



**BOSENTAN ETKİN MADDESİNİN FARMASÖTİK
PREPARATLARDA ANALİTİK YÖNTEMLERLE
MİKTAR TAYİNİ**

Didar TÜRKAN

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Alptuğ ATİLA

Yüksek Lisans Tezi - 2015

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

**BOSENTAN ETKİN MADDESİNİN FARMASÖTİK
PREPARATLARDA ANALİTİK YÖNTEMLERLE
MİKTAR TAYİNİ**

Didar TÜRKAN

**Analitik Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Alptuğ ATİLA**

**ERZURUM
2015**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

**BOSENTAN ETKİN MADDESİNİN FARMASÖTİK
PREPARATLARDA ANALİTİK YÖNTEMLERLE MİKTAR
TAYİNİ**

Didar TÜRKAN

Tez Savunma Tarihi : 31/12/2015

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Alptuğ Atıla

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Yücel Kadioğlu

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Sümeyra Tuna Yıldırım

Onay

Bu çalışma Yukarıdaki Jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak Kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM
Enstitü Müdürü

Yüksek Lisans Tezi
Erzurum- 2015

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	V
ÖZET	VI
ABSTRACT.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLOLAR DİZİNİ.....	XI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Endotelinler.....	3
2.1.1. Endotelin Reseptörleri	3
2.1.2. Endotelin Reseptör Antagonistleri.....	4
2.1.3. Bosentan.....	4
2.1.4. Bosentanın Kimyasal Yapısı.....	5
2.1.5. Bosentan ile Gerçekleştirilen Çalışmalar.....	5
2.2. Spektroskopik Yöntemler	9
2.2.1. Elektromanyetik Işıma.....	10
2.2.1.1. Elektromanyetik Spektrum	11
2.2.1.2. Işın - Madde Etkileşmesi	12
2.2.1.3. Işının Absorpsiyonu.....	14
2.2.2. UV Görünür Bölge Spektroskopisi.....	15
2.2.2.1. UV ve Görünür Bölgede Absorpsiyon.....	15
2.2.2.2. Absorplayan Türler	16
2.2.2.3. Geçirgenlik (Transmittans) ve Soğurulma (Absorbans) Arasındaki İlişki	17
2.2.3. Lambert-Beer Kanunundan Sapmalar	19

2.2.4. Cihaz	20
2.2.4.1. Tek-Işınlı Cihazlar	20
2.2.4.2. Çift-Işınlı Cihazlar	20
2.2.5. UV-Görünür Bölge Spektrofotometre Cihazının Kullanım Amaçları.....	21
2.2.5.1. Absorpsiyon Ölçümlerinin Kalitatif Analize Uygulanması.....	21
2.2.5.2. Absorpsiyon Ölçümlerinin Kantitatif Analize Uygulanması.....	21
2.3. Türev Spektrofotometrisi Yöntemi	22
2.3.1. Türev Spektrumlarının Değerlendirilmesi	23
2.3.2. Türev Spektroskopisinin Avantajları ve Dezavantajları	25
2.3.3. Türev Spektroskopisi Yönteminin Uygulamaları	26
2.4. Kromatografik Yöntemler.....	26
2.4.1. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması.....	27
2.4.2. Kromatografide Temel Olan Fiziksel ve Kimyasal Olaylar	28
2.4.2.1. Dağılma Kromatografisi	29
2.4.2.2. Adsorpsiyon Kromatografisi.....	30
2.4.2.3. İyon Değişirme Kromatografisi	30
2.4.2.4. Jel Filtrasyon Kromatografisi	30
2.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	31
2.5.1. Normal ve Ters Faz Dolguları	32
2.5.2. Sıvı Kromatografi Cihazları.....	33
2.5.3. Kromatografide Temel Kavramlar.....	34
2.5.4. Kolon Dolgu Maddelerinin Tipleri	36
2.5.5. Dedektörler	37
2.6. Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon.....	38
2.6.1. Doğruluk	38

2.6.2. Kesinlik.....	39
2.6.3. Sağlamlık	39
2.6.4. Doğrusallık/Ölçüm Aralığı	39
2.6.5. Seçicilik ve Duyarlılık	40
2.6.6. Teşhis Sınırı, Gözlenebilirlik Sınırı (LOD)	40
2.6.7. Tayin Sınırı (LOQ)	41
2.6.8. Ölçüm Belirsizliği.....	41
3. MATERYAL VE METOT.....	42
3.1. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler	42
3.2. Kullanılan Cihazlar	42
3.3. Yöntemler	43
3.3.1. Spektrofotometrik Yöntem Şartları	43
3.3.2 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yöntem Şartları.....	43
3.3.3. HPLC Yöntem Geçerlilik Testleri	44
3.3.3.1. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı	44
3.3.3.2. Doğruluk/Kesinlik ve Geri Kazanım	44
3.3.3.3. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ)	44
3.4. Tabletlerin Hazırlanması.....	45
4. BULGULAR.....	46
4.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri Yöntemi	46
4.1.1. Standart ve Kalite Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması.....	46
4.1.2. Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu).....	46
4.1.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi.....	46
4.1.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ)	47
4.1.2.3. Doğruluk, Kesinlik.....	48

4.1.2.4. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması.....	48
4.1.2.5. Analitik Geri Kazanım.....	49
4.2. Birinci Türev Spektrofotometri Yöntemi	50
4.2.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	50
4.2.2. Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu).....	51
4.2.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi.....	51
4.2.2.3. Doğruluk, Kesinlik.....	52
4.2.2.4. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması.....	53
4.2.2.5. Analitik Geri Kazanım.....	53
4.3. HPLC Yöntemi	54
4.3.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yöntemi Geliştirme	54
4.3.1.1. Standart ve Kalite Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması.....	54
4.3.2. HPLC Yönteminin Geçerlilik Testleri.....	55
4.3.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi.....	55
4.3.2.2. Doğruluk/Kesinlik	56
4.3.2.3. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt sınırı (LOQ).....	57
4.3.2.4. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması.....	57
4.3.2.5. Analitik Geri Kazanım.....	57
5. TARTIŞMA.....	58
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	62
KAYNAKLAR	63
EKLER	69
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	69
EK-2. ETİK KURUL ONAYI.....	70

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimin her aşamasında tüm bilgi ve birikimini cömertçe benimle paylaşan ve her daim yardımını esirgemeyen Sayın Hocam Yrd. Doç. Dr. Alptuğ ATİLA'ya ve değerli hocam Sayın Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU'na, en derin saygı ve şükranlarımı sunarım. Ayrıca, bosentanın HPLC yöntemi analizi için yapılan çalışmalara yardımcı olan Arş. Gör. Emrah YAMAN'a çok teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen sevgili aileme ve tezimin hazırlanmasına yardım eden sevgili ablam Uzm. Dr. Yasemin OĞUL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Didar TÜRKAN

ÖZET

Bosentan Etkin Maddesinin Farmasötik Preparatlarda Analitik Yöntemlerle Miktar Tayini

Amaç: Bu çalışmada, bosentanın standart çalışma çözeltilerinde ve tabletlerde miktar tayini için UV-Görünür Bölge Spektrofotometri, Birinci Türev Spektrofotometri ve HPLC yöntemlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Spektrofotometrik ölçümler Thermospectronic çift ışınlı UV-Görünür Bölge spektrofotometresi ile ölçüldü. UV-Görünür Bölge spektrumlar, ışının madde üzerine gönderilmesiyle elde edilen absorbans değerlerinin ışının dalga boyuna karşı grafiğe geçirilmesiyle 271 nm dalga boyunda elde edildi. Birinci Türev Spektrofotometrisi çalışmalarında 285 nm dalga boyunda spektrumlar elde edildi. HPLC yönteminde, hareketli faz olarak metanol-asetonitril-su (20:50:30 v/v/v) çözücü karışımları kullanıldı. Bu çalışmada en iyi ayırım sabit faz olarak kullanılan ters faz C₁₈ (250x4.6 mm,5µm) kolonda elde edildi.

Bulgular: UV-Görünür Bölge Spektrofotometri ve Birinci Türev Spektrofotometri yöntemlerinin sırasıyla 10-35 µg ml⁻¹ ve 3-25 µg ml⁻¹, HPLC yönteminin ise 0.25-20 µg ml⁻¹ derişim aralığında doğrusal olduğu belirlenmiştir. Bosentanın kantitatif analizinde her üç yöntem için gün-içi ve günler arası kesinlik değeri % 2.60' dan küçük ve doğruluk değeri % 2.67' den küçük olarak bulunmuştur.

Sonuç: Her üç yöntemle gerçekleştirilen çalışmalarda bosentan etkin maddesinin ticari preparatlarda miktar tayini başarılı bir şekilde yapıldı ve bu yöntemler geliştirilip geçerlilik testleri yapıldı.

Anahtar Kelimeler: Bosentan, birinci türev spektrofotometri yöntemi, HPLC yöntemi, UV-Görünür bölge spektrofotometri yöntemi, ticari preparat.

ABSTRACT

Quantification of Effective Substance of Bosentan with Analytical Methods in the Pharmaceutical Preparations

Aim: In this study, it's aimed to develop and validate first derivative spectrophotometry, the UV –Visible spectrophotometry and the HPLC method for bosentan standards and pharmaceutical preparations.

Material and Method: Spectrophotometric determinations were performed by Thermospectronic double-beamed UV-Visible spectroscopy. UV-Visible spectrum is measured at 271nm spectral bandwidth. First-order derivative spectrum is measured at 285 nm spectral bandwidth. In HPLC, methanol-acetonitrile-water (20:50:30 v/v/v) solvent mixture is used as mobile phase. In this study, the reverse phase C₁₈(250X4,6 mm,5µm) colon used as stationary immobile phase is the best.

Results: Calibration curves of UV-Visible spectrophotometry and first-order derivative spectrophotometry methods were linear between the concentration range of respectively 10-35µg ml⁻¹ and 3-25 µg ml⁻¹, while the concentration range was between 0.25-20 µg ml⁻¹ in HPLC. For all methods, intra- and inter-day relative standard deviation values were ≤ 2.60 % and for all concentrations of bosentan the relative errors were ≤ 2.67 %.

Conclusion: These three methods were successfully applied onto pharmaceutical preparations containing the active ingredient bosentan and validated.

Key Words: Bosentan, first-order spectrophotometry method, HPLC method, pharmaceutical preparations, UV-Visible spectrophotometry method.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BH	: Bağlı hata
BSS	: Bağlı standart sapma
BST	: Bosentan
ET	: Endotelin reseptörü
ET-1	: Endotelin-1
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
LC-MS/MS	: Sıvı kromatografi/tandem kütle spektrometresini
LOD	: Gözlenebilme (teşhis) sınırı
LOQ	: Miktar tayin alt sınırı
µg	: Mikro gram
µl	: Mikro litre
Nm	: Nanometre
PAH	: Pulmoner arteriyel hipertansiyon
UV	: Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Bosentanın kimyasal yapısı	5
Şekil 2.2. Elektromanyetik Spektrum.....	11
Şekil 2.3. Elektromanyetik dalga.....	13
Şekil 2.4. Absorplayan bir çözeltiye giren I_0 şiddetindeki ışın demetinin I şiddetine düşmüş olarak çıkması.....	17
Şekil 2.5. Absorbans ve türev spektrumlar.....	23
Şekil 2.6. Farklı derecede türev spektrumlar.....	25
Şekil 2.7. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazının şematik görünüşü.....	34
Şekil 4.1. UV-Görünür bölge spektrofotometrik çalışmasında bosentanın 10, 15, 20, 25, 30 ve 35 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişimlerdeki çözeltilerinin absorbsiyon spektrumu.....	46
Şekil 4.2. UV-Görünür bölge spektrofotometri yöntemle elde edilen kalibrasyon eğrisi.....	47
Şekil 4.3. UV-Görünür bölge spektrofotometrik çalışmalarda Tracleer farmasötik preparatın absorbsiyon spektrumu	49
Şekil 4.4. Birinci türev spektrofotometrik çalışmasında bosentanın 3-25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişim aralığındaki çözeltilerinin absorbsiyon spektrumu	50
Şekil 4.5. Birinci türev spektrofotometresi yönteminde elde edilen kalibrasyon eğrisi.....	51
Şekil 4.6. Birinci türev spektrofotometresi çalışmasında bosentan içeren Tracleer tabletinin 6, 14 ve 24 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişimlerdeki çözeltilerinin absorbsiyon spektrumu	53

Şekil 4.7. Bosentanın 0.25-20 µg ml⁻¹ derişim aralığındaki kromatogramı 55

Şekil 4.8. HPLC yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisi..... 55



TABLULAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Bazı ölçüm cihazlarının özellikleri.....	10
Tablo 2.2. UV, görünür ve kısa IR spektrumun karakteristikleri.....	12
Tablo 3.1. Bosentan için HPLC-UV çalışmasında uygulanan yöntem şartları.....	43
Tablo 4.1. Bosentana ait kalibrasyon eğrisi ile ilgili bilgiler	47
Tablo 4.2. UV-Görünür bölge spektrofotometrisi çalışmalarında gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk değerleri.....	48
Tablo 4.3. Farmasötik preparatların analitik geri kazanım değerleri	50
Tablo 4.4. Bosentana ait birinci türev kalibrasyon eğrisi ile ilgili bilgiler	51
Tablo 4.5. Birinci türev spektrofotometresi çalışmalarında bosentanın gün-içi ve günler-arası kesinlik ve doğruluk değerleri	52
Tablo 4.6. Birinci türev spektrofotometresi çalışmalarında farmasötik preparattan elde edilen analitik geri kazanım değerleri	54
Tablo 4.7. Bosentanın kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri	56
Tablo 4.8. HPLC çalışmalarında bosentanın gün-içi ve günler-arası kesinlik ve doğruluk değerleri.....	56
Tablo 4.9. Bosentanın (Tracleer 125 mg ve Diamond 125 mg) iki tablet formunun analitik geri kazanım değerleri	57

1. GİRİŞ

Endotelinler, 21 aminoasitten oluşan vazokonstriktör peptidlerdir. Endotelyumdan eksprese edilen endotelinlerin güçlü birer vazokonstrüktör olduğunun keşfi ile bu moleküller üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Damarların homeostazının (iç denge) düzenlenmesinde anahtar rol oynarlar. Kalp, beyin ve genel kan dolaşımı dahil olmak üzere birçok organ ve sistemin hastalığında etkendirler.

Endotelinlerin, salgılanma yerlerine göre değişen, Endotelin-1, Endotelin-2 ve Endotelin-3 olarak adlandırılan 3 izoformu ve ET_A ve ET_B olmak üzere iki tip reseptörü vardır. Nörohormon endotelin-1 (ET-1), bilinen en etkili vazokonstriktörlerden biridir. Fibrosis, hücre üremesi, kalp hipertrofisini ilerletir ve proinflamatuardır. Bu etkiler ET-1'in endotelyum ve vasküler düz kas hücreleri içerisinde bulunan ET_A ve ET_B reseptörlerine bağlanması ile oluşur.¹

ET-1 esansiyel hipertansiyon, kalp yetmezliği, iskemik kardiyak disfonksiyon, pulmoner hipertansiyon, akut ve kronik böbrek yetmezliği, preeklamsi, diyabet, allograft reddi, sistemik sklerozis, sistemik lupus eritematozus, kardiyojenik şok gibi durumlarda düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. Bu tespitler, endotelin sentezinin engellenmesinin ya da reseptörlerinin bloke edilmesinin, tedavide önemli olabileceğini düşündürmüştür ve endotelin reseptör antagonistleri geliştirilmiştir.²

Bosentan, ilk olarak sentezlenen, ET_A ve ET_B reseptörleri için seçici olmayan antagonistlerdendir ve 2001'de onay alan ilk ET reseptör antagonistidir. Her iki reseptör için hemen hemen eşit bir afinite gösterir. ET_A/ET_B afinite oranı yaklaşık 40/1'dir.³ Bosentan, 2005'ten beri Türkiye'de pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH) tedavisinde kullanılmaktadır.

Bosentan, yeni nesil ilaçlardan olup birçok hastalığın tedavisi için umut vaat ettiğinden son yıllarda üzerine çalışmalar artmaktadır. Bosentanın ticari preparatlarda miktar tayinine yönelik sınırlı sayıda çalışmaya ulaşılabilmektedir.

