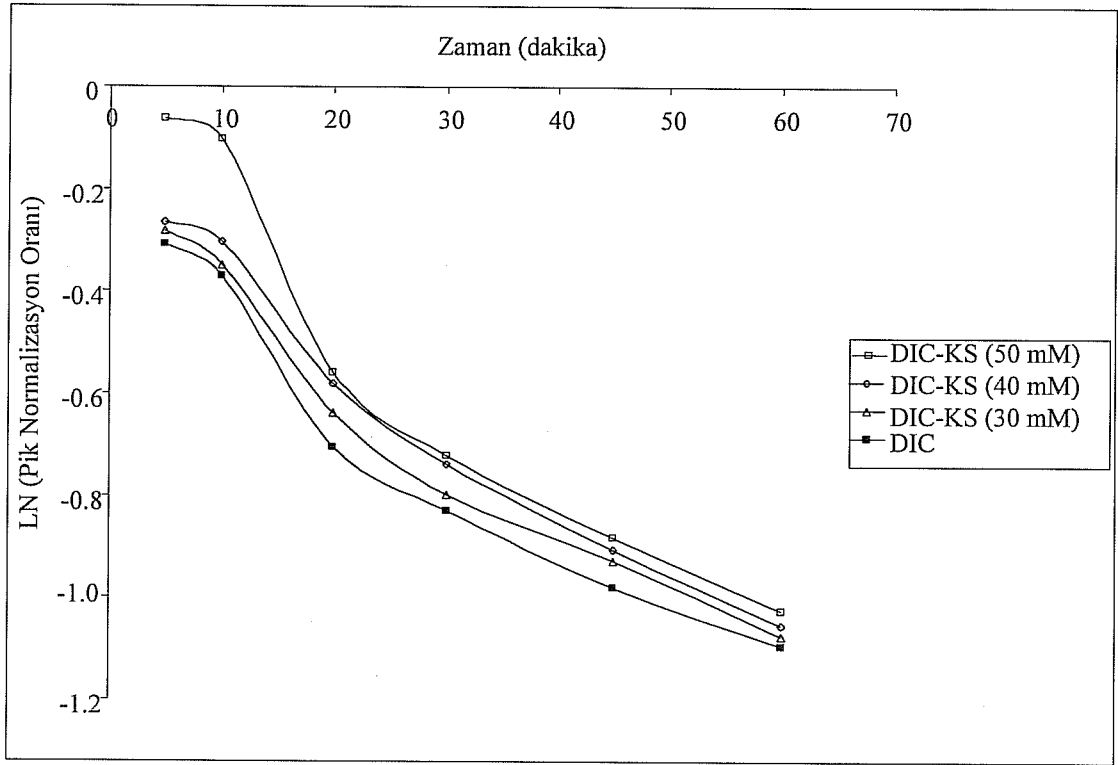
KE yöntemi ile KS ve DIC'in MTP'ye göre PNO değerleri hesaplanarak elde edilen grafik **Şekil 54**'te görülmektedir.



Şekil 54. Kapiler Elektroforez Yöntemi ile Substrat Derişimi (Kandesartan) Analizinin Grafıksel Gösterimi

Reaksiyon ortamına eklenen her KS derişimi, DIC'in metabolize olmasını etkilemiş ve DIC, ortamda KS bulunması nedeni ile değişik oranlarda metabolize olamadan ortamda kalmıştır. 50 mM KS'nin bulunduğu ortamda CYP 2C9 tarafından metabolize edilemeden kalan DIC miktarı en yüksektir. DIC'in miktar tayininin geliştirilen her iki analiz yöntemi ile de yapılabilmesi açısından ortamda kalan DIC miktarı önemlidir. **Şekil 54**'ten de görüldüğü gibi KS'nin 50 mM düzeyindeki derişimini içeren örnek, DIC eğrisinden 60 dakikalık reaksiyon süresinde en çok farklılık gösteren örnek olmuştur.

KE yöntemi için hesaplanan PNO değerleri ile elde edilen eğrilerin, doğrusallaştırılması ve istatistiksel değerlendirmelerinin yapılabilmesi amacıyla çizilen logaritmik grafik **Şekil 55**'te sunulmaktadır.



Şekil 55. Kapiler Elektroz Yöntemi ile Substrat Derişimi (Kandesartan) Analiz Sonuçlarının Logaritmik Grafiği

KE yöntemi ile analiz edilen örnekler için hesaplanan logaritmik değerlerin kullanılmasıyla elde edilen doğrulara ait istatistiksel bulgular Çizelge 42’de verilmektedir.

Çizelge 42. Kapiler Elektroz Yöntemi ile Substrat Derişimi (Kandesartan) Analiz Verileri

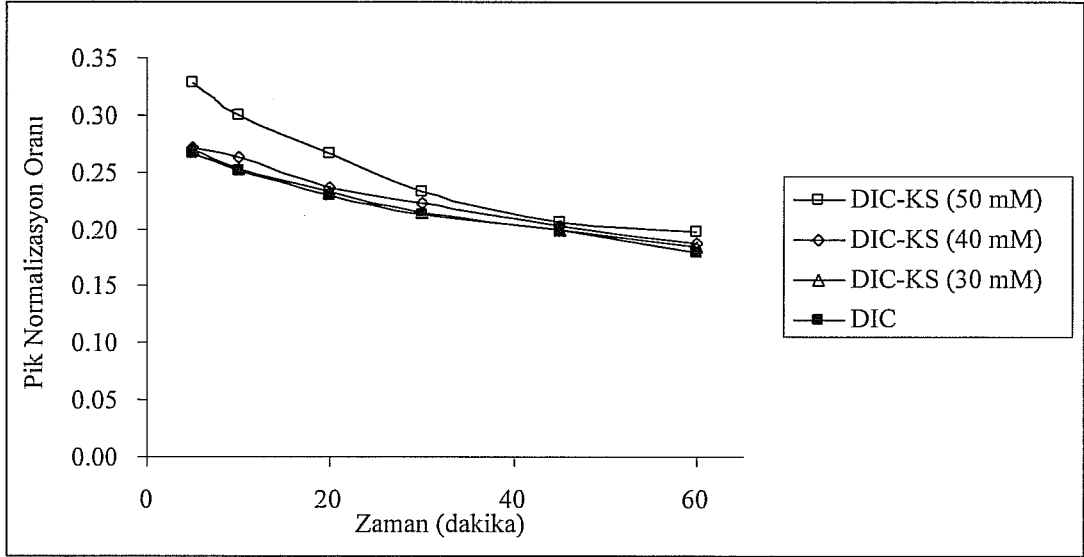
	DIC	DIC + 30 mM KS	DIC + 40 mM KS	DIC + 50 mM KS
a	-0.0181	-0.0148	-0.0146	-0.0146
b	-0.0459	-0.2209	-0.2654	-0.3027
r	0.9535	0.9821	0.9725	0.9619

a: Eğim, b: Kesim, r: Korelasyon katsayısı

DIC ve DIC ile birlikte çeşitli derişimlerde KS içeren örneklere ait logaritmik grafiklerden yüksek korelasyon katsayılı doğrular elde edilmiştir. 30, 40 ve 50 mM KS düzeylerinin her biri için kabul edilebilir düzeyde yüksek korelasyonlu doğrular elde edilmesine karşın, 60 dakikalık reaksiyonda DIC eğrisinden en farklı ve yüksek değerlere sahip olan örnek 50 mM KS içeren örnektir.

KE yöntemiyle elde edilen bu sonuçlar, YPSK yöntemi ile de karşılaştırılmıştır.