Bu çalışmada, bosentan etkin maddesinin standart çalışma çözeltilerinde ve tabletlerde miktar tayini için UV- Görünür Bölge Spektrofotometri, Birinci Derece Türev Spektrofotometri yöntemi ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemleri geliştirilip geçerlilik testlerinin yapılması ve bu yöntemlerin ticari preparatlarda kalite kontrol amaçlı olarak kullanılabilmesi amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Endotelinler

Endotel; fizyolojik ve patolojik olaylarda çok önemli düzenleyici rolü olan, mezoderm kaynaklı, tek katlı yassı epitel dokudur ve vücudumuzun en büyük organıdır.⁴ Vasküler endotel hücreleri endotelinler gibi önemli vazodilatör (damar genişleten) ve konstriktör (damar büzücü) maddeler üretirler.^{2,5} Endotelinler ilk olarak 1988 yılında Yanagisawa ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır.⁶ Endotelinler 21 aminoasitten oluşan polipeptidlerdir^{7,8} ve yapı olarak bir yılan zehiri olan sarafotoksinlere benzerler.⁹ Farklı üç gen ile kodlanan 3 endotelin (ET) izoformu vardır; bunlar ET-1, ET-2 ve ET-3 olarak adlandırılırlar.¹⁰ Güçlü bir vazokonstriktör ajan olan ET-1 ilk kez domuz aortası endotel hücresinden elde edilmiştir.^{6,11} ET-1, pulmoner damarların düz kas hücrelerinde vazokonstriktör ve mitojen etkiler oluşturur.⁶ ET-1, endotel hücresinden başka beyin, böbrek ve akciğerde, ET-2 ve ET-3 beyin, böbrek, böbreküstü bezi ve bağırsakta sentezlenir. ET-3, sinir dokusunda yoğun olduğundan dolayı, endotelinlerin nöral formu da denir.¹² ET-1'in öncü proteini 203 aminoasitten oluşan preproendotelin-1'dir. Bu bileşik insanda 38, domuzda 39 aminoasitten oluşan proendotelin ya da big endotelin'e çevrilir. Proendotelinden, nötral bir metalloproteaz olan endotelinkonverting enzim ile ET-1 oluşur.¹³ Endotelin 1'in pulmoner hipertansiyonda patojenik bir rolü olduğu gösterilmiştir.¹⁴

2.1.1. Endotelin Reseptörleri

İki farklı endotelin reseptörü vardır: ET_A ve ET_B. Her iki reseptör de, çeşitli hücre tiplerinde bulunurlarsa da, ilk olarak akciğerlerde tanımlanmışlardır.¹⁵ ET_A ve ET_B reseptörleri arasındaki fark karboksil ucundadır.¹⁶ Endotelin-A reseptörü, ET-1 ve ET-2'ye yüksek bir afinite gösterirken, ET-3 ise zayıf bir afinite gösterir. ET_B üç izoforma da eşit güçte etki yapmaktadır. ET_A düz kas hücrelerinde mevcuttur ve

vazokonstriksiyona aracılık eder. ET_B ise endotelyumda bulunur ve nitrik oksit ve prostasiklin salınımına aracılık eder. Fakat birçok rapor göstermiştir ki ET_B bazı vasküler düz kas hücrelerinde vazokonstrüksiyona aracılık edebilir.¹⁷

2.1.2. Endotelin Reseptör Antagonistleri

Endotelinlerin çeşitli vücut sistemleri üzerine olan önemli etkilerinin anlaşılmasına başlaması ile bunların istenmeyen etkilerini ortadan kaldıracak reseptör antagonistleri üzerinde çalışılmaya başlanmıştır. Bu amaçla, son yıllarda değişik kompetitif ET reseptör antagonistleri tanımlanmıştır. Bu antagonistlerin çoğu ET_A reseptörünün spesifik antagonistidir. ET-1'in yol açtığı kasılmayı önlerler. Ancak endotelinlerin damar kasıcı etkisi bazı dokularda, özellikle böbrek damarlarında, hem A hem de B reseptörleri üzerinden olduğundan, her iki reseptöre yönelik antagonistlere gereksinim vardır. Bu antagonistlerin çoğu bakteri (*streptomyces misakiensis*) kökenlidir, son yıllarda sentetik analogları da üretilmiştir. Bunlar, ET-1'in kasıcı etkilerinin yanı sıra fosfoinozitol metabolizması ve mitogenez üzerine olan etkilerini de antagonize ederler.¹⁸ Bosentan, hem endotelin A hem de endotelin B (ET_A ve ET_B) reseptörlerini bloke eden, selektif olmayan bir endotelin reseptör antagonistidir.¹

2.1.3. Bosentan

Bosentan, ilk sentezlenen endotelin reseptör antagonistidir ve 2001 yılında onay alan ilk ilaçtır. Bosentan, hem Endotelin-A hem de Endotelin-B reseptörlerine bağlanan dual kompetitif endotelin reseptör antagonistidir.¹⁹ Daha sonraki yıllarda sentezlenen ambrisentan ve sitaksentan selektif reseptör antagonistidir. Buna karşın bosentanın iki reseptöre de afinitesi hemen hemen eşit olup ($ET_A/ET_B \sim 40/1$) nonselektif reseptör antagonistidir.³

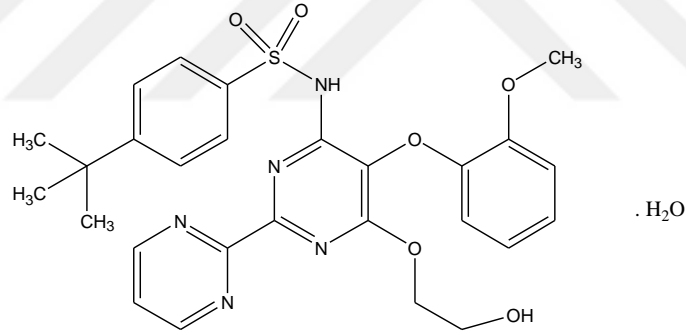
Bosentan, ülkemizde 2005 yılında, pulmoner arteriyel hipertansiyon tedavisinde kullanılmak üzere onaylanmıştır. Bosentan; primer (idiyopatik ve familial) pulmoner

arteriyel hipertansiyon yanında, belirgin intersitisyel pulmoner hastalığın eşlik etmediği sklerodermaya bağlı pulmoner arteriyel hipertansiyon ve ameliyat edilemeyen konjenital sistemik-pulmoner şanta bağlı gelişen pulmoner arteriyel hipertansiyon ile Eisenmenger sendromunda endikedir. Ayrıca dijital ülseri olan sistemik skleroz hastalarında, yeni dijital ülser sayısının azaltılmasında endikedir.¹

Bosentan, yüksek oranda plazma proteinlerine bağlanır. Biyoyararlılığı %50'dir. Yarılanma ömrü 5–8 saattir. Karaciğerde metabolize edilir, eliminasyonu yaklaşık %97 oranında safra yolu ile %3 veya daha az oranda da böbrek yolu ile gerçekleşir.²⁰

2.1.4. Bosentanın Kimyasal Yapısı

Bosentan (BST) 4-tert-butil-N-[6-(2-hidrosetoksi) -5- (2-metoksifenoksi) -2-(pirimidin-2-yl) pirimidin-4-yl] benzen-1-sulfonamid yapısında ve $C_{27}H_{29}N_5O_6S$ molekül formülüne sahiptir. Molekül ağırlığı 551.614'tür.



Şekil 2.1. Bosentanın kimyasal yapısı

2.1.5. Bosentan ile Gerçekleştirilen Çalışmalar

Yokoyama ve ark.²¹ bosentan, ambrisentan, sildenafil ve tadalafilinin insan kan plazmasında kantitatif olarak tayini için sıvı kromatografi/tandem kütle spektrometresini (LC-MS/MS) geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Seyreltilmiş plazma örnekleri içinde bulunan etkin maddeler, %2'lik formik asit ve metanol ile katı faz ekstraksiyon yöntemi kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Dört ilaç, ters faz C₁₈ kolon ve izokratik hareketli faz kullanılarak, 0.2 mL/dak. akış hızında yüksek performanslı sıvı

kromatografisi yardımıyla ayrılmıştır. Bu etkin maddeler iç standart olarak döttere edilmiş bileşikler ile elektro spreylere iyonizasyonlu tandem kütle spektrometresi kullanılarak analiz edilmişlerdir.

Lausecker ve ark.²² bosentan ve üç ana metabolitinin farklı biyolojik ortamda belirlenmesi için LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Bu çalışmada bosentan ve metabolitleri, insan, köpek ve farenin plazma, serum, safra ve karaciğer numunelerinden analiz edilmiştir. Bu analiz; protein çöktürülmesi, bunu takiben sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve LC-MS-MS kombinasyonu ile sağlanmıştır. Analitlerin döteryumlu analogları, iç standart olarak kullanılmıştır. Çalışmada doğrusal aralık 1 veya 2 ng/ml den 2000 veya 10000 ng/ml ye kadar uzanmaktadır. Proteinleri çöktürmek için 1 ml asetonitril-etanol (1:1, v/v) ilave edilmiş. Süpernatant santrifüjden (14000 g 10 dak.) sonra başka bir tüpe aktarılmış ve 1ml tampon (pH 4) eklenmiş. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu 6 ml *n*-klorobütan-diklorometan (8:2, v/v) ile 20 dakika 40 rpm’de döndürülmesi ile yapılmış. Organik faz başka bir tüpe aktarılarak vakum santrifüj ile buharlaştırılarak kurutulmuş. Örnek, 1 ml asetonitril-5 mM amonyum asetat-asetik asit (10:90:1, v/v/v) ile çözüldükten sonra 0.95 ml’si HPLC kolonuna enjekte edilmiş.

Parekh ve ark.²³ sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometresini kullanarak (LC-MS/MS) insan plazmasından bosentan ve hidroksibosentanın tayini için oldukça hassas, seçici ve hızlı biyoanalitik yöntem geliştirmişlerdir. Analitler ve bunların döttere iç standartları katı faz ekstraksiyon kullanılarak 100 µL insan plazmasından kantitatif olarak ekstre edilmiştir. Analitlerin kromatografik ayrımı, izokratik koşullar altında, 2.4 rezolüsyon faktörü ile Thermo Hypurity C₁₈ (100 mm×4.6 mm, 5µ) analitik kolon kullanılarak sağlanmıştır. Yöntem, bosentan için 0.4-1600 ng/mL, hidroksibosentan için ise 0.2-250 ng/mL derişim aralığı ile valide edilmiştir.

Ganz ve ark.²⁴ yaptığı çalışmada, bosentan ve onun üç primer metabolitinin (hidroksi bosentan (Ro 48-5033), dismetil bosentan (Ro 47-8634) ve hidroksi dismetil bosentan (Ro 64-1056)) kuru insan kanı spotlarında (human dried blood spots (DBS)) tam otomatik olarak belirlenmesi için LC–MS/MS yönteminin geliştirilip valide edilmesini amaçlamışlardır. Sistemin, online olarak filtreli kağıt kartlardan bileşiklerin ekstraksiyonunu herhangi bir ön işleme gerek duymadan yapabildiği, analiz süresinin oldukça kısa olduğu ve kuru kan örneklerinin 3.5 ay stabil olduğu belirtilmiştir. Sistem bosentan için 83.0% - 92.3% arasında, Ro 48-5033 için 94.4% - 100% arasında, Ro 47-8634 için 98.0%-100% arasında, Ro 64-1056 için 94.3% - 100% arasında geri kazanım sağlayarak oldukça iyi sonuçlar vermiştir.

Atila ve ark.²⁵ rat plazmasında bosentanın belirlenmesi için hızlı, basit ve hassas bir yöntem olan UFLC–MS/MS metodunu geliştirmiş ve valide etmiştir. Çalışmada iç standart olarak etodolak kullanılmıştır. Yapılan sıvı-sıvı ekstraksiyon da organik faz olarak dietil eter kloroform karışımı kullanılmıştır. Yöntemin tayin edilebilirlik alt sınırı 0.5 ng/ml olup, 0.5–2000 ng/ml derişim aralığında standart kalibrasyon eğrisi lineer olarak bulunmuştur. Valide edilmiş yöntem, ratlardan elde edilen plazma örneklerinde başarıyla uygulanmıştır.

Suganthi ve ark.²⁶ UV spektroskopik ve HPTLC (High Pressure Thin Layer Chromatography) yöntemlerini bosentanın ticari preparatlarda belirlenmesi için geliştirmiş ve valide etmişlerdir. UV spektroskopik yöntemi ile bosentanın tayin edilmesi için, ilacın stok çözeltisi diklorometan da 100 µg/ml derişimde hazırlanmıştır. Absorbans ölçümü 274 nm'de yapılmıştır. Kalibrasyon eğrisi 10–40 µg/ml aralığında elde edilmiştir. Eğim, kesişim ve korelasyon katsayısı değerleri sırasıyla 0.02975, -0.0063 ve 0.9992 olarak bulunmuştur. HPTLC yöntemi ile bosentanın belirlenmesi için, alüminyum levhalar üzerine önceden kaplanmış silikajel 60 F254 ve metanol:

amonyaktan (10:1, v/v) oluşan hareketli bir faz seçilmiştir. Sonra, geliştirilen plaka 288nm'de taranarak ölçülmüştür. Doğrusallık, 10–80 ng/noktalık derişim aralığında bulunmuştur ($r = 0.9991$). Belirlenebilen en düşük derişim 1 ng/nokta ve tayin sınırı 4 ng/nokta olarak tespit edilmiş. Her iki yöntem için düşük bağıl standart sapma ve iyi % geri kazanım değerleri elde edilmiştir.

Kumar ve ark.²⁷ yaptıkları çalışmada, mevcut ticari preparatlarda bosentanın belirlenmesi için UV görünür bölge spektrofotometre yöntemini kullanmışlardır. Yöntem, dökme ve ticari preparatlarda bosentanın tayini için valide edilmiştir. Metanol: su (60:40 h/h) çözeltilisi kullanılmış ve maksimum absorpsiyon 270 nm'de elde edilmiştir. Çalışma, 10–90 µg/ml aralığında lineer olup, regresyon katsayısı 0,9993 olarak bulunmuştur.

Khan ve ark.²⁸ bu analitik yöntemi bosentan API (ilaç aktif madde) içindeki safsızlıkların kontrolü için geliştirmişler. Dört yabancı madde (safsızlıklar A, B, C & D) API' dan izole edilmiş ve spektroskopik çalışmalar ile karakterize edilmişler. 25 ° C' de bir Zorbax SB-C8 (250 x 4.6 mm, 5µ) kolon kullanılarak, 1.0 ml / dk 'lık akış oranı ile bileşikler 220 nm'de analiz edilmişlerdir. Hareketli faz A, tampon sistemden (1gm oktan–1-sülfonik asit sodyum tuz ve 1 litre su içinde 1 ml trietil amin, pH 2.5 perklorit asit ile ayarlanmış) oluşmuş ve metanol hareketli faz B olarak kullanılmıştır. Yöntem ICH (The International Conference on Harmonization) kurallarına göre valide edilmiştir.

Annapurna ve ark.²⁹ yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi ile ticari preparatlarda bosentanın belirlenmesi için yeni bir yöntem geliştirilmiş ve valide etmişlerdir. Yapılan çalışmada sabit faz olarak ters faz C18 kolon (250mm x 4.6mm, 5µm), hareketli faz olarak tetra bütül amonyum hidrojen sülfat-asetonitril (35: 65, v/v)

karışımını kullanmışlardır. Fotodiyot dizili detektör ile kullanılarak yapılan analizlerde sistemin akış hızı 1.2 mL / dak. olarak belirlenmiştir.

2.2. Spektroskopik Yöntemler

Atomik spektroskopi, yalnızca elektronun bir enerji düzeyinden diğer bir enerji düzeyine geçişini (elektronik geçiş) incelerken, moleküler spektroskopi elektronik geçişlere ilaveten dönme ve titreşim enerji düzeyleri arasındaki geçiş de incelemektedir.

Elektromanyetik ışınım ile etkileşen bir molekülün toplam enerjisi:

$$E = E_{\text{elektronik}} + E_{\text{titreşim}} + E_{\text{dönme}}$$

Burada $E_{\text{elektronik}}$, molekülün çeşitli dış orbitallerindeki elektronlara ilişkin elektronik geçiş enerjisini oluşturur. $E_{\text{titreşim}}$ atomlar arası titreşim toplam enerjisini ve $E_{\text{dönme}}$ ise molekül içinde dönme hallerinden oluşan toplam enerjiyi göstermektedir. Titreşim ve dönme geçişleri çok atomlu moleküller için geçerlidir.

Buna bağlı olarak, çok atomlu moleküllerin spektrumları, tek atom spektrumlarına göre daha karmaşıktır. Çünkü bu atomların enerji düzeylerinin sayıları tek atomlulardakinden daha çoktur. Bunun sonucunda; atomik geçişlere ilişkin spektrumlar çizgi (hat) halindeyken, moleküler geçişlere ilişkin spektrumlar bant görünümündedir.

Atomik ve moleküler spektrokimyasal yöntemler, absorpsiyon, emisyon, veya gaz gibi bir örnek ile etkileşmesi sonucu ışının bazı frekanslarının atom, iyon veya moleküllere aktarılmasıdır. Bu sırada parçacıklar temel enerji seviyesinden daha yüksek enerji seviyesine çıkarlar. Emisyon ise yüksek enerji düzeyindeki bir atomun daha düşük enerji seviyesine (kararlı hale) inerken absorpladığı enerjiyi geri vermesidir.³⁰⁻³² Aşağıdaki tabloda, ışığın emisyon, absorpsiyon, saçılma ve kırılmasından faydalanılarak geliştirilmiş bazı ölçüm cihazları listelenmiştir.

Tablo 2.1. Bazı ölçüm cihazlarının özellikleri

Özellik	Yöntem
Işık emisyonu	Emisyon spektroskopisi, florometri
Işık absorpsiyonu	Spektrofotometri, fotometri, fotoakustik spektroskopisi, NMR, ESR
Işık saçılması	Türbidimetri, nefelometri
Işık kırılması	Refraktometri

Spektroskopisi eskiden sadece elektromanyetik ışığa ile madde arasındaki etkileşimlerle ilgilenirdi; ancak bugün için spektroskopisi madde ile diğer enerji türleri arasındaki etkileşimleri de kapsamaktadır. En yaygın şekilde kullanılan spektrometrik yöntemler elektromanyetik ışığa dayanır; birkaç şekilde bulunan bu enerji tipinin en kolay tanınabileni ısı ve ışık ışınmasıdır.³¹

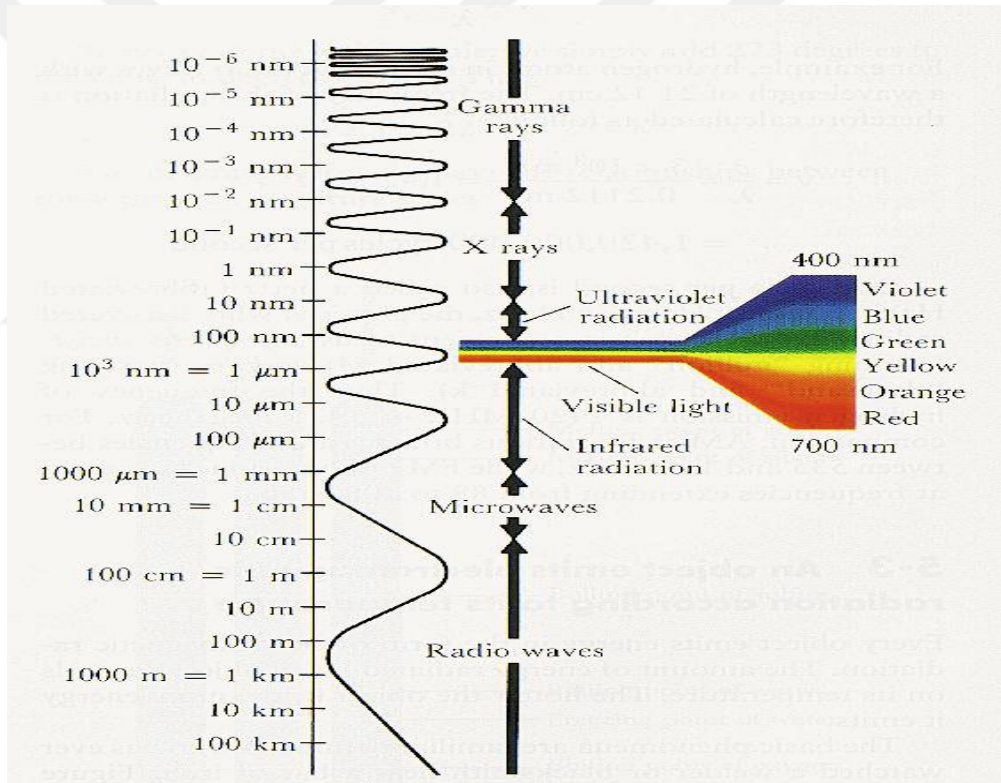
2.2.1. Elektromanyetik Işıma

Klinik laboratuvarlardaki çoğu ölçümler, kontrollü şartlar altında, yayılan, geçirilen, soğurulan, saçılan veya yansıtılan radiant enerjinin ölçülmesi esasına dayanır.

Enerji; frekans ve dalga boyu ile tanımlanan elektromanyetik dalgalarla iletilir. Işın veya elektromagnetik dalga (elektromanyetik radyasyon) uzayda çok büyük bir hızla yayılan bir enerji şeklidir. Öteki enerjilerde olduğu gibi bu enerjinin de çeşitli şekilleri vardır. Bunlardan en çok bilinenleri, ışık, ısı, radyo dalgaları ve X- ışınlarıdır. Bu enerji şekillerinden gözle görüneni sadece ışıktır. Işının uzaydaki hareketi dalgalar halinde olur. Dalga boyu iki dalga tepesi arasındaki uzaklığı ifade eder.³³

2.2.1.1. Elektromanyetik Spektrum

Elektromanyetik radyasyon, 10 nm'den daha kısa 1000 km'den daha uzun dalga boylarına kadar uzanan radyant enerji içermektedir. Gama ışınlarından radyo dalgalarına kadar bilinen tüm elektromanyetik dalgaları kapsayan ışın dizinine elektromanyetik dalga spektrumu (tayfi) denir. Bu spektrum içinde 180-800 nm arasındaki radyant enerji görünür ve mor-ötesi (UV) bölgelerini içine alır ve ışık olarak tanımlanır. Elektromanyetik spektrum çok büyük bir dalga boyu ve frekans aralığını içerir. Bu aralık öyle büyüktür ki logaritmik ölçeğin kullanımını gerektirir.³¹



Şekil 2.2. Elektromanyetik Spektrum

İnsan gözü 380-750 nm dalga boyları arasındaki radiant enerjiyi görebilir. Ancak modern cihazlar daha kısa (UV) veya daha uzun (IR) dalga boylarında da ölçüm yapmaya imkan sağlar. Güneş ışığı veya tungsten filamentten yayılan ışık gözümüzün beyaz olarak algıladığı çeşitli dalga boylarındaki ışığın karışımı veya farklı dalga

boylarındaki radyant enerjinin bir spektrumudur. Bir maddeden gözümüze ulaşan görünür bölgedeki elektromanyetik ışınlar maddenin rengini meydana getirir. Saydam maddeler için içinden geçip gelen, saydam olmayan maddeler için ise yansıyan ışın o maddenin rengini oluşturur. Eğer görünür bölgedeki tüm ışınlar saydam bir maddeden geçiyorsa o madde şeffaf görünür. Saydam olmayan bir madde kendisine gelen tüm ışınları yansıtıyorsa beyaz olarak görünür. Örneğin, bir solüsyon kendisine yöneltilen bir beyaz ışığın 500–580 nm arasındaki kısmını geçiriyor (transmittans) buna karşılık diğer dalga boylarındaki ışığı soğuruyorsa (absorbans) yeşil renkli olarak görünür. Aynı şekilde katı bir cisim kendisine gelen ışığın 500-580 nm dalga boylarındaki kısmını yansıtıyor ve spektrumun geri kalan dalga boylarındaki ışığı absorbe ediyorsa yeşil olarak görünür.³⁴

Tablo spektrumun UV, görünür ve IR bölgelerindeki dalga boyları ile renk özellikleri arasındaki ilişkiyi göstermektedir.

Tablo 2.2. UV, görünür ve kısa IR spektrumun karakteristikleri

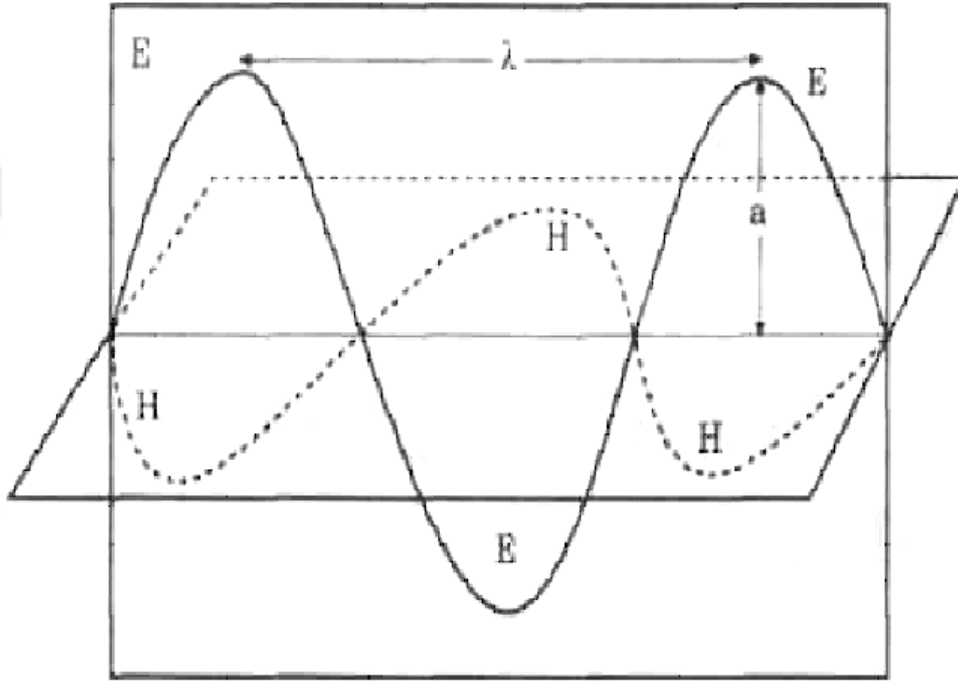
Dalgaboyu (nm)	Bölge	gözlemlenen renk
< 380	ultraviyole	görünür değil
380-440	görünür	mor
440-500	görünür	mavi
500-580	görünür	yeşil
580-600	görünür	sarı
600-620	görünür	portakal rengi
620-750	görünür	kırmızı
800-2500	yakın IR	görünür değil
2500-15000	orta IR	görünür değil
15000-1000000	uzak IR	görünür değil

2.2.1.2. Işın - Madde Etkileşmesi

Işın boşlukta $c = 3 \times 10^8 \text{ ms}^{-1}$ sabit hızıyla yayılır. Işığın boşluktaki yayılma hızının (c), bir ortamdaki yayılma hızına (v) oranı, kırılma indisi (n) olarak

isimlendirilir. Buna göre; $n = c / v$ olur. Işın, normalde her düzlemde ilerleyen dalgaların karışımıdır. Tek bir düzlemde ilerleyen bir ışın dalgasına düzlemsel polarize ışın denir. Düzlemsel polarize ışın radyo dalgaları veya mikrodalgaları gibi belirli türde ışın yapan enerji kaynaklarından üretilir.

Işın, elektrik alan (A) ve manyetik alan (M) bileşenleri birbirine dik ve bunların her ikisi de yayılma doğrultusuna dik bir elektromanyetik dalgadır.³³



Şekil 2.3. Elektromanyetik dalga

E: Dalganın elektrik vektörü
H: Dalganın manyetik vektörü

Işın taneciklerine foton denir. Dalga boyu karakteristiklerine ilaveten ışın, enerji paketleri olan fotonların özelliklerine de sahiptir. Fotonların enerjisi ve frekansı arasında bir ilişki söz konusudur.

$$E = h\nu$$

Burada:

E: Enerji (erg olarak)

v: ışığın frekansı (saniyedeki döngü)

h: Plank sabiti(6.62×10^{27} erg saniye) dir.

Işığın frekansı ve dalga boyu arasında da bir ilişki vardır.

$$V = c / \lambda$$

Burada:

v: ışığın frekansı (saniyedeki döngü)

c: boşlukta ışığın hızı (3×10^{10} cm/sn)

λ : cm olarak ışığın dalga boyu

Her iki denklem birleştirildiğinde:

$$E = h / \lambda$$

Bu denklem ışığın enerjisinin dalga boyu ile ters orantılı olduğunu gösterir.

Örneğin 200nm'deki ultraviyole (UV) ışını 750 nm'deki infrared (IR) ışından daha fazla enerjiye sahiptir.³⁴

Işğın, yansıma, kırılma, girişim, kırınım, dispersiyon gibi olaylardaki davranışı dalga özelliğiyle, fotoelektrik etki ve saçılma gibi olaylardaki davranışı ise tanecik özelliğiyle açıklanabilir.

2.2.1.3. Işğın Absorpsiyonu

Işğın katı, sıvı veya gaz tabakasından geçtiğinde bazı frekanslar absorpsiyon ile seçici olarak ortamdan alınır; bu süreçte ışğın enerjisi numuneyi oluşturan atom, iyon veya moleküllere aktarılır. Absorpsiyon, bu parçacıkları normal oda sıcaklığı hali yani temel halden bir veya daha çok sayıdaki yüksek enerjili uyarılmış hallere çıkarır.

Kuantum teorisine göre atom, moleköl veya iyonlar yalnız belli bir değeri ve sayıda enerji düzeyinde bulunabilir; ışğın absorplanabilmesi için uyarıcı foton enerjisinin, tam olarak absorpsiyon yapan türlerin temel hali ile uyarılmış hallerden biri arasındaki enerji farkına eşit olması gereklidir. Bu enerji farkları ise her tür için özgün

olduğundan, absorplanan ışındaki frekansların incelenmesi, numuneyi oluşturan maddenin bileşenlerin belirlenmesi için kullanılabilir.³²

2.2.2. UV Görünür Bölge Spektroskopisi

Elektromanyetik spektrumda farklı dalga boyuna ya da enerjiye sahip ışın, madde ile etkileşimi sonucunda maddede birtakım değişikliklere sebep olur. Bu enerjinin, molekülün elektronik geçişine neden olduğu bölge, ultraviyole-görünür bölgesi olarak isimlendirilmektedir. Ultraviyole bölgesine karşılık gelen elektromanyetik ışın, maddenin bileşimindeki atomların bağ elektronlarının uyarılmasına neden olur. Bundan dolayı, Ultraviyole-görünür bölge spektroskopisi elektronik spektroskopi olarak da isimlendirilir. Ultraviyole ve görünür bölgeye dayanan absorpsiyon ölçümleri, binlerce inorganik ve organik bileşiğin tanınmasında ve tayininde çok fazla kullanım alanı bulur. Moleküler ultraviyole/görünür bölge absorpsiyon yöntemleri kimya ve klinik laboratuvarlarında en çok kullanılan kantitatif analiz tekniklerinden birisidir.³²

2.2.2.1. UV ve Görünür Bölgede Absorpsiyon

Ultraviyole (UV veya Mor ötesi) ve görünür bölgeye (Vis) karşılık gelen elektromanyetik ışının enerjisi, maddenin bileşimindeki atomların bağ elektronlarının uyarılmasına sebep olur. Bu uyarılma, temel haldeki titreşim ve dönme enerji seviyelerinden uyarılmış haldeki titreşim ve dönme enerji seviyelerine çıkacak şekilde gerçekleşir. UV bölgesi, 10 – 200 nm aralığında uzak Ultraviyole (vakum bölgesi) ve 200 -400 nm aralığında ise Ultraviyole (yakın Ultraviyole) olarak adlandırılır. Görünür bölge 400 – 800 nm aralığında yer almaktadır.

Ultraviyole bölgesindeki enerji, molekülde elektronik uyarıya neden olmakta ve bu uyarı ile elektronların temel enerji seviyesinden (E_0) bir üst enerji seviyesine (E_1) geçmesi gerçekleşmektedir. Ultraviyoledeki temel enerji seviyesinde moleküllerin

enerjileri, titreşim ve dönme enerjilerinin toplamına eşittir ($\Delta E_0 = E_T + E_D$). Temel enerji alanında titreşim enerjilerini ve dönme enerji seviyelerini temel halde içeren sistemdir.³¹

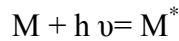
Ultraviyole ve görünür absorpsiyon spektroskopisinde molar absorptivite 0- 10^5 aralığında gözlenir. Belirli bir pikin ϵ (molar absorptivite) değerinin büyüklüğü, taneciklerin yakalama kesitine ve bir enerji absorpsiyon geçişi olasılığına dayanır. ϵ ile bu değişkenler arasındaki bağıntı aşağıdaki eşitlikle verilir.

$$\epsilon = 8.7 \times 10^{19} \text{ PA}$$

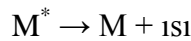
P geçiş olasılığını, A kesit hedef alanını (cm^2 olarak) gösterir. Tipik organik moleküller için alan, elektron difraksiyonu ve X-ışını çalışmaları ile yaklaşık olarak bulunabilir; değeri 10^{-15} cm^2 civarındadır. Geçiş olasılığı değeri ise sıfırdan bire kadar değişir. Kuantum mekaniğinin izin verdiği geçişler için P değeri 0.1–1 arasındadır ve kuvvetli absorpsiyon bantları elde edilir. Molar absorptivite 10³'den küçük olan pikler düşük şiddetli pikler olarak sınıflandırılır. Bunlar, oluşum olasılıkları 0.01'den daha küçük olan yasaklanmış geçişlerden meydana gelirler.³²

2.2.2.2. Absorplayan Türler

Atomik ya da moleküler bir M türünün ultraviyole veya görünür ışını absorplaması iki aşamalı bir işlem olarak düşünülebilir. Birinci aşama, M maddesinin enerji olarak aşağıda gösterildiği gibi elektronik uyarılmasına ilişkindir.



M ile $h\nu$ fotonu arasındaki reaksiyon ürünü elektronik olarak uyarılmış M^* ile gösterilen türdür. Uyarılmış türlerin ömürleri kısa olup (10^{-8} - 10^{-9} s) bunların varlığı, çeşitli geri durulma süreçleriyle sonlandırılır. Absorpsiyon olayının ikinci aşaması olan durulmanın en yaygın tipi, uyarılma enerjisinin ısıya dönüştüğü haldir; yani:

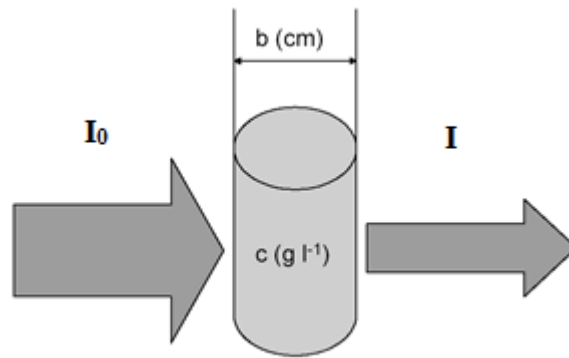


Durulma, M^* 'in yeni türler oluşturmak üzere parçalanmasıyla da gerçekleşebilir; bu tür bir işleme, fotokimyasal reaksiyon denir. Diğer bir seçenek olarak durulma, floresans veya fosforesans şeklinde yeniden emisyonu kapsayabilir. M^* 'nin yaşam süresinin çok kısa olması, herhangi bir andaki derişiminin ihmal edilebilir düzeyde olmasına sebep olur. Hatta açığa çıkan ısı enerjisini ölçmek bile mümkün olmayabilir. Bu nedenle fotokimyasal parçalanmanın olduğu haller dışında kalan absorpsiyon ölçümlerinde, absorblayan sistemde hemen hemen hiç bir bozulma olmaz.

Ultraviyole veya görünür ışının absorpsiyonu, çoğunlukla bağlı elektronların uyarılmasıyla sonuçlanır; bunun sonucu olarak da, test edilen maddede bulunan bağların tipleri ile ilişkili dalga boylarında absorpsiyon pikleri elde edilir. Absorpsiyon spektroskopisi bu nedenle bir moleküldeki fonksiyonel grupların teşhisinde ve ayrıca tipik absorpsiyon bandları veren bileşiklerin kantitatif analizlerinde de uygulanabilir.³²

2.2.2.3. Geçirgenlik (Transmittans) ve Soğurulma (Absorbans) Arasındaki İlişki

I_0 şiddetinde bir ışın demeti, belli dalga boylarındaki ışığı soğuran bir madde çözeltisinden geçirilirse, demette bulunan bazı ışınlar madde tarafından absorbe edilir ve ışın demeti çözeltiden çıktığında şiddeti bir miktar azalır.



Şekil 2.4. Absorplayan bir çözeltiye giren I_0 şiddetindeki ışın demetinin I şiddetine düşmüş olarak çıkması

Çözeltiye I_0 şiddetinde giren ışın demeti, çözeltiyi I şiddetinde terk eder. Yani çözültiden geçen ışın demetinin şiddeti I_0 dan I 'ye düşer. Buna göre, ışın demetinin çözültiden geçme oranı I / I_0 olur. Bu orana geçirgenlik (transmittans) (T) denir ve geçirgenlik;

$$T = I / I_0 \text{ şeklinde gösterilir.}$$

Buna karşın, çözelti içine gelen ışığın bir kısmı yansıtılabilir veya ölçüm yapılan kabın yüzeyi veya çözücü tarafından absorbe edilebilir. Doğru ölçüm yapılabilmesi için bu faktörlerin elimine edilmesi gerekmektedir. Bu sebeple içindeki tüm çözültüler aynı olan ancak araştırılan maddenin olmadığı bir referans kap oluşturulur ve onda da transmittans (I_R) ölçümü yapılır. Analiz edilen çözültinin transmittansı I / I_R olarak elde edilir. Pratikte, önce ışık kaynağı kapatılarak cihazın dedektörü sıfır transmittansa ayarlanır. Daha sonra ışık gönderilerek %100 transmittans ayarlanır. Daha sonra örneğin transmittansı ölçülür.

Geçirgenliğin eksi logaritması absorbans (A) olarak adlandırılır ve absorbans

$$A = -\log_{10} T = -\log \frac{I}{I_0}$$

şeklinde formüle edilir. Absorbe edilen veya geçirilen ışık miktarı ile madde derişimi arasında matematiksel bir ilişki vardır.

Çalışmalarda absorplanan ışın miktarı ya geçirgenlik ya da absorbans olarak verilir. Geçirgenlik, genellikle yüzde olarak verilir:

$$\%T = \frac{I}{I_0} 100$$

Ölçülen maddenin derişimi absorbe edilen ışık miktarı ile doğru orantılı iken geçirilen ışığın logaritması ile ters orantılıdır. Bu ilişki Lambert-Beer kanunu olarak adlandırılır. Aşağıdaki şekilde verilir.

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Bu denklem absorpsiyon fotometresi ile kantitatif analizin temelini oluşturur.