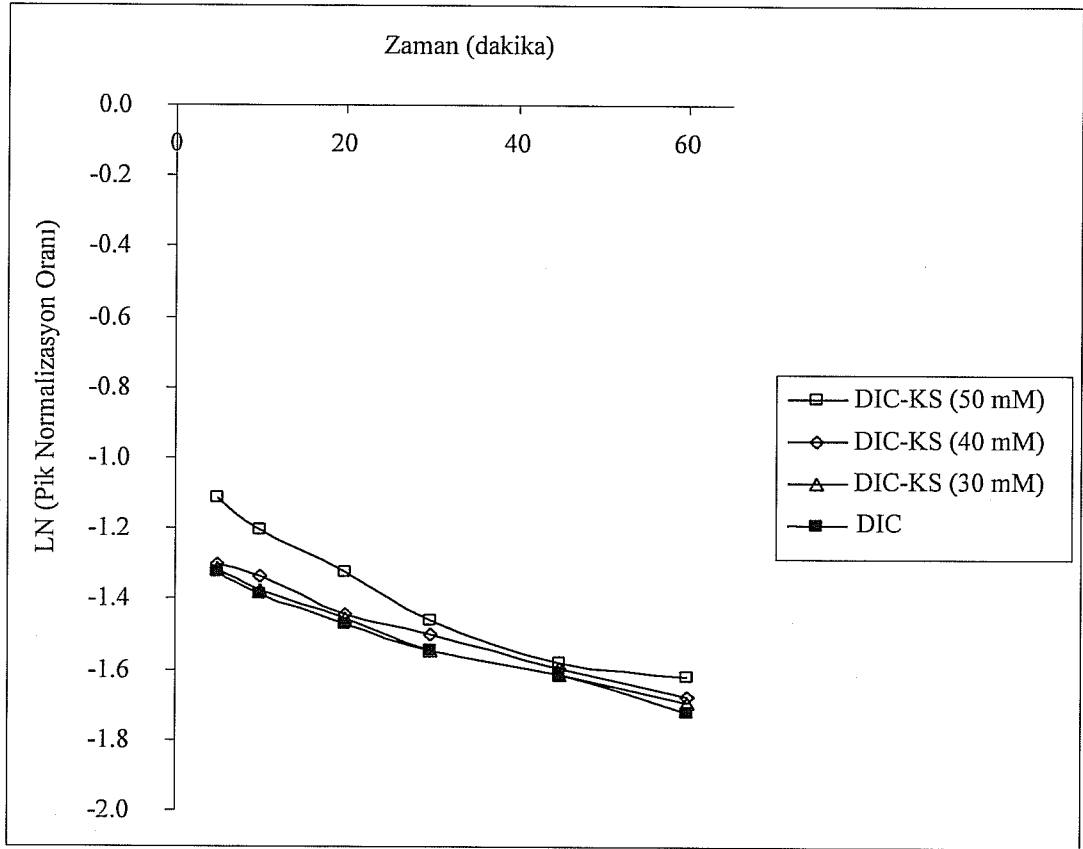
YPSK yöntemi ile yalnız DIC ve DIC ile birlikte 30, 40 ve 50 mM KS içeren örneklerin analizi sonucunda, MTP'ye karşı hesaplanan PNO değerlerine ait grafik **Şekil 56**'da sunulmaktadır.



Şekil 56. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi ile Substrat Değişimi (Kandesartan) Analizinin Grafikselsel Gösterimi

Şekil 56'daki grafikte de **Şekil 55**'te görülen grafikteki gibi tüm KS derişimleri, DIC'in metabolizma eğrisine etkilemiştir. Metabolize edilemeden ortamda kalan DIC miktarı, 60. dakikada toplanan örnekler de dahil olmak üzere, geliştirilen bu yöntemle de tayin edilebilmiştir. DIC'in metabolizma eğrisine göre en büyük farkın, 50 mM KS içeren örnekte gözleendiği YPSK yöntemi ile de görülmektedir.

YPSK yöntemi ile yapılan analizlerde hesaplanan PNO değerleri kullanılarak elde edilen eğrilerin, doğrusallaştırılması ve istatistiksel değerlendirmelerinin yapılabilmesi amacıyla çizilen logaritmik grafik **Şekil 57**'de verilmektedir.



Şekil 57. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi ile Substrat Derişimi (Kandesartan) Analiz Sonuçlarının Logaritmik Grafiği

YPSK yöntemi ile analiz edilen DIC ve DIC ile birlikte KS içeren örnekler için hesaplanan logaritmik değerlerin kullanılmasıyla elde edilen doğrulara ait istatistiksel hesaplamalar Çizelge 43'te verilmektedir.

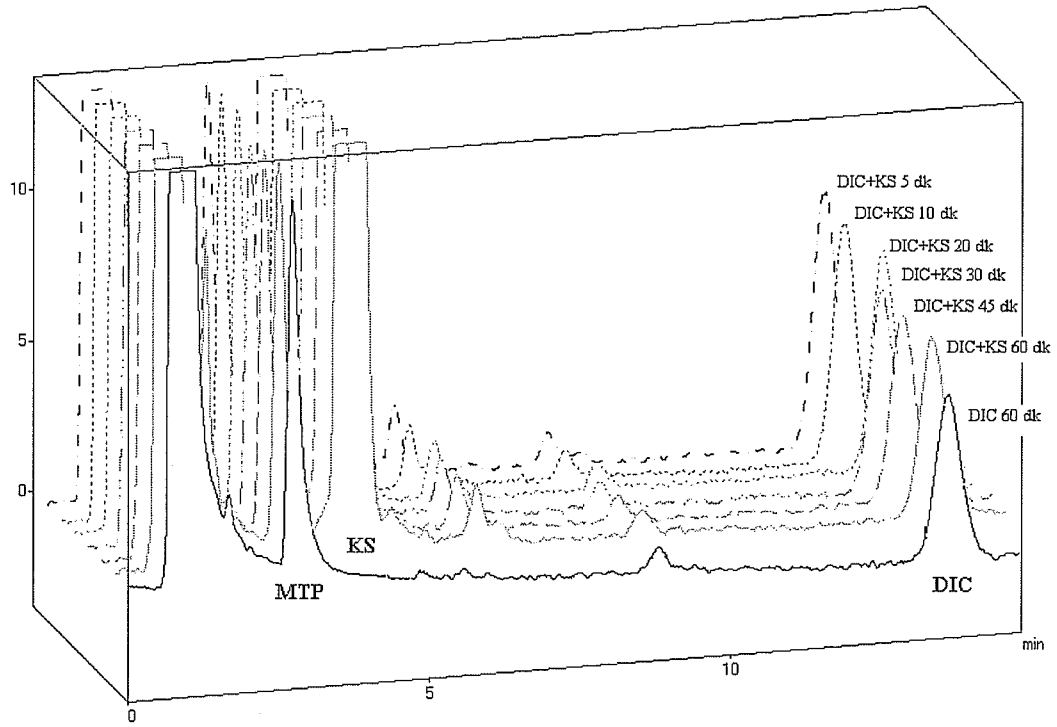
Çizelge 43. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi ile Substrat Derişimi (Kandesartan) Analiz Verileri

	DIC	DIC + 30 mM KS	DIC + 40 mM KS	DIC + 50 mM KS
a	-0.0094	-0.0069	-0.0068	-0.0069
b	-1.1165	-1.3153	-1.3069	-1.2824
r	0.9710	0.9924	0.9882	0.9935

a: Eğim, b: Kesim, r: Korelasyon katsayısı

KE yöntemiyle elde edilen değerler gibi YPSK yöntemi ile de yüksek korelasyon katsayısına sahip doğrular elde edilmiştir. KE sonuçlarını destekleyen YPSK analiz sonuçlarında da CYP 2C9 tarafından yalnız DIC'in metabolize edildiği eğriye kıyasla, DIC ve KS'yi birlikte içeren örneklerden 50 mM KS içeren örnek, en büyük farklanmayı göstermiştir.