Burada:

A: Absorbans

ϵ : Absorptivite olarak tanımlanan orantı sabiti

b: Işığın çözelti içinde kat ettiği yol (cm)

c: Absorpsiyon yapan maddenin derişimi

Lambert Beer Kanunu aşağıdaki denklem ile de ifade edilebilir.³⁴

$$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon \cdot b \cdot c}$$

2.2.3. Lambert-Beer Kanunundan Sapmalar

Lambert-Beer kanunundan sapmalar; gerçek sapmalar, cihazlardan kaynaklanan sapmalar ve çözelti etkileşimlerinden gelen sapmalar olarak sınıflandırılabilir. Lambert-Beer kanunu, çözeltilere gönderilen radyasyonun monokromatik olduğu, absorbans değerleri 2'nin altında olan seyreltik çözeltilere en iyi şekilde uygulanabilen bir kanundur. Absorbans 2'nin üzerine çıktığında, yüklü taneciklerin birbirinin yük dağılımını etkilemeleri veya değiştirmelerinden dolayı hatalı sonuçlar elde edilir. Derişimle absorbans arasındaki lineer bağıntı bozulur. Absorplayan maddenin derişimi düşük olabilir fakat yanında bulunan maddelerin derişimi yüksek olursa yine sapma gözlenebilir. Ortamda optik etkileşime giren farklı maddeler bulunduğu zaman veya analizi yapılan molekül ile başka bir çözünen veya çözen arasında bir reaksiyon oluştuğunda da yanlış ölçümler gerçekleşebilir. Lambert-Beer kanunu monokromatik çözeltiler için geçerli olduğundan, ölçüm yapılan cihazda dedektöre kaçak ışık gelmesi veya ışık şiddetinde azalma ölçüm hatasına neden olur. Eğer analiz edilen örnek homojen değilse yine hatalı bir ölçüm gerçekleştirilir.^{34,33}

2.2.4. Cihaz

Fotometri, bir çözeltildeki madde miktarının çözeltilen geçen veya çözeltilinin tuttuğu ışık miktarından faydalanılarak ölçülmesidir. Spektrofotometri ise seçilmiş dalga boylarındaki ışığın şiddetinin ölçümüdür. Bu amaçla kullanılan cihazlara da spektrofotometre denir. Laboratuvarlarda hem tek ışınlı hem de çift ışınlı cihazlar kullanılmaktadır.

2.2.4.1. Tek-Işınlı Cihazlar

Tek-ışınlı bir absorpsiyon ölçüm cihazında; bir ışık kaynağı, dalga boyu seçimi için filtre veya monokromatör, ışık yoluna sıra ile konulacak hücreler, transduser, bir yükseltici ve bir sinyal okuma düzeneği bulunur.³² Bu bileşenlerin hepsinin aynı ışık yoluna yerleştirildiği spektrofotometrelere tek ışık yollu spektrofotometreler denir. Işık demeti monokromatörden geçirilir. Daha sonra absorpsiyon hücresinden geçerken, radyant enerjinin bir kısmı çözeltilinin özelliğine ve derişimine bağlı olarak soğurulur. Soğurulmayan ışık bir dedektöre aktarılır ve burada ışık enerjisi elektrik enerjisine dönüştürülerek kaydedilir. Uygulamada, cihazlarda “sıfır” ve “yüz” ayarı denilen ayarlar her dalga boyu için yapılır. Bu ayarla, numunenin en az ve en çok absorbans yaptığı durumlar bulunur. “Sıfır” ayarı için kuvvet yerine opak bir blok yerleştirilerek detektöre hiç ışın gitmemesi sağlanır. “Yüz” ayarı için ise ışın demeti reaktif körüne gönderilir. Böylece sıfır absorpsiyon yani 100 % geçirgenlik gözlenmesi sağlanır. Arkasından da numunenin ölçümü gerçekleştirilir. Spektrofotometrelerin çoğunda dijital donanım ve yazılımlar bulunduğundan bu işlevler otomatik olarak gerçekleştirilir.³⁴

2.2.4.2. Çift-Işınlı Cihazlar

Birçok modern fotometre ve spektrofotometreler çift-ışınlıdır. Bu cihazla ışın bölücü olarak adlandırılan V-şeklindeki bir ayna ile oluşturulan iki ışından biri referans

çözeltilisinden geçerek transdusere ulaşır ve ikinci ışın da aynı anda numune çözeltiliden geçerek ikinci bir eşdeğer transdusere ulaşır. İki transduserin cevapları yükseltilir ve cevapların oranı elektronik olarak ölçülür ve okuma cihazında gösterilir.

Çift-ışınlı cihazların çok kısa süreli değişimler hariç ışın şiddetindeki sapmaların ve transduser ve yükselticideki salınımların sonuçlara etkisini önleme avantajı vardır. Ayrıca dalga boyu ile ışın şiddetindeki büyük değişimlerin etkisi de önlenir. Ayrıca çift ışınlı tasarım, geçirgenlik veya absorpsiyon spektrumlarının sürekli kayıt edilmesine de uygundur. Bu nedenle, modern ultraviyole ve görünür bölge spektrofotometrelerin çoğu çift-ışınlıdır.³⁴

2.2.5. UV-Görünür Bölge Spektrofotometre Cihazının Kullanım Amaçları

1. Kalitatif Analiz
2. Kantitatif Analiz
3. Molekül Yapısını Aydınlatma

2.2.5.1. Absorpsiyon Ölçümlerinin Kalitatif Analize Uygulanması

Ultraviyole ve görünür olan spektrofotometri, kalitatif analizde sınırlı bir uygulamaya sahiptir. Çünkü absorpsiyon maksimum ve minimumların sayısı oldukça sınırlıdır. Bu yüzden, kuşkuya yer bırakmayacak biçimde kesin bir kalitatif analiz yapmak mümkün değildir.

Kalitatif moleküler spektroskopide, veriler çeşitli şekillerde grafiğe geçirilir. Burada dikey eksen çoğu kez yüzde geçirgenlik, absorpsiyon, log absorpsiyon veya molar absorptivitedir. Yatay eksen genellikle dalga sayısı veya dalga boyu olmakla birlikte, zaman zaman frekans da kullanılabilir.³²

2.2.5.2. Absorpsiyon Ölçümlerinin Kantitatif Analize Uygulanması

Absorpsiyon spektroskopisi, kantitatif analiz için elverişli olan en yararlı ve en yaygın kullanılan araçlardan biridir. Spektrofotometrik ve fotometrik yöntemlerin

önemli özellikleri şu hususları içerir: hem organik hem de inorganik sistemlere yaygın uygulanabilirlik; $10^{-4}M$ 'dan $10^{-5}M$ 'a kadar değişen tipik duyarlılık değerleri; orta derecede seçicilik; iyi bir doğruluk; veri toplama kolaylığı ve elverişliliğidir. Kantitatif ultraviyole/görünür alan absorpsiyon yöntemlerinin uygulamaları çok sayıda olmakla kalmayıp, kantitatif kimyasal bilgilerin gerekli olduğu her alanla da ilgilidir.³² Kantitatif analizin temelinde Lambert-Beer yasasında bahsedilen derişim ile absorpsiyon arasındaki ilişki incelenir. Kantitatif analizle derişimi bilinmeyen bir çözeltinin derişimi bulunur. Analizi yapılacak bileşimin farklı derişimlerde çözeltileri hazırlanır. Bu çözeltilerin Ultraviyole ve görünür bölge spektroskopisi ile maksimum dalga boyunda (λ_{maks}) her derişime karşılık gelen absorbansları okunur ve absorbansa karşı derişim grafiği (korelasyon grafiği) çizilir. Daha sonra, derişimi bilinmeyen numunenin ultraviyole ve görünür bölge spektroskopisi ile maksimum dalga boyunda (λ_{maks}) absorbansı okunur. Korelasyon grafiğinde absorbansa karşılık gelen derişim değeri bulunur. Ayrıca karışımların analizi, asitlik sabitinin belirlenmesi, hidrojen bağının hesaplanması, hız ve denge sabitlerinin hesaplanması yapılabilir.³¹

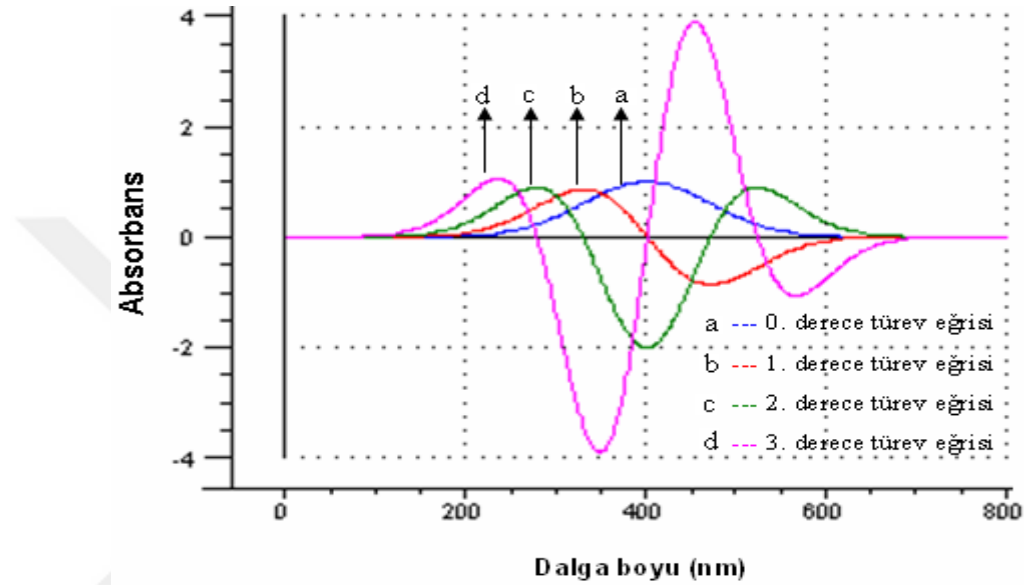
2.3. Türev Spektrofotometrisi Yöntemi

Türev spektrofotometresi; türev spektrumlarının kullanılması esasına dayalı bir analiz yöntemidir. UV- görünür bölgedeki bir spektrum madde üzerine gönderilen ışığın dalga boylarına karşı absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile elde edilir. Yani $A = f(X)$ fonksiyonudur. Bu fonksiyonun her bir noktasındaki türevi hesaplanabilir (dA/dX). Eğer bu türev değerleri dalga boyuna karşı grafiğe geçirilecek olursa "türev spektrumu" meydana gelir ve 1 den n'e kadar derecede olabilir.

Türev spektrofotometride, absorbans ya da geçirgenliğin dalga boyuna göre birinci veya daha yüksek dereceden türevi, dalga boyuna karşı kaydedilerek spektrum çizilir. Çoğu kez bu eğriler, normal bir spektrumda görülmeyen spektral ayrıntıları

ortaya çıkarılırlar. Buna ek olarak, bazen bozucu maddeler varlığında bir analit derişiminin ölçümü daha kolay ya da daha doğru olarak yapılabilir.^{32, 35}

Şekil 2.5'te görüldüğü gibi bir çan eğrisinin 1. derece türev eğrisi orijinal spektrumdaki eğrinin teğetlerinin eğimini göstermektedir. Böylece türevlendirme ile spektrum daha ayrıntılı ve net bir görünüm kazanır.



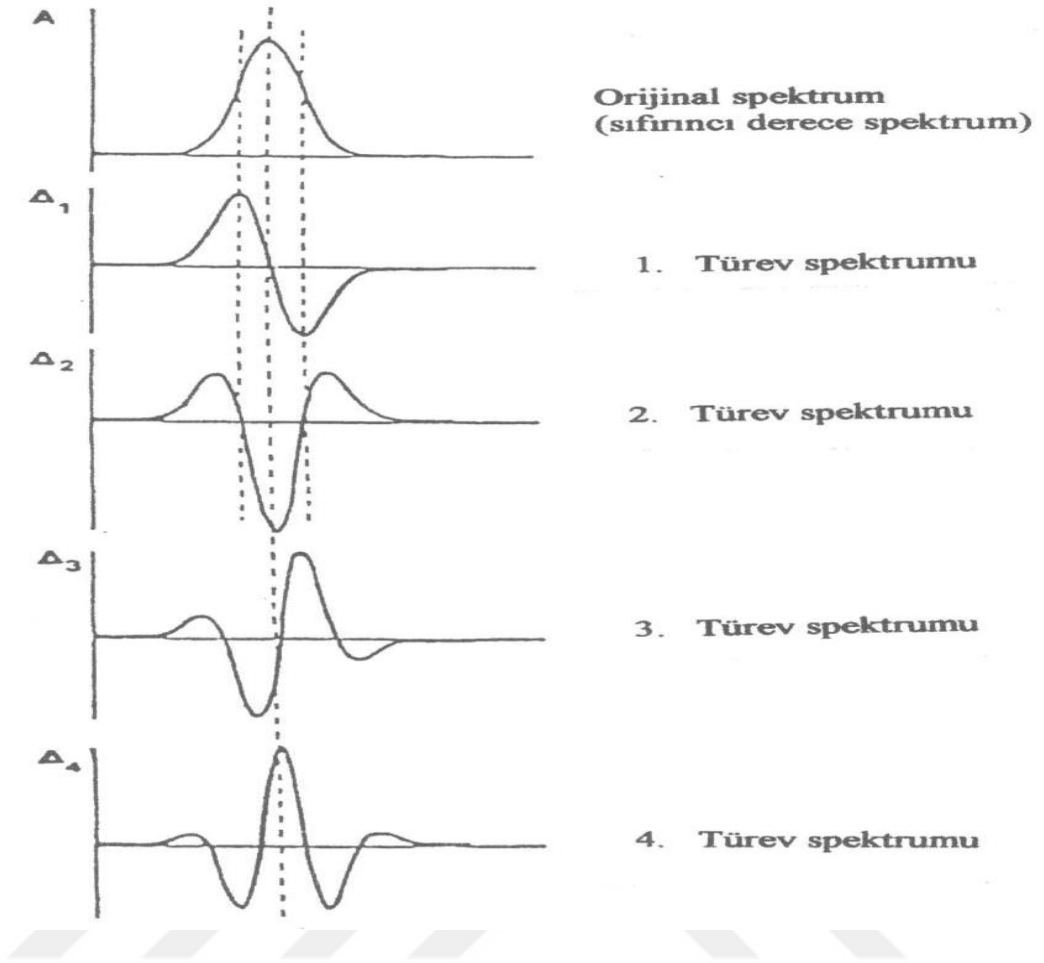
Şekil 2.5. Absorbans ve türev spektrumlar

2.3.1. Türev Spektrumlarının Değerlendirilmesi

Günümüzde 1. den 4.'ye kadar türev eğrisi çizilmekte ve anlam kazanmaktadır. Aşağıdaki şekilde de görüldüğü gibi 1. türev eğrisi orijinal spektrumdaki eğrinin teğetlerinin eğimini göstermektedir. Burada orijinal spektrumun maksimum noktası kaybolmuş, buna karşılık orijinal spektrumda absorbansın yükseldiği kısımlar için pozitif, azaldığı kısımlar için ise negatif değerler almaktadır. Orijinal spektrumdaki eğri üzerinde eğimin en büyük olduğu noktalara, yani eğrinin yan yüksekliklerine karşılık bir maksimum ve bir minimum göstermekte eğimin en düşük olduğu tepe noktasında ise sıfır olmaktadır. Buna göre gauss eğrisindeki maksimum noktasına 1. türev eğrisinde bir kesim noktası (zero-crossing)" karşılık gelmektedir. 2. türev eğrisinde ise aynı işlemler

sonucunda orijinal eğrinin maksimum noktasına karşılık gelen bir minimum görülmektedir. 3.türev eğrisinde orijinal eğrinin maksimum noktasına aynen 1. Türev eğrisinde olduğu gibi bir kesim noktası karşılık gelmektedir. 4.türev ise orijinal spektrumdaki maksimum noktaya yine bir maksimum nokta karşılık gelmektedir. Bu nedenle tek maddenin kantitatif tayinlerinde 2. ve 4. türev eğrileri kullanılmaktadır. Ayrıca orijinal Gauss eğrisi tipindeki bir pike karşılık n türevde n + 1 tane maksimum ve minimuma rastlanmaktadır. Yani 1. türevde 2, 2.türevde 3, 3.türevde 4 tane gibi maksimum ve minimum noktası gözlenmektedir. Önemli bir nokta ise, türev eğrilerinin aynı dalga boyu aralığı içerisinde alınması nedeniyle piklerin genişliğinin azalmasıdır, Bu azalma yaklaşık 1. türevde yarısına, 2. türevde % 53 'üne ve 4. türevde yüzde 41 'ine inmektedir.