Şekil 58'de yalnız 50 mM DIC içeren karışımdan 60. dakikada alınan örneğin kromatogramı, 50 mM DIC ve 50 mM KS içeren örneğin sırasıyla 5, 10, 20, 30, 45 ve 60. dakikalarda elde edilen kromatogramları ile karşılaştırılmıştır. Yalnız DIC içeren reaksiyon ortamından, 60. dakikada alınan örneğe ait kromatogramda, DIC'in büyük oranda CYP 2C9 tarafından metabolize edildiği ve dolayısı ile ortamda metabolize olmadan kalan DIC miktarı azaldığı için DIC'e ait pikin oldukça küçüldüğü görülmektedir. 50 mM DIC ve 50 mM KS içeren reaksiyon ortamından 60 dk boyunca toplanan örneklerin analizinde DIC piklerinin zamana karşı küçüldüğü gözlenmiştir. Ancak yine de bu piklerin, yalnız DIC içeren örneğin 60. dakikada elde edilen pikine göre daha büyük olduğu görülmüştür. Bu durum da, ortamda KS bulunmasına rağmen DIC'in 60 dk içerisinde belli bir oranda CYP 2C9 enzimi tarafından metabolize edildiğini göstermektedir. Yine de oran, ortamda yalnız DIC'in bulunduğu koşulda elde edilen metabolizma oranına göre düşüktür.

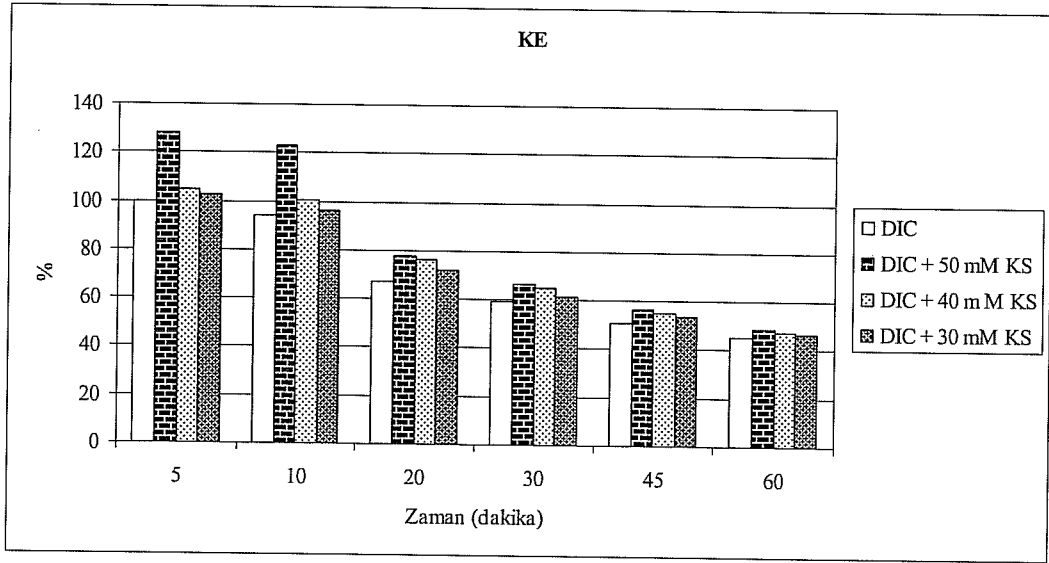


Şekil 58. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi ile Yalnız 50 mM Diklofenak Sodyum İçeren Örneğin 60. Dakikadaki Kromatogramı ile 50 mM Diklofenak Sodyum ve 50 mM Kandesartan İçeren Örneğin Tüm Zamanlardaki Kromatogramlarının Karşılaştırılması

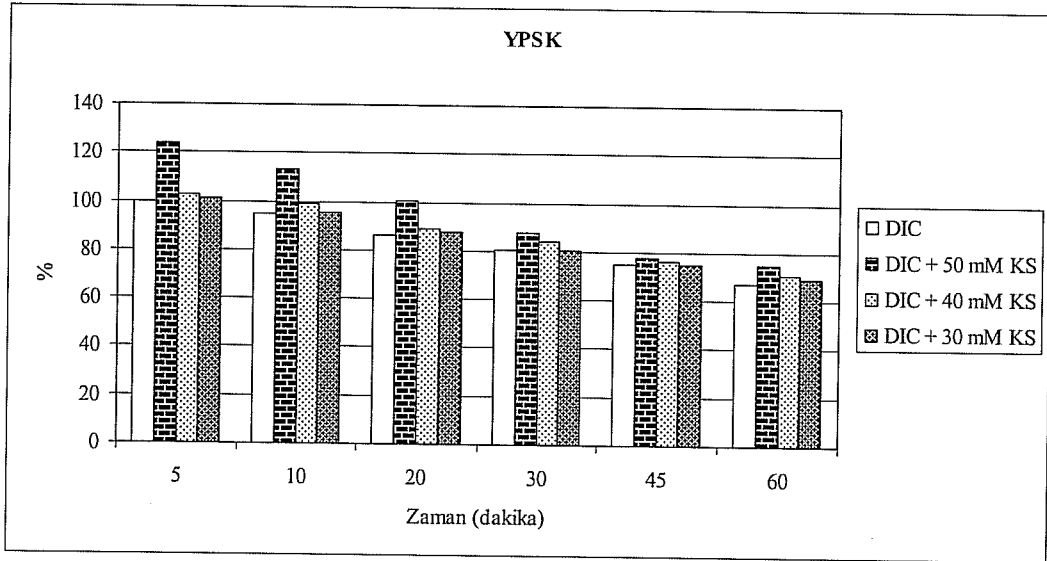
Her iki analiz sonucuna göre de 3.0 mg/mL mikrozomal protein içeren bir inkübasyon ortamına, 50 mM DIC eklenmesi ile elde edilen DIC'in metabolizma eğrisi; ortama 30 mM, 40 mM ve 50 mM KS eklenmesiyle değişim göstermiştir. Bu değişimlerin, DIC'in metabolizma eğrisine oranla en fazlası 50 mM KS kullanıldığı koşulda gözlenmiştir.

Şekil 59 ve 60'ta yalnız 50 mM DIC içeren reaksiyon ortamından 5. dakikada toplanan örnekten elde edilen değerlerin % 100 kabul edilmesi ile, zamana karşı

metabolize olmadan ortamda kalan % DIC miktarlarına ait sütun grafikleri sunulmuştur.



Şekil 59. Kapiler Elektrozefrez Yöntemi ile Zamana Karşı Metabolize Olmadan Ortamda Kalan Yüzde Diklofenak Sodyum Miktarına Ait Grafik



Şekil 60. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi ile Zamana Karşı Metabolize Olmadan Ortamda Kalan Yüzde Diklofenak Sodyum Miktarına Ait Grafik

Geliştirilen KE ve YPSK yöntemlerinin DIC için duyarlılıkları farklı olduğu için bulunan % DIC değerleri iki yöntem için birbirinden farklıdır. Yine de her iki yöntemle, toplanan her örnek zamanı için elde edilen veriler, birbiri ile uyumludur. Her iki yöntemle de gerçekleştirilen analiz sonuçlarına göre yalnız 50 mM DIC içeren bir ortam ile bu ortama KS eklenmesi ile oluşan ortam karşılaştırıldığında, ortamda metabolize olamadan kalan % DIC miktarı artmıştır.

50 mM düzeyinde KS içeren örneklerdeki farklılık, **Şekil 59 ve 60**'ta daha belirgin şekilde görülmektedir.

CYP 2C9 tarafından metabolize edilen DIC'in ortamda KS bulunması ile değişen davranışının, KS ile DIC'in CYP 2C9 enziminin aktif bölgesi için yarışmaya girerek kompetitif inhibisyon oluşturmalarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ancak yalnız KS içeren reaksiyon ortamları hazırlanarak, KE yöntemi ile gerçekleştirilen analizlerde, KS için beklenen tipik metabolizma eğrileri elde edilememiştir. Bu eğrinin elde edilememesi, Easthope ve Jarvis'in (2002), çalışmalarında belirttiği gibi KS'nin, büyük ölçüde değişmeden atılıp, küçük bir kısmının CYP 2C9 enzimi ile inaktif bir metabolite dönüştürülmesinden kaynaklanabilir. Bu durumda, KS'nin literatür (Taavitsainen ve ark., 2000) bilgilerince de desteklendiği şekilde CYP 2C9 enzimi üzerinde inhibitör etkisinin olabileceği düşünülmektedir.

Taavitsainen ve ark., (2000) tarafından yapılan çalışmada *in vivo* ortamda, sartanların, yeterli derecede yüksek derişimlere ulaşmaları durumunda, bu enzimler tarafından metabolize edilen maddeler ile anlamlı farmakokinetik etkileşimler gösterebilecekleri belirtilmiştir.

Bu çalışmada elde edilen bulgulara göre, KS ve DIC, *in vivo* koşullarda yeterli derecede yüksek derişimlere ulaşırlarsa, bu maddeler arasında anlamlı farmakokinetik etkileşimler görülebileceği düşünülmektedir. Bu açıdan çalışma sonuçları Taavitsainen ve ark., (2000) tarafından yapılan çalışma ile paralellik göstermektedir.

Kapiler elektroforez ile yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemlerinin karşılaştırılması

Geliştirilen ve *in vitro* ortamda sıçan karaciğer mikrozomları üzerinde gerçekleştirilen KS ile DIC'in etkileşimlerinin incelenmesine uygulanan KE ve YPSK yöntemlerinin, kesinliklerinden yararlanılarak istatistiksel olarak karşılaştırılabilmesi için F testi uygulanmıştır (Gündüz, 1998). F testi, 50 mM KS ve 50 mM DIC içeren örneklerin 60. dk analiz sonuçlarına uygulanmıştır. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler **Çizelge 44**'te sunulmuştur.

Çizelge 44. Kapiler Elektroforez ile Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemlerinin Karşılaştırılması

	KE	YPSK
ss	0.1921	0.1001
F hesap	0.0369	0.0100
F oran	3.68	
F tablo	5.05	
ss: Standart sapma		

KE ve YPSK yöntemleri için hesaplanan F değerlerinin oranı, tablodan bulunan F değeri ile karşılaştırıldığında, $3.68 < 5.05$ olduğu için % 95 güven düzeyinde, karşılaştırılan yöntemlerin kesinlikleri arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı söylenebilir.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Bireylerde hastalıkların artmasına bağlı olarak tedavi amacıyla pek çok ilaç birlikte kullanılabilir. Bu nedenle çoklu ilaç kullanımı sırasında ilaçlar arasındaki farmakodinamik ve farmakokinetik etkileşimlere bağlı olarak ilaçların, terapötik etkinliklerinde değişme görülebilir. Bu da ilaçların yan etkilerinde artışa veya toksik etkilere neden olabilir. Ayrıca birlikte kullanılan ilaçlardan herhangi birinin etkinliğinin yok olmasına ve bunun sonucunda hastalığın tedavi edilememesine yol açabilir. Tüm bunların ortak bir sonucu olarak tedavide başarı sağlanamayabilir.

İlaç etkileşimleri *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda incelenebilir. *In vivo* ilaç etkileşimleri çalışmaları *in vitro* çalışmaların bulgularına göre yapılmalıdır. *In vitro* çalışmalarda negatif bulgular, ilgili *in vivo* çalışmaların elenmesine yardım edebilir.

Bu çalışmada sıçan karaciğer mikrozomları kullanılarak *in vitro* ortamda KS ile DIC'in ilaç etkileşimleri incelenmiş ve bu amaçla, örneklerin analizi için KE yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntem ile elde edilen sonuçlar geliştirilen diğer bir yöntem olan YPSK sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Her iki yöntemin de validasyonu gösterilmiş ve karşılaştırmaları istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

KE günümüzde pek çok biyolojik örneğin analizine başarı ile uygulanan hızlı, güvenilir, ekonomik, kesin ve duyarlı sonuçlar veren bir yöntemdir. Biyolojik örneklerin herhangi bir ön işleme gerek duyulmaksızın sisteme verilebilmesi, KE yöntemine pek çok standart yönteme kıyasla üstünlük sağlamaktadır. Bu çalışmada geliştirilen basit, hızlı, az miktarda örnek gerektiren ve ekonomik KE yöntemi ile de yüksek kesinliğe sahip, duyarlı sonuçlar elde edilmiştir.

Bu çalışmada saflık kontrolleri erime noktası tayini ve kızıl ötesi spektrofotometri yöntemleri ile yapılan KS ve KSSL ve IS olarak kullanılan MTP ve LNS standart maddeleri için UV spektrofotometri yöntemi kullanılarak KE yönteminde kullanılacak dalga boyunu belirlemek amacıyla 200-360 nm dalga boyu aralığında UV spektrumları kaydedilmiştir. 214 nm dalga boyunda UV detektör ile çalışmaya karar verildikten sonra KE yöntemi ile ilgili cihaz ve yöntem optimizasyonu işlemleri gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon işlemleri sırasında çalışma tamponu olarak kullanılması uygun bulunan borat tamponu derişimi ve pH'ı, organik çözücü miktarı, ayırma işlemleri için uygulanan potansiyel ve örnek enjeksiyon süresi gibi parametrelerin maddelerin göç zamanına, madde pik yanıtlarının etkinliğine (N) ve IS olarak kullanılan maddelerle birlikte yapılan değerlendirmeler sonucunda PNO değerlerine olan etkileri incelenmiştir. Maddelerin analizine olanak sağlayacak en uygun ayırma koşulları olarak 15 mM borat, % 10 (h/h) metanol içeren, pH'ı 8.50 olan çalışma tamponu, 25 kV potansiyel ve 1 sn enjeksiyon süresi olacak şekilde belirlenmiştir. Belirtilen koşullarda KSSL'nin 5.1 dk ve KS'nin 7.5 dk göç zamanına sahip olduğu gözlenmiştir. Çalışmada IS olarak kullanılan MTP 3.3 dakikada ve LNS 4.7 dakikada belirmiştir.

KE yönteminin validasyonu için ICH 2005 kriterleri dikkate alınarak kararlılık, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, duyarlılık, tutarlılık, sağlamlık ve seçicilik parametreleri incelenmiştir. KS ve KSSL'nin +4 °C'de bir ay alüminyum folyo ile

kuşatılmış kaplarda saklanması ile kararlı olduğu sonucuna varılmıştır. KSSL için $1.88 \times 10^{-6} - 9.41 \times 10^{-5}$ M ve KS için $1.91 \times 10^{-6} - 9.58 \times 10^{-5}$ M derişim aralıklarında 6 farklı çözelti ile oluşturulan kalibrasyon çözeltilerinin gün içi ve günler arası doğrusallığı için kesimi sıfıra çok yakın ve $r > 0.999$ olan eşitlikler elde edilmiştir. Kalite kontrol standartları ve tablet matriksinde yapılan doğruluk ve kesinlik incelemelerinde % 100 dolayında geri kazanım ve % 2'nin altında BSS değerleri elde edilerek geliştirilen yöntemin iyi bir doğruluk ve kesinliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Yöntemin KS ve KSSL için LOD değerleri sırasıyla 3.07×10^{-7} M ve 4.79×10^{-7} M ve LOQ değerleri sırasıyla 9.15×10^{-7} M ve 1.45×10^{-6} M olarak bulunmuştur. İki farklı analizci tarafından yapılan deneyler ile yöntemin tutarlı olduğu gösterilmiştir. Yöntemin sağlamlığının araştırılması için, pH, tampon derişimi, potansiyel ve dalga boyu parametrelerinde küçük değişiklikler yapılarak parametrelerdeki değişikliklerin, KSSL ve KS için, sonuçlarını ne yönde etkilediği incelenmiştir. Sistemde olabilecek küçük değişikliklerin yöntemi etkilemediği ve önerilen yöntemin sağlam bir yöntem olduğu gösterilmiştir. KE yönteminin sistem uygunluk testleri N, Rs, k' ve α parametrelerinin hesaplanması ile gösterilmiştir. Belirtilen değerlerin hepsi kabul edilen kriterleri sağlamaktadır (Shabir, 2003) ve böylelikle geliştirilen KE yönteminin sistem uygunluğu gösterilmiştir. Hesaplanan Rs değeri ve matriksin girişim yapmaması ile literatürde belirtildiği şekilde KE yönteminin seçiciliği ve özgünlüğü gösterilmiştir