Türev spektrumlarında, kesim noktası çok önemlidir. Çünkü bu noktada, ait olduğu maddenin diğer madde veya maddelerin spektrumuna katkısı yoktur. Dolayısıyla karışım içerisinde herhangi bir ayırma işlemi gerekmeksizin bazı maddelerin diğerleri yanında miktar tayinlerinin yapılabilmesi mümkündür. Bu da, özellikle karışım halinde, maddeleri etken maddeler olarak içeren farmasötik preparatların analizi için, yöntemin çok etkili ve kolay bir miktar tayini yöntemi olmasını sağlar. Bu yöntem, ikili karışımlarda olduğu kadar, daha fazla sayıda bileşen içeren karışımlarda da uygun kesim noktaları bulunduğu uygulanabilir.³⁵



Şekil 2.6. Farklı derecede türev spektrumlar

2.3.2. Türev Spektroskopisinin Avantajları ve Dezavantajları

a) Avantajları:

a) Türev çalışması, orijinal spektrumun eğimleri hakkında bilgi verir ve bunun omuz noktaları ile dönüm noktalarının daha belirgin hale gelmesine neden olur. Böylece bir bileşik daha kolay ve kesin olarak tanınabilir.

b) Çoğunlukla orijinal spektrumda elde edilen eğriler, birçok pikin üst üste gelmesi ile meydana gelmiştir. Türev alma ile bu absorpsiyon eğrileri daha ayrıntılı şekle girer ve böylece bir arada bulunan piklerin tek tek görülmesi sağlanır.

c) Bilindiği gibi spektrofotometride bulanık çözeltiler ile çalışılırken, çökme hızı, tanecik büyüklüğü gibi faktörlere bağlı olarak büyük oranda hata yapılabilir. Türev

eğrilerinin hazırlanması ile bulanıklığın oluşturduğu bu olumsuz etki ortadan kaldırılabilir.

d) Birden fazla maddenin karışım halinde bulunduğu ortamlarda, ekstraksiyon ve kromatografi gibi herhangi bir ayırma işlemine başvurmaksızın tek tek miktarları tayin edilebilir.

e) Reaksiyon ortamından kaynaklanan gürültü piklerinin yok edilmesi sağlanır.

b) Dezavantajları:

a) Kullanımı çok kolay olmasına karşılık pahalı spektrofotometrelere ve oldukça karmaşık bir elektronik yapıya ihtiyaç vardır.

b) Türev spektrumlarında çok sayıda uydu pikler de görülür. Bu pikler bir karışım ile çalışılırken başka bileşenlerin de varlığına bizi götürür. Türev derecesi arttıkça bu cins piklerin sayısı da artacağı için karışıklık daha da artacaktır.³⁵

2.3.3. Türev Spektroskopisi Yönteminin Uygulamaları

Ultraviyole ve görünür bölgelerde türev spektroskopisinin en önemli uygulama alanı, spekturumları birbiriyle çakışan bileşiklerin birbirinden ayırt edilmesini gerektiren kalitatif tayinlerle ilgilidir. Ayrıca türev spektroskopisi;

- İlaç analizlerinde
- Aynı spektral bölgede absorpsiyon yapan ilaç karışımlarının tayininde
- Etken maddenin bozunma ürünü varlığında tayininde
- Bozucu etki yapan matriks bileşenlerinin varlığında etken maddenin tayininde

uygulanmaktadır.^{32, 36}

2.4. Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, bir örnek karışımındaki çözülmüş yapıların iki fazda (sabit ve hareketli faz) farklı dağılımlarına dayanan, fiziksel bir ayırma yöntemidir. Çözülmüş yapılar, laboratuvarında ölçülen analitlerdir. Kromatografik ayırma yönteminde hareketli

faz, örneği sabit (hareketsiz) fazı içeren yatak, düzlem veya kolon boyunca taşımaktadır. Hareketli faz, sabit fazın içinden geçtikçe çözülmüş moleküller iki faz arasında dağılırlar. Sabit faza daha az ilgisi olan çözülmüş yapılar, daha çok ilgisi olanlara oranla, hareketli fazda daha uzun süre kalırlar. Düşük afiniteli çözülmüş moleküller daha hızlı göç ederek, sabit faza daha çok ilgisi olan çözülmüş moleküllerden ayrılırlar. Daha sonra hareketli fazın fiziksel veya kimyasal özelliklerinin değiştirilmesi ile sabit faza kuvvetli bir şekilde bağlanmış olan çözülmüş moleküller de yerlerinden ayrılırlar.³⁷ Kromatografik yöntemler; ilaçlarda, klinik kimya, adli tıp ve biyokimya alanlarında, kozmetik ürünlerinde, gıda analizlerinde, çevre analizlerinde geniş ve verimli bir kullanım alanına sahiptir.³¹

Kromatografinin iki temel formu düzlem ve kolon kromatografisidir. Düzlem kromatografisinde sabit faz bir kağıt tabaka üzerindedir veya cam veya plastik bir tabaka üzerine bağlıdır. Kolon kromatografisinde ise, üzeri sabit fazla kaplanmış veya kimyasal olarak bağlanmış olan destek partikülleri bir tüp içinde paketlenmiştir veya sabit faz kolonun/tüpün iç yüzeyine kaplanmıştır. Kağıt kromatografisinde sabit faz, bir su tabakası veya kağıt liflerine kaplanmış bir polar çözügendir.³⁷

2.4.1. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması

Kromatografik yöntemler, faz sistemlerine veya özel faz düzenlerine göre farklı şekilde sınıflandırılıp tanımlanmaktadır.

- Ayrılma Mekanizmalarına Göre
- Uygulama Biçimine Göre
- Faz Tiplerine Göre

Ayrılma Mekanizmalarına Göre

- Adsorpsiyon kromatografisi
- Partisyon kromatografisi

- İyon değiştirme kromatografisi
- Jel filtrasyon (Moleküler eleme) kromatografisi
- İyon çifti kromatografisi
- Afinite kromatografisi

Uygulama Biçimine Göre

- Düzlemsel kromatografi
- Kağıt kromatografisi
- İnce tabaka kromatografisi (TLC)
- Kolon kromatografisi
- Gaz kromatografisi (GC)
- Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)

Faz Tiplerine Göre

- Sıvı kromatografisi
- Sıvı-Katı kromatografisi
- Sıvı-Sıvı kromatografisi
- Gaz kromatografisi
- Gaz-Katı kromatografisi
- Gaz-Sıvı kromatografisi

2.4.2. Kromatografide Temel Olan Fiziksel ve Kimyasal Olaylar

Kromatografik yöntemler, çözünmüş molekülleri ayırmak için kullanılan kimyasal veya fiziksel mekanizmalara göre sınıflandırılırlar. Bunlar: Adsorpsiyon, dağılma, iyon-değiştirme ve jel filtrasyon mekanizmalarıdır.

2.4.2.1. Dağılma Kromatografisi

Çözünür maddelerin birbirine karışmayan iki sıvı içinde farklı olarak bölünmeleri, dağılma kromatografisi ile ayırmanın temelini oluşturmaktadır. Pratikte, karışmayan bu iki sıvının biri durgun faz olarak görev yapmaktadır. Bu fazı hazırlamak için, ince bir sıvı tabakası, kapiler bir kolonunun iç çeperlerine veya destek partiküllerine absorbe ettirilir veya kimyasal olarak bağlanır. Ayırım, çözülmüş moleküllerin durgun ve hareketli fazlar arasındaki göreceli çözünürlük farklarına dayanmaktadır.³⁷

Dağılma kromatografisi, GLC veya sıvı-sıvı kromatografisi (LLC) olarak sınıflandırılır. LLC ya normal-faz veya ters-faz olarak sınıflandırılır. Normal-faz kromatografisinde, durgun faz olarak polar bir sıvı, bir çözgen veya çözgenler karışımı kullanılır. Ters-faz kromatografisinde, durgun faz polar değildir, hareketli faz ise daha polardır. İyonik çözülmüş moleküllerin ayırımında kullanılan iyon bastırıcı veya iyon-çifti kromatografisi ters-faz kromatografinin iki şeklidir. İyon-baskılayıcı kromatografide, zayıf asidik veya bazik analitin iyonik karakteri, hareketli fazın pH'nın değiştirilmesi ile nötrleştirilir veya bastırılır. İyonik grubu nötrleştirilmiş olan çözülmüş molekül, daha az polar olduğu için, polar olmayan durgun faz ile daha iyi etkileşime girebilir. Bastırılmış analit, nötr bir türün özelliklerini gösterir ve ters faz kromatografisi ile ayrılır. İyon çifti kromatografisinde, zıt yüklü iyon-analitinkine zıt yüklü-hareketli faza eklenir. Hareketli fazda, zıt yüklü iyon iyonik analitlerle iyon çiftleri kurar, baz çiftlerinin yerine geçer ve analitin iyonlarını nötralize eder. Bu iyon çiftleri daha sonra ters-faz kromografisi ile ayrılır. Pratikte, iyon çifti kromatografisi ilaçların ve metabolitlerinin ayrılmalarında özellikle yararlıdır.³⁷

2.4.2.2. Adsorpsiyon Kromatografisi

Çözünmüş yapıların, katı bir partikül yüzeyine adsorpsiyon ve desorpsiyonları arasındaki farklılıkları, adsorpsiyon kromatografisiyle ayırımın temelini oluşturur. Bu kromatografi türünde etken olan elektrostatik etkileşimler, hidrojen bağları, dağılım etkileşimlerini kontrol eden fiziksel kuvvetlerdir. Ancak, çözücü tutulmasının tekrarlanabilmesi ile ilgili teknik problemler, klinik laboratuvarlarda bu kromatografinin tercih edilmesini azaltmıştır.³⁷

2.4.2.3. İyon Değiştirme Kromatografisi

Yüklü durgun faz yüzeyi, farklı yüzlü hareketli faz ve çözünmüş moleküller arasındaki iyon değişimine dayanmaktadır. İşleyişte, çözünmüş moleküller, kendi yüklerinin türü ve iyonik yüklerinin büyüklüklerindeki farklılıklara göre, birbirlerinden ayrılırlar. Bu tip kromatografide, plastik reçine veya silika partiküllerinin yüzeyleri durgun faz olarak görev yaparlar. Durgun faza sabitleştirilmiş anyonik ve katyonik fonksiyonel gruplar bağlıdır. Elektrokimyasal olarak nötr durum, sabit bir yüke çok yakın bulunan ve yer değiştirebilen zıt yüklü iyonlarla sağlanmaktadır. Hareketli fazdaki çözünmüş molekülün iyonları, zıt iyonlarla yer değiştirir. Hareketli fazın pH'sının, iyonik şiddetinin veya her ikisinin birden değiştirilmesi ile çözünmüş molekül iyonları seçici olarak kolondan çıkarılır. İyon değiştirici kromatografinin aminoasitlerin, peptidlerin, proteinlerin, nükleotidlerin ve nükleik asitlerin ayrılması gibi birçok klinik uygulaması bulunmaktadır. Sulu karışımlardan inorganik iyonların ayrılması ve uzaklaştırılması, iyon değiştirici kromatografinin diğer bir önemli uygulamasıdır.³⁷

2.4.2.4. Jel Filtrasyon Kromatografisi

Sterik dışlama, jel geçirgenlik, boyuta göre dışlama, moleküler-dışlama, moleküler-elek kromatografisi olarak da bilinir; çözünmüş molekülleri moleküler boyutlarına göre ayırır. Molekül şekli ve hidrasyon durumu da bu yöntemde etkindir.

Sterik dışlama kromatografisinde çapraz bağlı dekstran (sephadex), poliakrilamit (bio-gel) agaroz (sepharoz), polistiren-divinil benzen, gözenekli cam ve bu sayılanların karışımı (ultragel,synchrompak) gibi farklı maddeler durgun faz olarak kullanılmaktadır. Küçük moleküllerin, geçici olarak içlerinde tutulduğu boncukların gözenek boyutları sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Gözeneklere şekillerinden dolayı veya büyüklüklerinden dolayı giremeyen moleküller, tamamen hareketli fazda kalırlar ve kolondan çabuk çıkarlar. Ara boyutlardaki moleküller, gözenek hacimlerinin farklı kesimlerine ulaşarak, büyük ve küçük moleküller arasında kolondan çıkarlar.³⁷

2.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Sıvı kromatografisi ile ayırma, çözülmüş moleküllerin hareketli sıvı faz ile durgun faz arasında dağılması ilkesine dayanır. Durgun faz olarak küçük partiküller kullanıldığında, yüksek performanslı sıvı kromatografisidir. Kolon verimi kolon dolgu maddesinin boyutuyla ters orantılı; basınç düşüşü ise partikül çapının karesi ile ilişkili olduğundan, yüksek verimli HPLC kolonlarından sıvıların pompalanması için göreceli olarak yüksek basınçlar gerekir.³⁷ Yüksek performanslı sıvı kromatografi bütün analitik ayırma teknikleri arasında en yaygın kullanılanıdır. Yöntemin bu kadar yaygın olmasının sebepleri; duyarlılığı, doğru kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan türlerin veya sıcaklıkla kolay bozuna bilen türlerin ayrılmasına uygun olmasıdır. Aminoasitlere, proteinlere, nükleik asitlere, hidrokarbonlara, karbonhidratlara, ilaçlara, terpenoidlere, pestisitlere, antibiyotiklere, steroidlere, metal-organik türlere ve çeşitli inorganik bileşiklere bu yöntem uygulanabilir.³¹

Sıvı kromatografisi yönteminin özel bir uygulaması olan HPLC yönteminde, sabit faz olarak kullanılan dolgu maddelerinin tanecik boyutunun küçültülmesi sonucu hareketli faz ile etkileşen sabit faz yüzey alanı büyür ve böylece kolonun etkinliği

arttırılmış olur. Çok sıkı olarak doldurulmuş kolondan hareketli fazın belirli bir hızla geçebilmesi için basınç uygulanması gerekir.

Bir HPLC analizinin başarısı büyük oranda doğru çözücü sisteminin belirlenmesine bağlıdır. HPLC’de kullanılacak çözücünün sahip olması gereken fiziksel özellikler şunlardır: Kaynama noktaları fazla yüksek olmamalıdır ki çözücü daha sonra kolay uzaklaştırılabilsin, kolonda yüksek basınç oluşmaması için viskoziteleri düşük olmalıdır, kullanılan dedektörle uyumlu olmalıdır, analizi yapılacak numunenin sinyalini engellememelidir. Mümkün olduğunca güvenli bir kimyasal olmalı, toksisitesi düşük olmalıdır.³⁰

HPLC’nin avantajları; HPLC kolonu, rejenerasyon gerekmeksizin pek çok kez kullanılabilir. HPLC tekniği kullanıcının becerisine daha az bağımlıdır ve tekrarlanabilirlik daha yüksektir. Nicel analiz kullanılabilir. Analiz süresi kısadır. Duyarlık yüksektir.

2.5.1. Normal ve Ters Faz Dolguları

Hareketli ve sabit fazların polarlıkları söz konusu olduğu zaman, dağılma kromatografisi ikiye ayrılır. Eskiden sıvı-sıvı kromatografisinde sabit faz olarak silikaya veya alüminaya bağlanmış su, trietilen glikol gibi oldukça polar, hareketli faz olarak da heksan, i-propil eter gibi daha az polar olan maddeler kullanılırdı. Bunlara normal faz kromatografisi denilmektedir. Ancak, günümüzde daha çok ters-faz kromatografisi kullanılmaktadır. Ters-faz kromatografisinde sabit faz polar olmayan bir hidrokarbon, hareketli faz ise su, metanol, asetonitril, alkilamin, alkildimetilamin gibi polar maddedir. Normal faz kromatografisinde polarlıkları $A > B > C$ olan üç maddeden önce C elüe olur. Onu B ve A takip eder. Çünkü polarlığı daha az olan C, polarlığı az olan hareketli fazda, polarlığı çok olan sabit faza göre, daha çok çözünür ve dolayısıyla kolondan daha kısa zamanda çıkar. Ters-faz kromatografisinde, normal faz

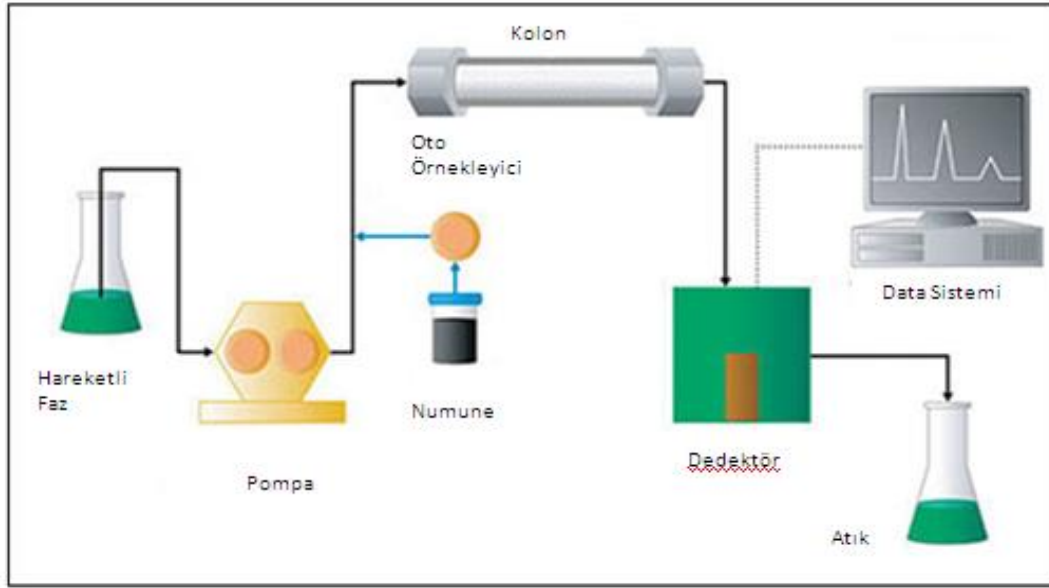
kromatografisindekinin tam tersi olur. Polarlığı en yüksek olan A maddesi ilk önce elüe olur. Çünkü çözücü polardır. Hareketli fazın polarlığı düşürülecek olursa, B ve C'de kolondan çıkış zamanları azalır.³²

2.5.2. Sıvı Kromatografi Cihazları

Temel bir sıvı kromatografi cihazı şu elemanlardan oluşmaktadır:

1. Çözünmüş moleküllerin ayrılması için kromatografik kolon
2. Hareketli fazın saklandığı çözücü tankı
3. Hareketli sıvı fazı sisteme vermek için bir veya daha fazla pompa
4. Örneğin bir miktarını kolona vermek için enjektör
5. Kolondan çıkışları esnasında ayrılmış analitleri saptamak için sistem üzerinde detektör
6. Sistemi kontrol eden, verileri işleyen bilgisayar.

Bu elemanlarla çeşitli tiplerde HPLC sistemleri oluşturulur.³⁷ Modern sıvı kromatografi sistemlerinde genel olarak kullanılan ve tanecik boyutu 2 ile 10 μm arasında olan dolgu maddeleri ile uygun sıvı akış hızları elde edebilmek için, yüzlerce atm'lik pompa basınçlarına gerek vardır. Bu yüksek basınçların bir sonucu olarak HPLC için gerekli donanım, diğer tip kromatografi sistemleri dikkate alındığında, daha ince işçilik gerektirir ve sonuçta daha pahalıdır. Şekil 2.7 'de tipik bir yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazının çeşitli kısımları şematik olarak gösterilmiştir.³¹



Şekil 2.7. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazının şematik görünüşü

2.5.3. Kromatografide Temel Kavramlar

1. Ayırma Gücü (Rezulusyon R_S)

Kromatografinin amacı birçok pikin birbirinden ayrılmasıdır. İki pikin ayrılması (R_S) alıkonma zamanları arasındaki farkın ortalama pik taban genişliğine bölümü ile ifade edilir.

$$R_S = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_2 + W_1}$$

Burada, W_1 ve W_2 alıkonma zamanları ile aynı zaman birimde olan ilgili pik taban genişlikleridir. İki pik arasındaki ayırma gücü, pikler dar taban genişliğinde ve keskin olduğunda, pikler birbirinden yeterince uzak olduğunda veya oldukça fazla alıkonduğunda iyileşecektir. Bir ayırmada ayırma gücü aslında bu parametrelerin birleşik katkısının bir fonksiyonudur.³⁸

2. Alıkonma (Retansiyon)

Bir kromatografik işlemde moleküller sabit faz ile etkileşimleri dışında hareketli faz ile birlikte hareket ederler. Moleküllerin sabit faz ile farklı etkileşimi ayrılmayı sağlar. Yüksek performanslı sıvı kromatografide hareketli faz sıvıdır ve sabit faz

genellikle metal silindir bir kolon içinde bulunan ve destek adı verilen küçük katı partiküllere bağlanan bir kaplamadır. Eğer bir molekül hareketli faz ile göç etmek yerine sabit fazda dağılıma maruz kalır ise alıkonur. Kapasite faktörü veya alıkonma faktörü K, iki faz ile şöyle ilişkilendirilir:

$$k = K \frac{V_S}{V_M}$$

Burada V_s ve V_m sabit ve hareketli faz hacimleridir ve K molekülün iki fazdaki partiyon katsayısıdır. Pratikte k, basitçe ilgili molekülün alıkonma zamanının ölü zamana bölünmesiyle hesaplanır. Alıkonma belli bir molekülün sabit faza bağlanma yeteneğinin bir ölçüsüdür. Bir molekülün kapasite faktörü sıfır ise alıkonma gerçekleşmez ve molekül çözücü pikinde ayrılmaz. Alıkonma artarken ayrılma potansiyeli iyileşir.³⁸

3. Seçicilik

Sabit fazın iki molekülü ayırma yeteneği kromatografinin temel konusudur. Seçicilik iyileştirilmediği takdirde iki pik başlangıç koşullarında ayrılmaz. Pik genişliği her iki örnekte aynıdır. Seçicilik (α); daha fazla alıkonan bileşenin kapasite faktörünün daha az alıkonan bileşenin kapasite faktörüne oranı olarak tanımlanır.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

Seçicilik bu yüzden analitin, sabit fazın ve hareketli fazın fiziksel ve kimyasal yapısına bağlıdır ve bu faktörlerin değiştirilmesi ile değiştirilebilir. Seçicilik, kolon boyutları ve akış hızı değiştirilerek değiştirilemez.³⁸

4. Kolon Verimliliği

Kolon verimliliği bir maddenin kolonda hareket etme kolaylığının bir ölçüsüdür, sabit ve hareketli fazlara giriş ve çıkışı ölçer ve kinetik parametredir. Tabaka sayısı 'N'

ile ifade edilir. Alıkonma zamanı ve pik genişliğinden hesaplanır.³⁸

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

5. Faktörlerin Birbiri ile İlişkisi

Bir ayırmanın üç bileşeni; hız, ayırma gücü ve alıkonma veya kapasite faktörü birbirini ile ilişkilidir; bu yüzden herhangi birinin iyileştirilmesi diğerlerini etkiler.