Literatürde KE yönteminin kullanıldığı analizlerde özellikle KS'nin başarılı bir kantitatif tayinine rastlanmamıştır. Hillaert ve Van den Bossche (2002), KE ile ARA II'lerin ayırımını gerçekleştirdikleri çalışmada, KS'nin asidik ortamdaki düşük çözünürlüğü nedeniyle KS'yi kantitatif tayine uygun bulmamışlardır. Hillaert ve ark.'nın (2003), altı ARA II'nin ayırımını miselsi elektrokinetik kapiler kromatografik yöntemle gerçekleştirdikleri çalışmada KS, zayıf asidik ortamdaki yüksek çözünürlüğü nedeniyle IS olarak seçilmiştir. Zhang ve ark.'nın (2006), poli monolit kullanarak kapiler zon elektroforez yöntemi yaptıkları analizde, KS asidik ortamda % 50 (h/h) asetonitrilde çözülerek KS'nin çözünürlüğü arttırılmış ve bu nedenle çalışmada IS olarak kullanılmıştır. Dolayısı ile incelenen bu yayınlarda KS veya KSSL için KE yöntemi ile gerçekleştirilen kantitatif bir tayin söz konusu olmayıp, LOD ve LOQ ile ilgili bilgiler verilmemiştir. Bu nedenle geliştirilmiş olan bu yöntemin, başka bir kapiler elektroforetik çalışma ile duyarlılığı karşılaştırılamamıştır.

Geliştirilen yöntemin bir uygulaması 8 mg KSSL içeren ticari tabletlerde etkin madde analizi ile gösterilmiş ve analiz sonuçları USP XXIV kriterlerine uygun bulunmuştur. KSSL'in KE ile ticari tabletlerdeki tayini ilk defa bu çalışma ile gösterilmektedir. KSSL içeren ticari tabletlerdeki miktar tayininde KE yöntemi ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması için UV spektrofotometri yöntemi kullanılmıştır. UV spektrofotometrik yöntemde seçicilik parametresini de göstermek amacıyla standart ekleme tekniği kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. KSSL'nin farmasötik preparatı olan tabletlerinde miktar tayini için kullanılan UV spektrofotometri ve KE yöntemleri karşılaştırılmış ve karşılaştırılan yöntemlerin kesinlikleri arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı söylenebilir.

In vitro deneylerde CYP 2C9 substratı olan DIC tayini için de KE'de uygun ayırma koşullarına ulaşıldığı gösterilmiştir.

Belirtilen incelemelerden sonra KS, KSSL, DIC, MTP ve LNS'nin aynı anda tayinine olanak sağlayan ve KS ve KSSL için geçerliliği gösterilmiş olan ve 7.5 dk içinde analizin tamamlanmasına izin veren orijinal bir KE yönteminin geliştirilmesi bu çalışma ile sağlanmıştır.

Çalışmanın diğer bölümünde YPSK yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Optimizasyon aşamasında 6.90×10^{-6} M KS, 6.96×10^{-6} M DIC ve IS olarak 7.84×10^{-6} M MTP içeren standart bir örnek ile, floresans detektörün uyarma dalga boyunun 290 nm ve yayma dalga boyunun 360 nm'ye ayarlandığı koşullarda C₁₈ kolon kullanılarak ve pH 3.50, % 0.01 (a/h) 1-HSA içeren % 57 (h/h) metanol çözeltisi olarak belirlenen hareketli faz sistemi ile 1 mL/dk akış hızında ve izokratik elüsyonla aynı anda ayırımı gerçekleştirilmiştir. Belirtilen koşullarda KS 4.61 ± 0.03 dk, DIC 16.48 ± 0.11 dk ve MTP 2.53 ± 0.02 dk alıkonma zamanına sahiptir. Geliştirilen yöntem ile elde edilen N değerleri KS için 17400, DIC için de 40986 olarak bulunmuştur.

KS için 4.61 dk olan alıkonma zamanı değerine, IS olarak kullanılan MTP'ye, KS ve DIC'in aynı anda tayini ve 1-HSA içeren hareketli faz bileşimine daha önce yapılan çalışmalarda rastlanmamıştır. Bu bakımdan geliştirilen YPSK yöntemi orijinallik taşımaktadır.

YPSK yönteminin validasyonu için ICH 2005 kriterleri dikkate alınarak kararlılık, doğrusalık, doğruluk, kesinlik, duyarlılık, tutarlılık, sağlamlık ve seçicilik parametreleri incelenmiştir. KS ve DIC'in +4 °C'de bir ay alüminyum folyo ile kuşatılmış kaplarda saklanması ile kararlı olduğu sonucuna varılmıştır. IS olarak MTP'nin kullanıldığı yöntemin doğrusalık incelemeleri sırasında, KS için 1.14×10^{-8} – 1.46×10^{-6} M, DIC için de 3.67×10^{-7} – 3.91×10^{-5} M aralığı dikkate alınarak yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda, madde derişimleri ile pik alan oranları arasında gün içi ve günler arası koşullarda yüksek korelasyon katsayılı kalibrasyon eşitlikleri elde edildiği görülmüştür. Geliştirilen yöntemin kesinliğinin incelenmesinde gün içi ve günler arası % BSS değerlerinin % 2'den küçük olduğu bulunmuştur ve dolayısıyla yöntemin kesinliğinin yüksek düzeyde olduğu söylenebilir. Yöntemin doğruluğunun değerlendirilmesi için yapılan hesaplamalarda % BH cinsinden bulunan değerler yöntemin doğruluğunu yansıtmaktadır. YPSK ile yapılan analizlere göre yöntemin LOD ve LOQ değerleri, hem KS hem de DIC'in, MTP'ye karşı PN oranları kullanılarak hesaplandığında, DIC için LOD 2.46×10^{-7} M, LOQ 7.47×10^{-7} M ve KS için LOD 1.72×10^{-8} M, LOQ 5.22×10^{-8} M olarak bulunmuştur. İki farklı analizci tarafından yapılan YPSK deneyleri ile geliştirilen yöntemin tutarlı olduğu söylenebilir. Yöntemin sağlamlığının araştırılması için hareketli fazın pH'ı, hareketli fazdaki organik çözücü oranı ve uyarma ve yayma dalga boyu parametrelerinde küçük değişiklikler yapılarak parametrelerdeki değişikliklerin, KS ve DIC için, sonuçlarını ne yönde etkilediği incelenmiştir. Sistemde olabilecek küçük değişikliklerin yöntemi etkilemediği ve önerilen yöntemin sağlam bir yöntem olduğu gösterilmiştir. YPSK yönteminin sistem uygunluk testleri N, Rs, k' ve α parametrelerinin hesaplanması ile gösterilmiştir. Belirtilen değerlerin hepsi kabul edilen kriterleri sağlamaktadır (Shabir, 2003) ve böylelikle geliştirilen YPSK

yönteminin sistem uygunluğu gösterilmiştir. Hesaplanan Rs değeri ve matriksin girişim yapmaması ile literatürde belirtildiği şekilde YPSK yönteminin seçiciliği ve özgünlüğü gösterilmiştir

Geliştirilen YPSK yönteminin duyarlılığı literatürlerle karşılaştırıldığında KS için bulunan LOD değerinin Lee ve ark.'nın (1995) idrar örnekleri için geliştirdikleri yöntemden daha düşük olduğu görülmüştür. DIC açısından karşılaştırıldığında yöntem, Baeyens ve ark.'nın (1995) geliştirdiği yöntemle göre çok daha duyarlıdır. Geliştirilen yöntem, KS için yapılan diğer çalışmalarla (Stenhoff ve ark., 1999; González ve ark., 2002; Miyabayashi ve ark., 1996; Nie ve ark., 2005) karşılaştırıldığında daha az duyarlı olmakla birlikte KS ve DIC'in birlikte analizinin gerçekleştirilmesi açısından özgün bir yöntemdir.

Yukarıda elde edilen sonuçlarla KE ve YPSK yöntemlerinin *in vitro* ilaç etkileşimleri uygulamaları için güvenle kullanılabilmesi sonucuna varılmıştır.

Yapılan literatür araştırmalarının bir sonucu olarak *in vitro* çalışmalarda reaksiyonun başlayabilmesi için 2 mM NADPH derişimi ve en fazla % 1 (h/h) düzeyinde organik çözücü (metanol) yüzdesi kullanılması, 0.5 M TRIS ve 0.01 M EDTA çözeltilerinin karışımının HCl ile pH'ı 7.4'e ayarlanarak hazırlanan TRIS-EDTA-HCl tamponu içerisinde reaksiyonun yürütülmesi, örneklerin 37 °C'a ulaşabilmeleri için 10 dk bekletilmesi, 5, 10, 20, 30, 45 ve 60. dakikalarda örnekler toplanması ve reaksiyonun durdurulması için 200 µL örnek hacmi için 400 µL metanol kullanılması işlemlerinin optimum koşullar açısından gerekli olduğu belirlenmiştir.

Bu işlemler reaksiyonun yürütmesi için en uygun mikrozomal protein derişimi, en uygun substrat (DIC ve KS) derişimlerinin belirlenmesi amacıyla uygulanmıştır.

KE ve YPSK yöntemlerinin optimum koşullarda uygulanması ile elde edilen ve **Şekil 46-49**'da verilen elektroferogram ve kromatogramlar incelendiğinde, gerek mikrozomal protein kullanılmadan hazırlanan örneklerin, gerekse NADPH eklenmeden hazırlanan örneklerin her iki yöntemle analizinde, analizi bozacak şekilde herhangi bir girişime neden olmadıkları görülmüş ve önerilen yöntemlerin ölçümlerin duyarlı olarak yapılmasına olanak sağlayacak kadar spesifik olduğuna karar verilmiştir.

In vitro ilaç metabolizma incelenmesi çalışmalarında KS ve DIC metabolitlerinin analizi gerçekleştirilmediği için, ilaç etkileşimleri deneyleri DIC'in CYP 2C9 tarafından metabolize edilerek azalması ilkesine göre gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada reaksiyon ortamında 3.0 mg/mL mikrozomal protein derişimi ve 50 mM DIC bulunması, en uygun mikrozomal protein ve substrat derişimi olarak belirlenmiştir.

KS'nin CYP 2C9 ve DIC metabolizması üzerindeki etkisinin gözlenebilmesi için 3.0 mg/mL mikrozomal protein ve yalnız 50 mM DIC içeren örnekler ile 3.0 mg/mL mikrozomal protein, 50 mM DIC ve sırasıyla 30, 40 ve 50 mM düzeyinde KS içeren örnekler hazırlanarak DIC eğrisindeki değişim incelenmiştir. Belirtilen 3 grup örnek için KE ve YPSK yöntemleri ile elde edilen sonuçlar, yine aynı yöntemlerle analiz edilen yalnız 50 mM DIC içeren örneklerle karşılaştırılmıştır.

Her iki analiz sonucuna göre de 3.0 mg/mL mikrozomal protein içeren bir inkübasyon ortamına, 50 mM DIC eklenmesi ile elde edilen DIC'in metabolizma eğrisi; ortama 30 mM, 40 mM ve 50 mM KS eklenmesiyle değişim göstermiştir. Bu değişimlerin, DIC'in metabolizma eğrisine oranla en fazlası, 50 mM KS kullanıldığı koşulda gözlenmiştir. Her iki yöntemle de gerçekleştirilen analiz sonuçlarına göre yalnız 50 mM DIC içeren bir ortam ile bu ortama KS eklenmesi ile oluşan ortam karşılaştırıldığında, ortamda metabolize olamadan kalan % DIC miktarı artmıştır.

Geliştirilen ve *in vitro* ortamda sıçan karaciğer mikrozomları üzerinde gerçekleştirilen KS ile DIC'in etkileşimlerinin incelenmesine uygulanan KE ve YPSK yöntemlerinin, kesinliklerinden yararlanılarak istatistiksel olarak karşılaştırılabilmesi için F testi uygulanmıştır. F testi, 50 mM KS ve 50 mM DIC içeren örneklerin analiz sonuçlarının ortalamalarına uygulanmıştır. % 95 güven düzeyinde, karşılaştırılan yöntemlerin kesinlikleri arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı söylenebilir.

In vitro ortamda gerçekleştirilen deney sonuçlarına göre, KS ile DIC, *in vivo* koşullarda yeterli derişimlere ulaşırlar ise bu iki madde arasında ilaç etkileşmelerinin görülebileceği düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında, *in vitro* ilaç metabolizma incelemeleri bölümünde elde edilen sonuçların güvenilirliğinin desteklenmesi için çalışmanın bir sonraki aşamasında, çalışmaya farmakokinetik parametrelerin eklenmesi ve ilaç etkileşmeleri açısından KS'nin CYP 2C9 enzimi üzerine etkisinin standart inhibitörlerle karşılaştırarak açıklanması planlanmaktadır.

Bu tez çalışmasında, KS, KSSL, MTP, LNS ve DIC'in, KE yöntemi ile aynı anda duyarlı, doğru ve kesin analizlerinin yapılabileceği gösterilmiştir. Yöntemin uygulaması ayrıca KSSL içeren ticari tabletlerde gösterilmiştir. MTP, KS ve DIC'in, YPSK ile aynı anda duyarlı, doğru ve kesin analizlerinin yapılabileceği gösterilmiştir. Geliştirilen KE yöntemi YPSK'ye göre zaman ve maliyet açısından üstünlük taşımaktadır. YPSK yöntemi ise duyarlılık bakımından KE yöntemine yaklaşık on misli üstünlük sağlamaktadır.

Bu tez çalışması ile önerilen KE yönteminin, günümüzde ilaç etkileşmeleri üzerine çalışan laboratuarlarda kendine geniş bir uygulama alanı bulabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Albers, S., Elshoff, J.-P., Völker, C., Richter, A., Läer, S., HPLC quantification of metoprolol with solid-phase extraction for the drug monitoring of pediatric patients, *Biomed. Chromatogr.*, 19, 202-207 (2005).

Baeyens, W.R.G., Van Den Weken, G., Schelkens, M., Diclofenac and naproxen analysis by microbore liquid chromatography (LC) with native fluorescence detection, *J. Fluoresc.*, 5(2), 131-134 (1995).

Baker, D.R., *Capillary Electrophoresis*, Wiley-Interscience A John Wiley&Sons, Inc. Publication, New Jersey, 1-51, 1995.

Bort, R., Macé, K., Boobis, A., Gómez-Lechón, M.-J., Pfeifer, A., Castell, J., Hepatic metabolism of diclofenac: role of human CYP in the minor oxidative pathways, *Biochem. Pharmacol.*, 58, 787-796 (1999).

Cagigal, E., González, L., Alonso, R.M., Jiménez, R.M., pKa determination of angiotensin II receptor antagonists (ARA II) by spectrofluorimetry, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 26, 477-486 (2001).

Chauret, N., Gauthier, A., Nicoll-Griffith, D.A., Effect of common organic solvents on *in vitro* cytochrome P450-mediated metabolic activities in human liver microsomes, *Drug. Metab. Dispos.*, 26 (1), 1-4 (1998).

Easthope, S.E., Jarvis, B., Candesertan cilexetil, an update of its use in essential hypertension, *Drugs*, 62 (8), 1253-1287 (2002).

Erdik, E., *Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler*, Gazi Kitabevi, Ankara, 82-166, 2005.

Ergenç, N., Gürsoy, A., Ateş, Ö., *İlaçların Tanınması ve Kantitatif Tayini*, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul, 228-284, 1989.

Erk, N., Application of first derivative UV-spectrophotometry and ratio derivative spectrophotometry for the simultaneous determination of candesartan cilexetil and hydrochlorothiazide, *Pharmazie*, 58 (11), 796-800 (2003b).

Erk, N., Simultaneous analysis of candesartan cilexetil and hydrochlorothiazide in human plasma and dosage forms using HPLC with a photodiode array detector, *J. Liq. Chromatogr. & R. T.*, 26 (14), 2581-2591 (2003a).

Gavras, H., Update on the clinical pharmacology of candesartan cilexetil, *Am. J. Hypertens*, 13 (1), 25-30 (2000).