Bir ayırma işleminde optimizasyon, en etkin ayırmaya ulaşılan kadar her bir parametrenin basamaklı incelenmesi ile sağlanır. Ayırma gücü, ayırmayı iyileştirecek veya birleştirecek üç faktörün fonksiyonudur:

1. Alıkonma, moleküllerin sabit faz ile etkileşim yeteneği veya matrikse olan ilgisidir.
2. Seçicilik, en az iki bileşik için farklı etkileşim üreten matriksin ayırma gücüdür.
3. Kolon verimliliği, bileşiğin kolonda hareket kolaylığıdır.³⁸
4. Ayırma gücü, kolon verimliliği, seçicilik ve alıkonma terimleri ile de ifade edilebilir:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k}{1 + k} \right)$$

2.5.4. Kolon Dolgu Maddelerinin Tipleri

Sıvı kromatografide temel olarak iki tip kolon dolgu maddesi kullanılmaktadır. Bunlar, film dolgular ve gözenekli dolgulardır. Bunlardan birincisi, küresel, gözeneksiz, çapları 30-40 µm olan cam veya polimer tanelerinden oluşur. Bu tanelerin yüzeyine, silis, alümina, polistiren- divinil benzen sentetik reçinesi veya bir iyon değiştirici reçineden oluşan ince bir gözenekli film kaplanmıştır. Bazı uygulamalar için bu yüzeye, absorpsiyon ile yüzeye tutunan uygun bir sıvı, durgun faz olarak ilave bir katman halinde kaplanır. Alternatif olarak, organik bir yüzey katman oluşturmak üzere kimyasal

işleme tabi tutulabilir. Günümüzde, taneler zarlı dolgular daha çok koruyucu kolonlarda kullanılmakta, analitik kolonlarda kullanılmamaktadır. Sıvı kromatografide kullanılan gözenekli partiküller, çapları 3-10 µm arasında olan gözenekli partiküllerdir. Belli boyuttaki bir partikül için, partikül boyutu aralığını en aza indirmek gerklidir. Partiküller silis, alümina, polistiren – divinil benzen sentetik reçinesi veya bir iyon değiştirici reçineden meydana gelmiştir. Silis, sıvı kromatografide en yaygın kullanılan bir dolgu maddesidir. Silis partikülleri mikron altı silis partiküllerini oldukça uniform yarıçapta daha büyük partiküller oluşturacak koşullarda bir araya toplanmasıyla hazırlanır. Elde edilen partiküller çoğu zaman, yüzeye kimyasal olarak veya fiziksel olarak bağlanan, ince bir organik film ile kaplanır.³¹

2.5.5. Dedektörler

Sıvı kromatografi dedektörleri temel olarak iki tiptir. Yığın özelliği dedektörleri, hareketli fazın kırma indisi, dielektrik sabiti veya yoğunluğu gibi, analit tarafından değiştirilen yığın özelliklerine cevap veren dedektörlerdir. Bunun tersine, analit özelliği dedektörleri, analitin UV absorptansı, floresans şiddeti veya difüzyon akımı gibi hareketli fazın sahip olmadığı, bazı özelliklerine cevap veren dedektörlerdir.³¹ Bu çalışmada UV esaslı dedektörü kullanıldığından, sadece bu dedektörden bahsedilecektir.

UV Absorbans Dedektörleri: Absorbans dedektörleri kromatografi kolonundan gelen elüantın absorptansını ölçen cihazlardır. Ekstra bant genişlemesini en aza indirmek için dedektör hücresinin hacmi mümkün olduğu ölçüde küçük tutulur. Buna göre, numune hacmi genel olarak 1-10µl, ışın yoluda 2-10mm kadardır. Ancak böyle hücrelerin basıncı en çok 40 atm olmalıdır. Bu nedenle Z şeklinde olan hücreye girmeden önce çözeltinin buhar basıncı düşürülür.

Birçok absorptans dedektörleri çift ışın demetlidir. Işın demetlerinden birisi elüe edilmiş çözeltiden, diğer demet ise şiddetinin azaltılması için bir filtreden geçirilir. Bu

demetleri ölçmek için birbiriyle uyumlu çalışan iki fotoelektrik dedektör kullanılır. Işın yolu kesicili bir sistem de kullanılabilir. Bu durumda tek fototüp yeterli olur. Her iki halde de iki ışın demeti oranının logaritması zamana karşı grafiğe geçirilir.³²

2.6. Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon

Bir yöntemin veya ölçüm prosedürünün, belirlenen amaçlara uygunluğunun, deneysel çalışmalarla elde edilen objektif delillerle, doğrulanmasına validasyon denir (ISO /IEC17025).

Yöntem validasyonu aşağıdaki sekiz basamakla belirlenir.

1. Doğruluk
2. Kesinlik
3. Sağlamlık, kararlılık
4. Doğrusallık/Ölçüm aralığı
5. Seçicilik ve Duyarlılık
6. Teşhis Sınırı, Gözlenebilirlik Sınırı (LOD)
7. Tayin sınırı (LOQ)
8. Ölçüm Belirsizliği

2.6.1. Doğruluk

Doğruluk, bir ölçüm cihazının veya metodun ölçüm sonucunun gerçek değere ve birbirlerine yakınlığını ifade eder. Doğruluğun, gerçeklik ve sistematik hata olmak üzere iki bileşeni vardır.³⁹ Doğruluk için gerçek değer farklı şekillerde elde edilebilir. Birincisi; yöntemin sonuçlarını, bilinen yöntemlerden birinin sonuçları ile karşılaştırmaktır.⁴⁰ İkincisi ise; doğruluğun bilinen derişimlere sahip bir örneğin analiziyle karşılaştırarak kontrol edilmesidir.⁴¹

2.6.2. Kesinlik

Kesinlik, ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının ölçüsüdür ve bağımsız analiz sonuçları arasındaki tutarlılığı gösterir.⁴²

Kesinlik iki kategoriye ayrılır; tekrarlanabilirlik ve tekrar yapılabilirlik.

Tekrarlanabilirlik, aynı laboratuvarında, aynı metot, aynı örnek, aynı cihaz ve aynı analist ile kısa zaman aralığında yapılan ölçüm sonuçlarının birbirlerine olan yakınlığının ölçüsüdür.⁴³

Tekrar yapılabilirlik, bir metodun; farklı laboratuvarında, farklı cihazla, farklı kişi tarafından, farklı kimyasallar kullanarak, farklı günlerde yaptığı ölçüm sonuçlarının biri birine yakınlığının ölçüsüdür. Ölçüm sonuçlarının standart sapması hesaplanarak ifade edilir.³⁹

2.6.3. Sağlamlık

Sağlamlık çalışmaları, operasyonel göstergelerin analiz sonuçları üzerindeki etkilerini ölçer. Çeşitli şartlar altında, yöntemin analitik sonuçlarının kabul edilebilir doğruluk ve kesinliğini saptama kabiliyetidir.⁴⁴

2.6.4. Doğrusallık/Ölçüm Aralığı

Ölçüm aralığı, yöntemin uygulama aralığının belirlenmesi için kullanılır. Kalibrasyon eğrisinde, ölçülen analitin derişimi ve dedektör yanıtının doğru orantılı olduğu aralıktır. Yöntem geçerli kılma çalışmalarında, analitin derişimleri bu aralık dikkate alınarak düzenlenir.

Standart eğri, metoda ve ürüne bağlı belirli sayıda ölçüm noktası ile belirlenir. Eğrinin oluşturulması, içinde miktarı bilinen referans örneklerle veya kör örnek içine eklenmiş analitin bilinen derişimi ile yapılır. Her bir ölçüm noktasında en az iki ölçüm yapılır.

Eurachem rehberinde; en az 6 noktada, bir de kör eklenerek ve her bir noktada tekrar sayısı 3 olarak, ISO 11095’de en az 3 farklı seviyede referans örnek ve tekrar sayısı ise en az 2 olarak belirtilmiştir.⁴²

2.6.5. Seçicilik ve Duyarlılık

Yöntemin seçiciliği; analiti örnekte varlığı tespit edilmiş ve analitle girişim yapabilen diğer bileşenlerden ayırt etmesidir.⁴⁵ Seçicilik yeterli düzeyde değilse, yöntemin doğruluğu, kesinliği ve doğrusallığı hakkında bir şüphe uyanır.

Seçicilik aşağıda belirtilen yollarla belirlenir:

- Analit içeren ve içermeyen numuneler analiz edilerek, analit ile girişim yapma olasılığı bulunan maddeler belirlenir.
- Kromatografik yöntemlerde, analitin en yakınındaki pikle olan ayırım gücü değerlerine bakılır.
- İncelenecek bileşiğe cevap verme yeteneğine sahip olan, duyarlılığı yüksek bir dedektör kullanılır.⁴⁶

2.6.6. Teşhis Sınırı, Gözlenebilirlik Sınırı (LOD)

Uygulanacak bir yöntemin, gelen numunelerin %95'ini ölçebilmesi gerekir. Bu yüzden, yöntemin uygun kalibratörlerle analitik ölçüm sınırları belirlenir.⁴⁷ Analitle ilişkili sinyalin geri plan karıştırıcı etkenlerden (back ground noise) ayrılabilirdiği en düşük analit miktardır. Gözlenebilirlik, analitin ayırt edilebildiği en düşük derişimdir. Örneğin kromatografik bir metotta analit sinyalinin gürültüden ayrılabilmesi için gereken minimum analit miktarıdır. LOD çalışması ile validasyonu yapılan metot ve belirlenen matrikste ölçülebilen, ancak miktarı kesin olarak tayin edilemeyen derişim bulunmaktadır.

LOD (Limit of detection= Gözlenebilirlik sınırı)

X_{bl} = blank ölçümlerinin ortalaması

Sbl = blank ölçümlerinin standart sapması

$$\text{LOD} = \bar{X}_{bl} + 3 S_{bl}$$

2.6.7. Tayin Sınırı (LOQ)

Analitin güvenilir, doğru ölçümünün yapılabildiği en düşük miktardır. Doğrudan yapılan deneylerden veya hesapla bulunabilir.

LOQ (Limit of quantitation= Belirlenebilirlik sınırı)

\bar{X}_{bl} = blank ölçümlerinin ortalaması

Sbl = blank ölçümlerinin standart sapması

$$\text{LOQ} = \bar{X}_{bl} + 10 S_{bl}$$

2.6.8. Ölçüm Belirsizliği

Ölçülen miktar ile ilişkili olarak karşılaşılabilecek değerler dağılımını ifade eder.⁴³ Ölçüm belirsizliği, gerçekte, her ölçüm sonucu ile birlikte yer alması gereken bir parametredir. Testin güven düzeyini gösterir. Testi kullananlara ölçümün kalitesi hakkında bilgi verir, sonucun gerçek değeri ne ölçüde yansıttığını gösterir. Laboratuvarlar, kendi koşullarında tüm belirsizlik kaynaklarını sistematik olarak inceleyip, belirsizlik değerlerini ölçüm sonucu ile birlikte rapor etmelidir.⁴⁷

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

Metanol (Merck)

Asetonitril (HPLC grade, MERCK, Almanya)

Bosentan Actelion Pharmaceuticals (Allschwil, Switzerland)

Deiyonize su

Deney tüpü

Otomatik pipet (10–100 µl, 100–1000 µl ve 1000–5000 µl)

Kuvartz küvet

Balon joje

3.2. Kullanılan Cihazlar

Etüv (Dedeoğlu, Membert)

Ultrasonik banyo (Transsonic T 890/H, Elma LC 30)

Terazi (Bosch S 2000)

Karıştırıcı (Vorteks, IKA)

UV-Görünür Bölge Spektrofotometre Sistemi:

UV-Görünür Bölge Spektrofotometresi (ThermoSpectronic HeLIOS β)

UV-Görünür Bölge Spektrofotometre ThermoSpectronic Vision 32 Software

Yazıcı (HP LaserJet 1018)

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Agilent Technologies 1200 Series marka HPLC sistem

Pompa

Dedektör (Agilent Technologies)

Kolon firmı (USA)

Gaz giderme ünitesi (Agilent Technologies)

Ters faz kolonu (C₁₈, 5 µm, 250 x 4.6 mm)

Bilgisayar (HP)

3.3. Yöntemler

3.3.1. Spektrofotometrik Yöntem Şartları

Spektrofotometrik ölçümler, Thermospectronic çift ışınlı UV-Görünür Bölge spektrofotometresi kullanılarak gerçekleştirildi ve UV-Görünür Bölge spektrumlar, madde üzerine gönderilen ışığın dalga boylarına karşı absorbands değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle 271 nm dalga boyunda elde edildi. Birinci Türev Spektrofotometri çalışmasında ise, 285 nm dalga boyunda spektrumlar elde edildi ve 2 nm spektral bant genişliği ve 1 cm kuvarz küvetler kullanıldı.

3.3.2 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yöntem Şartları

HPLC yöntem şartları Tablo 3.1’de verildi.

Tablo 3.1. Bosentan için HPLC-UV çalışmasında uygulanan yöntem şartları

Yöntem Şartları	Bosentan
Kolon	C ₁₈ (250x4.6 mm,5µm)
Dedektör	UV
Dalga Boyu	271nm
Hareketli Faz	metanol-asetonitril-su (20:50:30 v/v/v)
Kolon Sıcaklığı	25°C
Kolon Akış Hızı	1.0 ml dak ⁻¹
Enjeksiyon Hacmi	10 µl

3.3.3. HPLC Yöntem Geçerlilik Testleri

Bu çalışmanın HPLC yöntemi kullanılarak yapılan analizlerinde kullanılan geçerlilik testleri, ICH Q2B (The International Conference on Harmonization) rehberinde kabul edilen analitiksel yöntem geçerlilik parametreleri esas alınarak gerçekleştirildi.

3.3.3.1. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı

Doğrusallık, 10–35 µg ml⁻¹ derişim aralığında ve bu aralıktaki çözeltilerin altı kez tekrarlanan ölçümlerinden elde edildi. Elde edilen değerlerin grafiğe geçirilmesi ile UV-Görünür bölge ve birinci türev kalibrasyon eğrileri türetildi. HPLC çalışmasında ise 0.25–20 µg ml⁻¹ derişim aralığındaki standart çözeltilerin derişimine karşı elde edilen pik alanları grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edildi. Kalibrasyon eğrisinden standart eğrinin doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları elde edildi.

3.3.3.2. Doğruluk/Kesinlik ve Geri Kazanım

Doğruluk ve kesinlik çalışmalarında kalibrasyon eğrisi içerisindeki üç farklı derişimdeki çözeltilerin günüçi (aynı yöntem ve aynı laboratuvar şartlarında 1 günde 6 kez) ve günler arası (aynı yöntemle farklı 3 günde 6 kez) analizleri yapıldı. Bu çalışmalardan elde edilen verilerle ortalamalar ve standart sapmalar hesaplandı. Doğruluk bağıl hatayla [% BH: (bulunan-eklenen/eklenen) x 100], kesinlik bağıl standart sapma [% BSS: (SS/ortalama değer) x 100] ile verildi.

Farmasötik preparatlar için analitik geri kazanım, standart ekleme yöntemine göre yapıldı.

3.3.3.3. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Spektrofotometri çalışmalarında, % Bağıl Standart Sapma (% BSS) değerleri kalibrasyon eğrisinin en küçük değerinden daha küçük derişimlerde hazırlanan bosentan çözeltilerinin absorbans değerlerine göre belirlendi. % BSS değeri % 10'dan küçük olan

değer miktar tayin alt sınırı (LOQ) ve % 20'den küçük olan değer ise gözlenebilme sınırı (LOD) değeri olarak kabul edildi.

HPLC yönteminde, kromatogramlarda sinyal/gürültü oranının 3 olduğu derişim gözlenebilme sınırı (LOD), 10 olduğu derişim ise miktar tayin alt sınırı (LOQ) olarak belirlendi.

3.4. Tabletlerin Hazırlanması

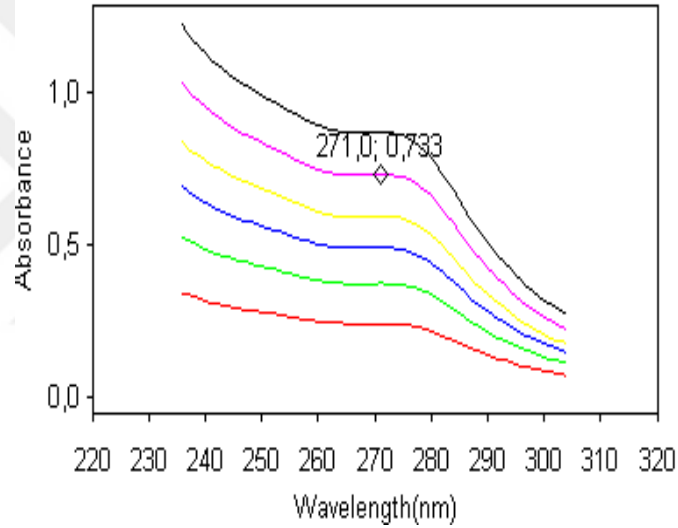
Bosentan içeren Tracleer ve Diamond tabletlerinin her birinden 10'ar adet alındı ve bu tabletler tartıldı. Sonra toz haline gelinceye kadar bu tabletler ezildi. Toz haline gelen her bir ilaçtan 1 tablet ağırlıkta olacak kadar toz ilaç alınarak 100 ml'lik balon jöjeye koyuldu ve metanolde ultra sonic banyo yardımıyla çözüldü ve hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Elde edilen tablet çözeltileri süzöldü ve gerekli derişimde çözeltileri hazırlanıp analizleri yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri Yöntemi

4.1.1. Standart ve Kalite Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması

Bosentanın stok çözeltisi $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ derişimde metanol kullanılarak hazırlandı. Hazırlanan bu stok çözeltinin belirli hacimleri metanol içinde seyreltilerek 10, 15, 20, 25, 30 ve $35 \mu\text{g ml}^{-1}$ derişimlerde standart çalışma çözeltileri ve üç farklı derişimde (12, 23 ve $33 \mu\text{g ml}^{-1}$) kalite kontrol çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin, UV-Görünür bölge absorpsiyonları 271 nm 'de okunarak spektrumları elde edildi (Şekil 4.1).

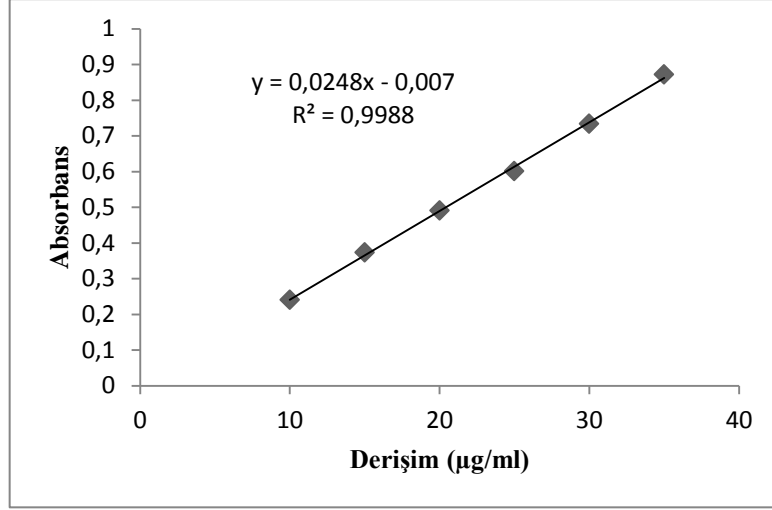


Şekil 4.1. UV-Görünür bölge spektrofotometrik çalışmasında bosentanın 10, 15, 20, 25, 30 ve $35 \mu\text{g ml}^{-1}$ derişimlerdeki çözeltilerinin absorpsiyon spektrumu

4.1.2. Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu)

4.1.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi

Bosentanın $10\text{--}35 \mu\text{g ml}^{-1}$ derişim aralığında hazırlanan standart çalışma çözeltilerinin derişimlerine (10, 15, 20, 25, 30 ve $35 \mu\text{g ml}^{-1}$) karşı okunan absorpsiyon değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile kalibrasyon eğrisi elde edildi ve Şekil 4.2'de verildi.



Şekil 4.2. UV-Görünür bölge spektrofotometri yöntemle elde edilen kalibrasyon eğrisi

UV-Görünür Bölge spektrofotometri yöntemle elde edilen kalibrasyon eğrisinin regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.1’de verildi.

Tablo 4.1. Bosentana ait kalibrasyon eğrisi ile ilgili bilgiler

Parametreler	UV-Gör.Böl. Spektrofotometri
Dalga Boyu (λ : nm)	271
Doğrusal Aralık ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	10-35
Regrasyon Doğrusu Denklemi	$A = 0,0248x - 0,007$
S_a	1.6×10^{-4}
S_b	1×10^{-4}
Korelasyon katsayısı (r)	0.9993

S_a : Kaymanın standart sapması, S_b : Eğimin standart sapması

4.1.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Bosentana ait kalibrasyon eğrisinin en küçük değeri olan $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ’den daha düşük derişimlerde çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerin absorbans değerleri altı kez okundu ve % Bağıl Standart Sapma (% BSS) değerleri belirlendi. % BSS değeri % 10’dan küçük olan değer miktar tayin alt sınırı (LOQ) ve % 20’den küçük olan değer ise gözlenebilme sınırı (LOD) değeri olarak kabul edildi. LOD değeri $1 \mu\text{g ml}^{-1}$, LOQ değeri $4 \mu\text{g ml}^{-1}$ olarak belirlendi.

4.1.2.3. Doğruluk, Kesinlik

Yöntemin doğruluğu ve kesinliği gün içi ve günler arası yapılan ölçümlerle belirlendi. Kalibrasyon eğrisi içine düşen üç farklı derişimde (12, 23 ve 33 $\mu\text{g ml}^{-1}$) hazırlanan bosentan çözeltilerinin ortalaması, standart sapması, bağıl standart sapması ve bağıl hataları gün içi ve günler arası ölçümlerle belirlendi. Doğruluk % Bağıl Hata (% BH), kesinlik ise % Bağıl Standart Sapma (% BSS) ile verildi. Deney sonuçları Tablo 4,2’de verildi.

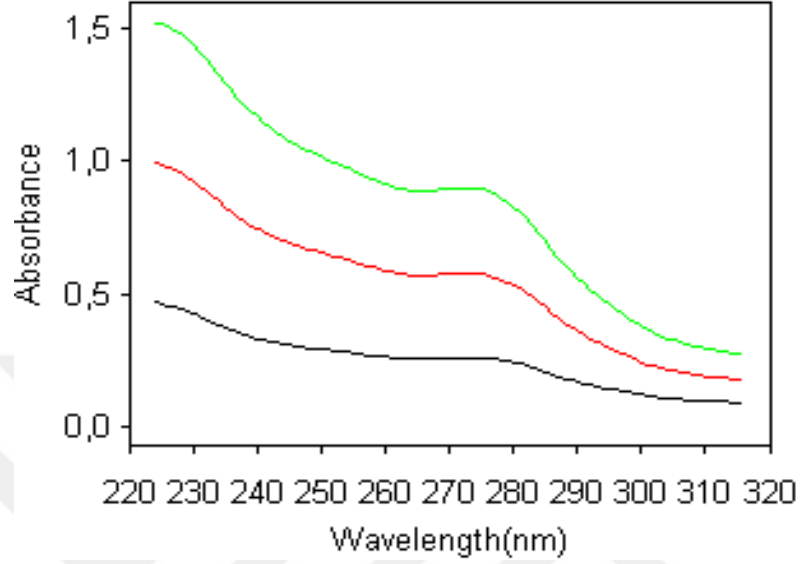
Tablo 4.2. UV-Görünür bölge spektrofotometrisi çalışmalarında gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk değerleri

Eklenen ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Bulunan Değer ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Gün içi			Bulunan Değer ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Günler Arası		
		X \pm SS ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	% BSS	% BH		X \pm SS ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	% BSS	% BH
12	11.72	11.76 \pm 0.056	0.47	-2.00	11.99	11.99 \pm 0.016	0,136	-0.83
	11.72				11.99			
	11.75				11.99			
	11.75				11.99			
	11.79				11.99			
	11.87				12.13			
23	23.47	23.54 \pm 0.053	0.22	2.34	23.23	23.15 \pm 0.049	0.211	0.65
	23.50				23.17			
	23.54				23.17			
	23.54				23.15			
	23.58				23.13			
	23.62				23.08			
33	32.57	32.77 \pm 0.109	0.33	-0.69	32.90	33.00 \pm 0.088	0.266	0.02
	32.73				32.94			
	32.80				32.97			
	32.80				33.01			
	32.84				33.09			
	32.88				33.13			

4.1.2.4. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Bosentan etkin maddesi içeren Tracleer ve Diamond tabletlerinden 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişiminde çözeltiler hazırlandı, UV-Görünür bölge spektrumları alındı ve

absorbansları belirlendi. Böylece uygulanan yöntemin farmasötik preparatlarda etkin madde miktar tayininde uygulanabilir geçerli testlere ve yönteme sahip olduğu belirlendi.



Şekil 4.3. UV-Görünür bölge spektrofotometrik çalışmalarda Tracleer farmasötik preparatın absorpsiyon spektrumu

4.1.2.5. Analitik Geri Kazanım

Standart ekleme yöntemi kullanılarak, farmasötik preparatlardan analitik geri kazanım çalışmaları yapıldı. Bosentan etkin maddesi içeren Tracleer ve Diamond tabletten $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ derişimde tablet çözeltileri hazırlandı ve UV-Görünür bölge absorbansları belirlendi. Tablet çözeltilisine $1, 12$ ve $24 \mu\text{g ml}^{-1}$ derişimde bosentan standart çözeltileri eklendi ve elde edilen son çözeltilerin UV-Görünür Bölge absorbansları belirlendi. Yapılan ölçüm sonuçlarına göre, yüzde analitik geri kazanımı $[\% \text{ GK} = ((\text{toplam değer-eklenen değer}/\text{tablet çözeltisi}) \times 100)]$ formülü kullanılarak geri kazanım değerleri hesaplandı. Tabletler için elde edilen sonuçlar Tablo 4.3'te verilmiştir.

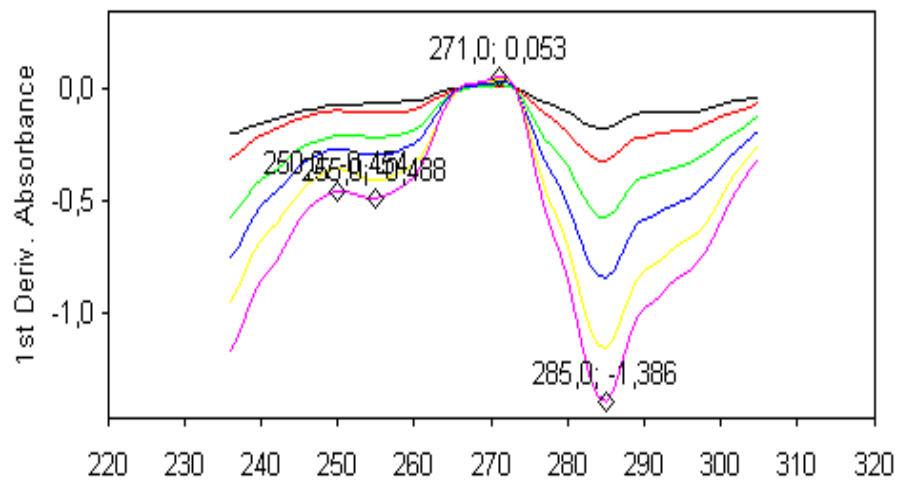
Tablo 4.3. Farmasötik preparatların analitik geri kazanım değerleri

Preparat	Eklene (µg ml ⁻¹)	Bulunan±SS (µg ml ⁻¹)	Geri Kazanım(%)	BSS %
Tracleer 10 µg ml ⁻¹	1	10.88±0.009	98.90	0.08
	12	21.98 ± 0.007	99.91	0.03
	24	33.95 ± 0.007	99.85	0.02
Diamond 10 µg ml ⁻¹	1	10.87 ± 0.010	98.81	0.11
	12	22.30 ± 0.020	101.36	0.13
	24	33.92 ± 0.053	99.76	0.15

4.2. Birinci Türev Spektrofotometri Yöntemi

4.2.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

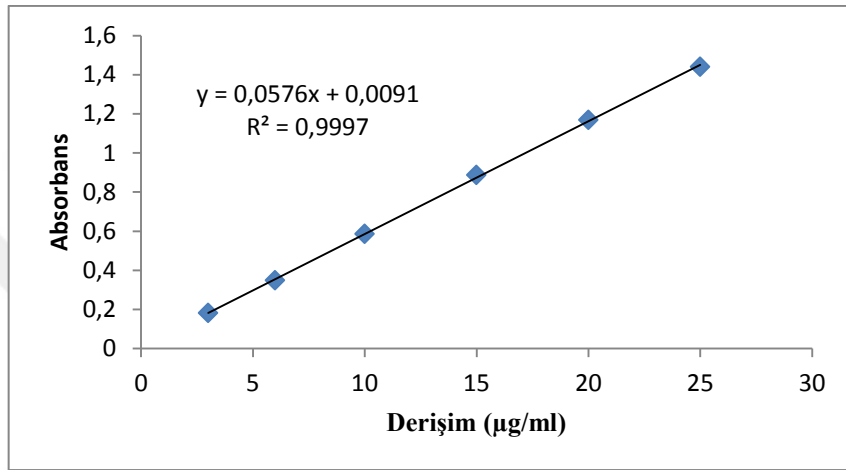
Bosentanın stok çözeltisi 100 µg ml⁻¹ derişimde metanol kullanılarak hazırlandı. Hazırlanan bu stok çözeltinin belirli hacimleri metanol içinde seyreltilerek 3, 6, 10, 15, 20 ve 25 µg ml⁻¹ derişimlerinde standart çalışma çözeltileri ve üç farklı derişimde (4, 12, 24 µg ml⁻¹) kalite kontrol çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin Birinci türev absorpsiyonları 285 nm’de okunarak spektrumları elde edildi (Şekil 4.4).

**Şekil 4.4.** Birinci türev spektrofotometrik çalışmasında bosentanın 3-25 µg ml⁻¹ derişim aralığındaki çözeltilerinin absorpsiyon spektrumu

4.2.2. Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu)

4.2.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi

Bosentanın 3–25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişim aralığında hazırlanan standart çalışma çözeltilerinin derişimlerine karşı 285 nm dalga boyunda okunan birinci derece türev absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile kalibrasyon eğrisi elde edildi ve Şekil 4.5'te verildi.



Şekil 4.5. Birinci türev spektrofotometresi yönteminde elde edilen kalibrasyon eğrisi

Birinci türev spektrofotometri yöntemiyle elde edilen kalibrasyon eğrisinin regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.4'te verildi.

Tablo 4.4. Bosentana ait birinci türev kalibrasyon eğrisi ile ilgili bilgiler

Parametreler	Birinci türev spektrofotometre yöntemi
Dalga Boyu (λ : nm)	285
Doğrusal Aralık ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	3-25
Regrasyon Doğrusu Denklemi	$D_1 = 0.0576x + 0.0091$
S_a	2.73×10^{-4}
S_b	2.81×10^{-3}
Korelasyon katsayısı (r)	0.9998

4.2.2.2. Gözlenebilme Alt Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Bosentanın birinci türev kalibrasyon eğrisinin en küçük değeri olan $3 \mu\text{g ml}^{-1}$ den daha küçük derişimlerde çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerin absorbans değerleri altı kez okundu ve % Bağıl Standart Sapma (% BSS) değerleri belirlendi. % BSS değeri % 10'dan küçük olan değer miktar tayin alt sınırı (LOQ) ve % 20'den küçük olan değer ise gözlenebilme sınırı (LOD) değeri olarak kabul edildi. LOD değeri $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$, LOQ değeri $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ olarak belirlendi.

4.2.2.3. Doğruluk, Kesinlik

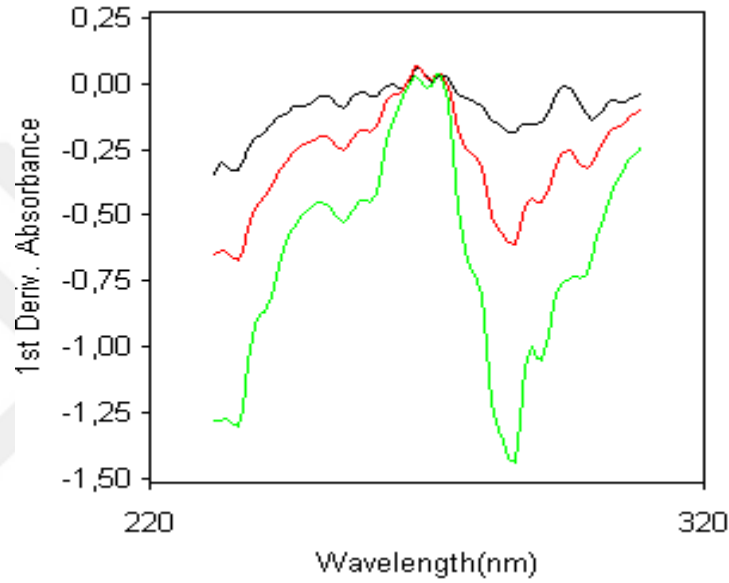
Yöntemin doğruluğu ve kesinliği gün içi ve günler arası yapılan ölçümlerle belirlendi. Kalibrasyon eğrisi içine düşen üç farklı derişimde ($4, 12, 24 \mu\text{g ml}^{-1}$) hazırlanan bosentan çözeltileri için birinci derece türev spektroskopisi yönteminde elde edilen değerlerin ortalaması, standart sapması, bağıl standart sapması ve bağıl hataları gün içi ve günler arası ölçümlerle belirlendi. Doğruluk % Bağıl Hata (% BH), kesinlik ise % Bağıl Standart Sapma (% BSS) ile verildi. Deney sonuçları Tablo 4.5'de verildi.

Tablo 4.5. Birinci türev spektrofotometresi çalışmalarında bosentanın gün-içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk değerleri

Eklenen ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Bulunan Değer ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Gün içi			Günler Arası			
		X±SS ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	% BSS	% BH	Bulunan Değer ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	X±SS ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	% BSS	% BH
4	3.77	3.82±0.048	1.25	-4.5	3.82	3.81±0.032	0,83	-4.75
	3.84							
	3.77							
	3.84							
	3.84							
	3.89							
3.79	3.82							
12	12.27	12.29±0.030	0.25	2.41	23.23	12.15±0.049	0.40	1.25
	12.31							
	12.24							
	12.29							
	12.33							
	12.27							
12.08								
24	23.87	23.87 ±0.013	0.05	-0.54	23.57	23.56±0.051	0.21	-1.83
	23.88							
	23.86							
	23.89							
	23.88							
	23.86							
23.57								
23.58								
23.53								
23.47								
23.62								
23.57								

4.2.2.4. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Bosentan etkin maddesi içeren Tracleer ve Diamond tabletlerinden $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ derişiminde çözeltiler hazırlandı, birinci türev spektrofotometrisi spektrumları alındı ve absorbansları belirlendi. Böylece uygulanan yöntemin farmasötik preparatlarda etkin madde miktar tayininde uygulanabilir geçerli testlere ve yönleme sahip olduğu belirlendi.