Gleiter, C.H., Mörike, K.E., Clinical pharmacokinetics of candesartan, *Clin. Pharmacokinet.*, 41 (1), 7-17 (2002).

González, L., López, J.A., Alonso, R.M., Jiménez, R.M., Fast screening method for the determination of angiotensin II receptor antagonists in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection, *J. Chromatogr. A.*, 949, 49-60 (2002).

Gündüz, T., Kimyacılar İçin İstatistik, Gazi Büro Kitabevi Tic. Ltd. Şti., Ankara, 39-43, 1998.

Hillaert, S., De Beer, T.R.M., De Beer, J.O., W. Van den Bossche, Optimization and validation of a micellar electrokinetic chromatographic method for the analysis of several angiotensin-II-receptor antagonists, *J. Chromatogr. A.*, 984, 135-146 (2003).

Hillaert, S., W. Van den Bossche, Optimization and validation of a capillary zone electrophoretic method for the analysis of several angiotensin-II-receptor antagonists, *J. Chromatogr. A.*, 979, 323-333 (2002).

Hoogkamer, J.F.W., Kleinbloesem, C.K., Ouwerkerk, M., Högemann, A., Nokhodian, A., Kirch, W., Weidekamm, E., Pharmacokinetics and safety of candesartan cilexetil in subjects with normal and impaired liver function, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 54, 341-345 (1998).

Hook, G.E., Bend, J.R., Hoel, D., Fouts, J.R., Gram, T.E., Preparation of lung microsomes and a comparison of the distribution of enzymes between subcellular fractions of rabbit lung and liver, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 182 (3), 474-490 (1972).

http-1 Huangyan Tianyu Chemical Factory – Candesartan cilexetil – EC Plaza,
<http://tianyuchem.en.ecplaza.net/3.asp> (30.12.08)

http-2 Candesartan cilexetil, <http://chemicaland21.com/lifescience/UH/CANDESARTAN%20CILEXETIL.htm> (28.08.08)

http-3 CAS No.139481-59-7, Candesartan Suppliers, <http://www.lookchem.com/cas-139/139481-59-7.html> (30.12.08)

http-4 Compositions and methods for improved delivery of hydrophobic agents, http://www.pharcast.com/Patents/Yr2002/September2002/091702/6451339_Hydrophobic091702.htm (04.09.08)

http-5 Metoprolol succinate – Patent 5081154, <http://www.freepatentsonline.com/5081154.html> (30.12.08)

http-6 Toprol-XL™ Product Information, <http://www.pbs.gov.au/pi/apptopro10205.pdf> (30.12.08)

http-7 Metoprolol tartrate, <http://chemicaland21.com/lifescience/phar/METOPROLOL%20TARTRATE.htm> (28.08.08)

http-8 Toprol-XL (Metoprolol Succinate) drug description <http://www.rxlist.com/cgi/generic/metopxl.htm> (28.08.08)

http-9 DrugBank: Showing Lansoprazole (DB00448), <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00448> (30.12.08)

http-10 Prevacid (Lansoprazole) drug description <http://www.rxlist.com/cgi/generic/lansop.htm> (28.08.08)

http-11 Diclofenac, <http://chemicaland21.com/lifescience/phar/DICLOFENAC.htm> (28.08.08)

http-12 Solaraze (Diclofenac Sodium) drug description <http://www.rxlist.com/cgi/generic/solaraze.htm> (28.08.08)

http-13 Biyotransformasyon, <http://pharm.ege.edu.tr/pp/metinertosun/biyotransformasyon.pdf> (30.12.08)

http-14 Human Recombinant Cytochrome P450 2C9,
http://www.celsis.be/filelib/ps_invitrosomes2C9.pdf (30.01.09)

ICH Topic Q2(R1), Validation of analytical procedures: Text and methodology, Step 4 version (Complementary Guideline on Methodology dated 6 November 1996 incorporated in November 2005), November 2005.

Jin, W., Zhang, J., Determination of diclofenac sodium by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection, *J. Chromatogr. A.*, 868, 101-107 (2000).

Kayaalp, S.O., Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Hacettepe T.A.Ş. Kitapçılık Ltd. Şti., Ankara, 111-111, 2000.

Kayaalp, S.O., Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Hacettepe T.A.Ş. Kitapçılık Ltd. Şti., Ankara, 42-49, 2005.

Kim, K.H., Kim, H.J., Kang, J.-S., Mar, W., Determination of metoprolol enantiomers in human urine by coupled achiral-chiral chromatography, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 22, 377-384 (2000).

Konečný, J., Juřica, J., Tomandl, J., Glatz, Z., Study of recombinant cytochrome P450 2C9 activity with diclofenac by MEKC, *Electrophoresis*, 28, 1229-1234 (2007).

Kumar, S., Samuel, K., Subramanian, R., Braun, M.P., Stearns, R.A., Lee Chiu, S.-H., Evans, D.C., Baillie, T.A., Extrapolation of diclofenac clearance from in vitro microsomal metabolism data: role of acyl glucuronidation and sequential oxidative metabolism of the acyl glucuronide, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 303 (3), 969- 978 (2002).

Kumar, V., Wahlstrom, J.L., Rock, D.A., Warren, C.J., Gorman, L.A., Tracy, T.S., CYP2C9 inhibition: impact of probe selection and pharmacogenetics on in vitro inhibition profiles, *Drug. Metab. Dispos.*, 34, 1966-1975 (2006).

Lee, J. W., Naidong, W., Johnson, T., Dzerk, A., Miyabayashi, T., Motohashi, M., Development and validation of column-switching high-performance liquid chromatographic methods for the determination of a potent AII receptor antagonist, TCV-116, and its metabolites in human serum and urine, *J. Chromatogr. B.*, 670, 287-298 (1995).

Leucuta, A., Vlase, L., Farcău, D., Nanulescu, M., No effect of short term ranitidine intake on diclofenac pharmacokinetics, *Rom. J. Gastroenterol.* 13 (4), 305-308 (2004).

Lewis, J.A., Tata, J.R., A rapidly sedimenting fraction of rat liver endoplasmic reticulum, *J. Cell. Sci.*, 13, 447-459 (1973).

Lindsay, S., High Performance Liquid Chromatography, *Analytical Chemistry by Open Learning*, John Wiley & Sons, İngiltere, 43-60, 1992.

Miyabayashi, T., Okuda, T., Motohashi, M., Izawa, K., Yashiki, T., Quantitation of a new potent angiotensin II receptor antagonist, TCV-116, and its metabolites in human serum and urine, *J. Chromatogr. B.*, 677, 123-132 (1996).

Nie, J., Zhang, M., Fan, Y., Wen, Y., Xiang, B., Feng, Y.-O., Biocompatible in-tube solid-phase microextraction coupled to HPLC for the determination of angiotensin II receptor antagonists in human plasma and urine, *J. Chromatogr. B.*, 828, 62-69 (2005).

Oparil, S., Newly emerging pharmacologic differences in angiotensin II receptor blockers, *Am. J. Hypertens.* 13 (1), 18-24 (2000).

Özaltın, N., Determination of lansoprazole in pharmaceutical dosage forms by two different spectroscopic methods, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 20, 599-606 (1999).

Prost, F., Thormann, W., Capillary electrophoresis to assess drug metabolism induced in vitro using single CYP450 enzymes (Supersomes™): Application to the chiral metabolism of mephentyoin and methadone, *Electrophoresis*, 24, 2577-2587 (2003).

Saunders, D.L., *Chromatography*, 3rd ed., Heftmann, E. (Ed), Van Nostrand Reinhold Co., New York, 81, 1975.

Shabir, G.A., Validation of high performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis, understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization, *J. Chromatogr. A.*, 987, 57-66 (2003).

Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Çeviri Ed: Kılıç, E., Köseğlü, F., Fundamentals of Analytical Chemistry, Bilim Yayıncılık, Ankara, 660-717, 1999.

Song, J.C., White, C.M., Pharmacologic, pharmacokinetic, and therapeutic differences among angiotensin II receptor antagonists, *Pharmacotherapy*, 20 (2), 130-139 (2000).

Stenhoff, H., Lagerström P.-O., Andersen, C., Determination of candesartan cilexetil, candesartan and a metabolite in human plasma and urine by liquid chromatography and fluorometric detection, *J. Chromatogr. B.*, 731, 411-417 (1999).

Subba Rao, D.V., Radhakrishnanand, P., Suryanarayana, M.V., Himabindu, V., A stability-indicating LC method for candesartan cilexetil, *Chromatographia*, 66 (7-8), 499-507 (2007).

Taavitsainen, P., Cytochrome P450 Isoform-Specific *In Vitro* Methods To Predict Drug Metabolism and Interactions, Doktora Tezi, Oulu Üniversitesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Bölümü, Oulu, Finlandiya (2001).

Taavitsainen, P., Kiukaanniemi, K., Pelkonen, O., In vitro inhibition screening of human hepatic P_{450} enzymes by five angiotensin-II receptor antagonists, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 56, 135-140 (2000).

Tang, C., Shou, M., Rodrigues, A.D., Substrate-dependent effect of acetonitrile on human liver microsomal cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) activity, *Drug. Metab. Dispos.*, 28 (5), 567-572 (2000).

Tata, J.R., Preparation and properties of microsomal and sub-microsomal fraction from animal cells, In: *Subcellular Components; Preparation and Fractionation*, G.D. Birnie (Ed), Londra, 185-213, 1972.

The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals Merck&Co., Inc., New Jersey, 3071, 6076, 1989.

The United States Pharmacopeia (USP) XXIV, Marck Printing Co., Easton, 546, 1101, 2231, 2232, 2000.

Yamazaki, H., Inoue, K., Turvy, C.G., Guengerich, F.P., Shimada, T., Effects of freezing, thawing, and storage of human liver samples on the microsomal contents and activities of cytochrome P450 enzymes, *Drug. Metab. Dispos.*, 25 (2), 168-174 (1997).

Yeniceli, D., Doğrukol-Ak, D., Tunçel, M., Determination of lansoprazole in pharmaceutical capsules by flow injection analysis using UV-detection, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 36, 145-148 (2004).

Zhang, M., Wei, F., Zhang, Y.-F., Nie, J., Feng, Y.-O., Novel polymer monolith microextraction using a poly (methacrylic acid-ethylene glycol dimethacrylate) monolith and its application to simultaneous analysis of several angiotensin II receptor antagonists in human urine by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A.*, 1102, 294-301 (2006).

Zhang, Z.-Y., Kaminsky, L.S., Determination of metabolic rates and enzyme kinetics, In: *Drug Metabolism in Drug Design and Development*, D. Zhang, M. Zhu, W.G. Humphreys (Eds), Wiley-Interscience A John Wiley&Sons, Inc., Publication, New Jersey, 413-447 (2008).

Zinellu, A., Carru, C., Sotgia, S., Porqueddu, E., Enrico, P., Deiana, L., Separation of aceclofenac and diclofenac in human plasma by free zone capillary electrophoresis using *N*-methyl-D-glucamine as an effective electrolyte additive, *Eur. J. Pharmaceut. Sci.*, 24, 375-380 (2005).

EK - 1

İstatistiksel Hesaplamalar

İstatistiksel Katsayılar

$$SS = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n X_i - \bar{X}}{n-1}}$$

$$\% BSS = \frac{SS}{\bar{X}} \times 100$$

$$\% BH = \frac{\text{Olması gereken miktar} - \text{Bulunan miktar}}{\text{Olması gereken miktar}} \times 100$$

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

$$SH = \frac{SS}{\sqrt{n}}$$

Korelasyon Katsayısının Önem Kontrolü

$$t = \frac{r}{S_r}$$

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

H_0 : r tesadüfe bağlı bir değerdir.

Kullanılan serbestlik derecesinde ve seçilen yanılma olasılığı ile t değeri hesaplanır. Bu değer tablodan bulunan t değeri ile karşılaştırılır. $t_{\text{hesap}} > t_{\text{tablo}}$ ise H_0 reddedilir. Bu durumda r'nin, önemli bir değer olduğuna ve tesadüfen bulunmadığına karar verilir.

Doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü

Kareler Toplamı

a) Regresyon kareler toplamı (RKT)

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

b) Y ortalamadan ayrılış kareler toplamı (YOAKT)

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

c) Regresyondan ayrılış kareler toplamı (RAKT)

$$\text{RAKT} = \text{YOAKT} - \text{RKT}$$

Serbestlik Dereceleri

Regresyon serbestlik derecesi (RSD) :1

Y ortalamadan ayrılış serbestlik derecesi (YOASD) : n-1

Regresyondan ayrılış serbestlik derecesi (RASD) : YOASD – RSD = n-2

Kareler Ortalamaları

a) Regresyon kareler ortalaması (RKO) = RKT / RSD

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

$$F_{\text{hesap}} = \text{RKO} / \text{RAKO}$$

H₀: Derişim ile detektör yanıtı arasındaki ilişki doğrusal değildir.

Kullanılan serbestlik derecesinde ve seçilen yanılma olasılığı F değeri hesaplanır. Bu değer tablodan bulunan F değeri ile karşılaştırılır. $F_{\text{hesap}} > F_{\text{tablo}}$ ise H₀ reddedilir. Bu durumda derişim ile detektör yanıtı arasındaki ilişkinin doğrusal olduğuna karar verilir.

Friedman Analizi

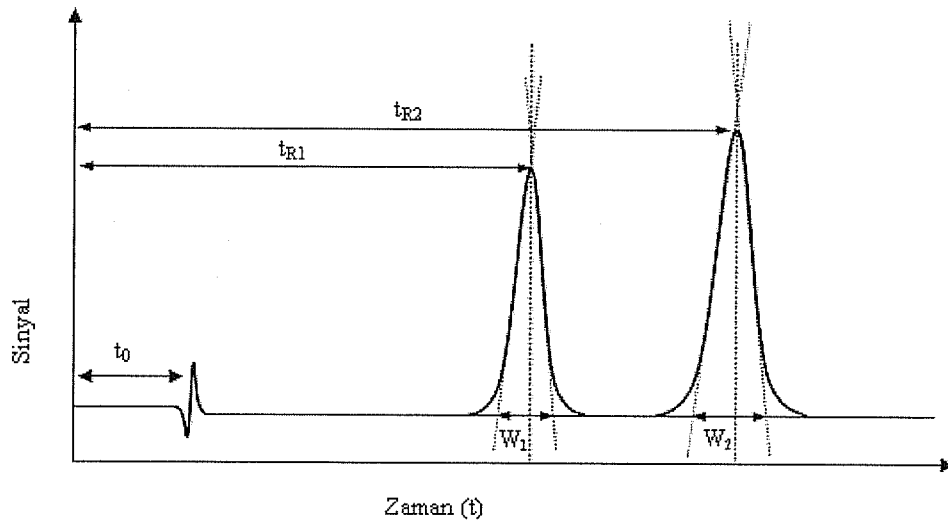
Üç ya da daha fazla eşli grubun karşılaştırılmasında kullanılan bir testtir.

H₀: İki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında fark yoktur.

0.05 yanılma düzeyi için $P_{\text{hesap}} > 0.05$ ise iki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında fark olmadığına karar verilir.

Hesaplamalar GraphPad Prism 4 for Windows programı ile yapılmıştır.

Sistem Uygunluk Testleri



Teorik Tabaka Sayısı

Kolondan çıkan pikin sivri ve dar olması ve pikleri birbirinden iyi ayrılmasının göstergesidir.

$$N = 16 \left[\frac{t_r}{w} \right]^2$$

Ayırım Gücü

Kolonun ayırım gücünü ifade eder.

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2}$$

Seçicilik Faktörü

Bağıl alıkonmayı ifade eder.

$$\alpha = \frac{t_{r2} - t_{r0}}{t_{r1} - t_{r0}}$$

Kapasite Faktörü

Kolonun performansı ve alıkonmanın uzun süreli tekrarlanabilirliğini ifade eder.

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