Şekil 4.6. Birinci türev spektrofotometrisi çalışmasında bosentan içeren Tracleer tabletinin $6, 14$ ve $24 \mu\text{g ml}^{-1}$ derişimindeki çözeltilerinin absorpsiyon spektrumu

4.2.2.5. Analitik Geri Kazanım

Standart ekleme yöntemi kullanılarak, farmasötik preparatlardan analitik geri kazanım çalışmaları yapıldı. Bosentan etkin maddesi içeren Tracleer ve Diamond tabletten $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ derişimde tablet çözeltileri hazırlandı ve birinci türev absorbansları belirlendi. Tablet çözeltilisine $1, 9$ ve $19 \mu\text{g ml}^{-1}$ derişimde bosentan standart çözeltileri eklendi ve elde edilen son çözeltilerin birinci türev absorbansları belirlendi. Yapılan ölçüm sonuçlarına göre, yüzde analitik geri kazanımı $[\% \text{ GK} = ((\text{toplam değer} - \text{eklenen değer} / \text{tablet çözeltilisi}) \times 100)]$ formülü kullanılarak geri kazanım değerleri hesaplandı. Tabletler için elde edilen sonuçlar Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.6. Birinci türev spektrofotometresi çalışmalarında farmasötik preparattan elde edilen analitik geri kazanım değerleri

Preparat	Eklenen ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Bulunan \pm SS ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Geri Kazanım(%)	BSS %
Tracleer 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$	1	6.03 \pm 0.023	100.6	0.38
	9	13.87 \pm 0.011	97.4	0.07
	19	23.95 \pm 0.010	99.0	0.04
Diamond 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$	1	5.87 \pm 0.012	97.4	0.20
	9	13.75 \pm 0.024	95.0	0.17
	19	23.82 \pm 0.050	96.4	0.20

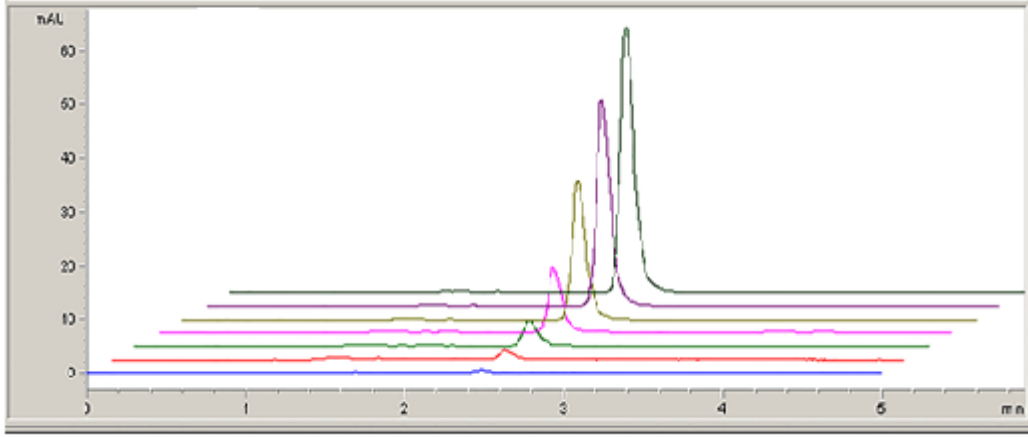
4.3. HPLC Yöntemi

4.3.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yöntemi Geliştirme

Bosentan Actelion Pharmaceuticals'dan (Allschwil, Switzerland) temin edilmiştir. Hareketli faz ve çözeltiler günlük olarak deiyonize su ile hazırlanmış ve sonikatör ile degaze edilmiştir. Bu çalışmada hareketli faz olarak, metanol-asetonitril-su (20:50:30 v/v/v) çözücü karışımları kullanıldı. Ayrıca en iyi ayırım C_{18} (250x4.6 mm, 5 μm) kolonda elde edildi.

4.3.1.1. Standart ve Kalite Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması

Bosentanın 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişimde stok standart çözeltisi metanolde hazırlandı. Bu stok çözeltiden 0.25-20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (0.25, 0.75, 2, 5, 10, 15 ve 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$) derişim aralığında standart çalışma çözeltileri hazırlandı. HPLC metodu için, kalite kontrol çözeltileri bosentanın standart çalışma çözeltisinin alikotları eklenerek son derişimleri 0.3, 9 ve 19 $\mu\text{g ml}^{-1}$ olacak şekilde hazırlandı.

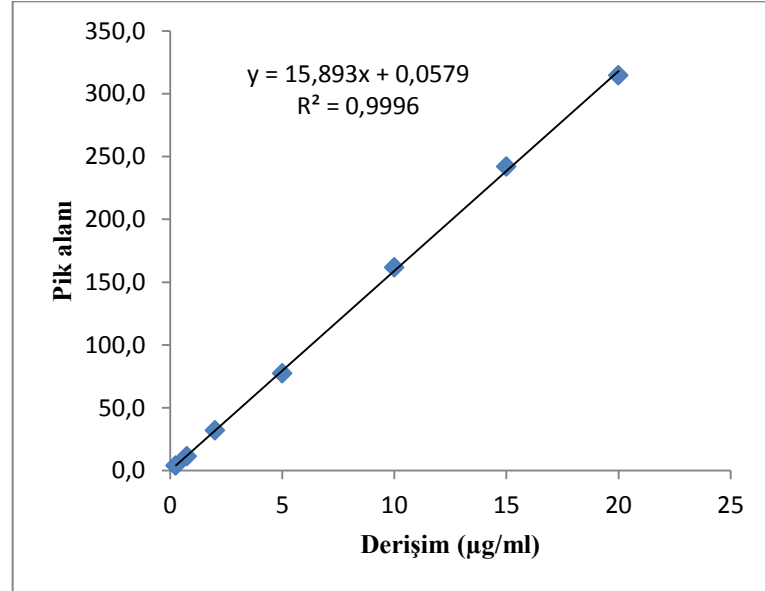


Şekil 4.7. Bosentanın 0.25-20 µg ml⁻¹ derişim aralığındaki kromatogramı

4.3.2. HPLC Yönteminin Geçerlilik Testleri

4.3.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi

Bosentanın standart çözeltileri 0.25–20 µg ml⁻¹ (0.25, 0.75, 2, 5, 10, 15 ve 20 µg ml⁻¹) derişim aralığında hazırlandı. Kalibrasyon eğrisi, bosentan derişimine karşı her numunenin pik alanının çizilmesiyle oluşturulmuştur.



Şekil 4.8. HPLC yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisi

HPLC yöntemiyle elde edilen kalibrasyon eğrisinin regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.7’de verildi.

Tablo 4.7. Bosentanın kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri

Parametreler	HPLC
Dalga Boyu (λ : nm)	272
Doğrusal Aralık ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.25-20
Regrasyon Doğrusu Denklemi	$y = 15.893x + 0.0579$
S_a	1.345
S_b	0.024
Korelasyon katsayısı (r)	0.9998

4.3.2.2. Doğruluk/Kesinlik

Doğruluk test edildi ve bağıl hata olarak değerlendirildi. HPLC yönteminin kesinliği ise hassas tekrarlanabilirliği (gün içi) ve ara madde hassasiyeti (günler arası) ile belirlenmiştir ve ölçümler bağıl standart sapma [B.S.S.%[(standart sapma / ortalama derişimi) x% 100]]olarak ifade edilmiştir.

Tablo 4.8. HPLC çalışmalarında bosentanın gün-içi ve günler-arası kesinlik ve doğruluk değerleri

Eklenen ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Bulunan Değer ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Gün içi			Günler Arası			
		$X \pm SS$ ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	% BSS	% BH	Bulunan Değer ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	$X \pm SS$ ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	% BSS	% BH
3	2.89	2.97 ± 0.08	2.69	-1.00	3.11	2.99 ± 0.11	3.67	-0.33
	3.03				2.88			
	3.09				3.06			
	2.91				3.13			
	3.05				2.90			
	2.97				2.88			
13	12.32	12.96 ± 0.70	5.40	-0.30	3.11	13.31 ± 0.49	3.68	2.38
	12.11				2.88			
	13.45				3.06			
	13.18				3.13			
	13.97				2.90			
	12.75				2.88			
19	18.18	18.78 ± 0.74	3.94	-1.15	19.57	19.17 ± 0.52	0.02	0.89
	18.17				18.58			
	19.45				19.23			
	19.89				18.47			
	18.88				19.62			
	18.16				19.57			

4.3.2.3. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt sınırı (LOQ)

Yöntemin LOD ve LOQ değerleri aynı kromatografik koşullar altında standart çözeltinin yavaş yavaş azalan derişimlerinin analiz edilmesiyle belirlenmiştir. Kromatogramlar da sinyal/gürültü oranının 3 olduğu derişim gözlenebilme sınırı (LOD), 10 olduğu derişim ise miktar tayin alt sınırı (LOQ) olarak belirlendi.

4.3.2.4. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Bosentan etkin maddesi içeren Tracleer ve Diamond tabletlerinin her birinden 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişimlerinde çözeltiler hazırlandı, HPLC yöntemiyle kromatogramları alınarak pik alanları tespit edildi. Böylece uygulanan yöntemin farmasötik preparatlarda etkin madde miktar tayininde uygulanabilir geçerli testlere ve yönteme sahip olduğu belirlendi.

4.3.2.5. Analitik Geri Kazanım

Geri kazanım çalışmaları, standart ekleme yöntemi ile yapıldı ve 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişimde bosentan etkin maddesi içeren Tracleer ve Diamond tablet çözeltisi hazırlandı, kromatogramı alınarak pik alanları tespit edildi. Bu çözeltiler üzerine 1, 11 ve 17 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişimlerde bosentan standart çalışma çözeltileri eklendi, kromatogramları alındı ve herbir çözeltinin pik alanları tespit edildi. Yöntemin yüzde analitik geri kazanımı [% GK= (toplam değer-eklenen değer/tablet çözeltisi) x100] formülü kullanılarak hesaplandı.

Tablo 4.9. Bosentanın (Tracleer 125 mg ve Diamond 125 mg) iki tablet formunun analitik geri kazanım değerleri

Preparat	Eklenen ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Bulunan \pm SS ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Geri Kazanım(%)	BSS %
Tracleer 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$	1	3.02 \pm 0.122	100.7	3.97
	11	12.68 \pm 0.821	99.1	3.26
	17	18.82 \pm 0.351	99.1	1.85
Diamond 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$	1	3.06 \pm 0.060	102.0	1.96
	11	13.21 \pm 0.182	101.6	1.36
	17	18.95 \pm 0.523	99.7	2.74

5. TARTIŞMA

Analitik yöntemlerle, bir maddenin hem kalitatif hem de kantitatif analizi yapılabilir ve madde hakkında bilgi edinilebilir. Bu yöntemler klasik ve enstrümental olmak üzere ikiye ayrılırlar. Enstrümental analiz yöntemlerinin gelişmesi araştırmacıların daha kolay, hızlı ve doğru bilgiye ulaşmalarına olanak sağlamıştır. Doğru ve hassas sonuçlara ulaşmak için araştırmacının hem doğru cihazı hem de tekniği seçmesi gerekir. Bir numunenin analizi için analize başlamadan önce uygun metodun seçilmesi çok önemlidir. Seçilen metod ışığında numuneye gerekli ön hazırlıklar yapılır, uygun yöntemler seçilir ve analiz hakkında en doğru bilgiye ulaşılır. Bir metodun veya ölçüm prosedürünün belirlenen amaçlara uygunluğunun deneysel çalışmalarla elde edilen objektif delillerle doğrulanmasına validasyon denir. Seçilen metodun validasyon çalışmaları yapıp, geçerlilik testlerinin doğruluk, kesinlik, tekrarlanabilirlik, seçicilik, spesifiklik, hassaslık ve analiz süresinin kısa olması gibi parametrelerinin en uygunları çalışma için seçilip, bu yöntemi karşıladığına dikkat edilmelidir.

Bir çalışmaya başlamadan önce iyi bir literatür çalışmasının yapılması oldukça önemlidir. İncelenen çalışmalar araştırmacıya konu hakkında ön hazırlık yapması açısından faydalı olacaktır. Seçeceği yöntemin ve uygulayacağı parametrelerin daha sağlıklı olmasını sağlayacaktır.

Yaptığımız çalışmaya yardımcı olması amacıyla yapılan literatür taraması sonucunda bosentan üzerine çok fazla çalışma olmadığı görülmüştür. Bosentanın yeni keşfedilen ilaçlardan biri olması bunda etkili olmuştur. Fakat bosentan birçok hastalığın tedavisinde kullanılmak için son zamanlarda üzerine çalışmalar yapılan etkin bir maddedir. Çalışmamızda bosentanın standart çalışma çözeltilerinde ve tablet formunda UV Görünür Bölge Spektrofotometresi, Birinci Derece Türev Spektroforometrisi ve HPLC yöntemleri geliştirilip geçerlilik testleri yapılmıştır.

UV Görünür Bölge Spektrofotometresi birçok maddenin kantitatif analizinde yaygın olarak kullanılan bir cihazdır. Ayrıca birçok organik ve inorganik madde ultraviyole-görünür bölgede absorpsiyon yaptığı için avantajlı bir yöntemdir. Bu yöntemin, basit ve hızlı bir şekilde ölçümler yapılabilmesi bir diğer avantajıdır.

Ultraviyole ve görünür bölge spektroskopisi ile maksimum dalga boyunda (λ_{maks}) her derişime karşılık gelen absorbansları okunur ve absorbansa karşı derişim grafiğı (korelasyon grafiğı) çizilir. Yani $A = f(\lambda)$ fonksiyonudur.

Türev absorpsiyon spektrofotometri, alınan türev spektrumlarının yorumlanması ile madde hakkında kalitatif ve kantitatif bilgi veren bir analiz yöntemidir. UV Görünür Bölge absorpsiyon spektrumlarında farklı maddelerin çakışan spektrumları Türev absorpsiyon spektrometri yöntemi ile ayrılmaktadır. Bu üstünlüğünden dolayı UV Görünür Bölge absorpsiyon spektrometresine karşı iyi bir alternatif yöntem olarak ilaç analizlerinde kullanılabilir.

Kromatografi, bir örnek karışımındaki çözülmüş yapıların iki fazda (sabit ve hareketli faz) farklı dağılımlarına dayanan, fiziksel bir ayırma yöntemidir. Kromatografik yöntemler; ilaçlarda, klinik kimya, adli tıp ve biyokimya alanlarında, kozmetik ürünlerinde, gıda analizlerinde, çevre analizlerinde geniş ve verimli bir kullanım alanına sahiptir. HPLC yöntemi ilaç analizlerinde en fazla kullanılan analitik yöntemdir. Spektroskopik, elektroanalitik ve diğer kromatografik yöntemlere göre birçok üstünlüğü vardır. Ayrıca doğruluk, kesinlik, duyarlılık, seçicilik, tekrarlanabilirlik, sonuçların hızlı bir şekilde elde edilmesi diğer yöntemlere göre çok daha iyidir. HPLC nin hassasiyetinin yüksek olması hem farmasötik preparatlarda hem de biyolojik ortamlarda yapılan analizlerde çok büyük bir avantaj sağlamaktadır.

Yapılan literatür taramalarında bosentanın farmasötik preparatlarda analizi için birkaç çalışmaya ulaşılabilmektedir. Bu sebeple çalışmada bosentanın farmasötik

preparatlarda miktar tayini için yeni olan UV-Görünür Bölge Absorbsiyon Spektrofotometri, Birinci Türev Absorbsiyon Spektrofotometri ve HPLC yöntemleri geliştirilip, yöntem geçerlilik testleri yapılmıştır. Yapılan bu çalışmada aşağıda belirtilen veriler elde edilmiştir.

UV-Görünür Bölge Absorbsiyon Spektrofotometri ve Birinci Türev Absorbsiyon spektrofotometri çalışmasında 220-320 nm dalga boyu aralığında yapılan tarama ile spektrumlar alınmıştır. UV-Görünür Bölge için 271 nm de maksimum, Birinci Türev için 285 nm de minimum pik elde edilmiştir (Şekil 4.1 ve Şekil 4.4). UV-Görünür Bölge Absorbsiyon Spektrofotometri yönteminin doğrusal olduğu derişim aralığında (10 - 35 $\mu\text{g ml}^{-1}$) ve Birinci Türev Absorbsiyon spektrofotometri yönteminin doğrusal olduğu derişim aralığında (3 - 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$) bosentan çözeltilerinin derişime karşı absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir.

UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminde, kalibrasyon eğrisinin regresyon analizinden, regresyon doğrusu denklemi $A = 0.0248x - 0.007$ (A: Absorbans, x: derişim) ve korelasyon katsayısı (r) 0.9993, gözlenebilme sınırı (LOD) değeri $1\mu\text{g ml}^{-1}$ ve tayin alt sınırı (LOQ) değeri de $4\mu\text{g ml}^{-1}$ olarak belirlendi. Gün içi ve günler arası kesinlik yüzde bağıl standart sapma (% BSS) ve doğruluk bağıl hata değerleri sırasıyla 0.47 – 2.34' den küçük bulunmuştur.

Birinci Türev Absorbsiyon spektrofotometri yönteminde, kalibrasyon eğrisinin regresyon analizinden, regresyon doğrusu denklemi $D_1 = 0.0576x + 0.0091$ (D_1 : $dA/d\lambda$, x: derişim) ve korelasyon katsayısı (r) 0.9998, gözlenebilme sınırı (LOD) değeri $0.5\mu\text{g ml}^{-1}$ ve tayin alt sınırı (LOQ) değeri de $2\mu\text{g ml}^{-1}$ olarak belirlendi. Gün içi ve günler arası kesinlik yüzde bağıl standart sapma (% BSS) ve doğruluk bağıl hata değerleri sırasıyla 1.25 – 2.41' den küçük bulunmuştur. Geçerlilik testleri yapılan yöntemlerin

bosentan içeren tracler ve diamond tabletlere uygulaması ile geri kazanım değerleri arasında olduğu bulunmuştur.

Bosentanın farmasötik preparatlarda miktar analizi için HPLC-UV yöntemi geliştirilip yöntem geçerlilik testleri yapılmıştır. Çalışmada kullanılan HPLC-UV yöntem şartları; hareketli faz olarak metanol-asetonitril-su (20:50:30 v/v/v) çözücü karışımı, sabit faz olarak ters faz C₁₈ (250x4.6 mm,5µm) kolon, akış hızı 1ml/dak, enjeksiyon hacmi 10 µl ve 272 nm dalga boyunda analizler yapılmıştır.

HPLC-UV ile yapılan analizlerde bosentanın alıkonma zamanı yaklaşık olarak 2.5 dakika olarak belirlenmiştir.

Yöntemin doğrusal olduğu derişim aralığında hazırlanan bosentan çözeltilerinin derişimi ile analiz sonucunda elde edilen piklerin alanları grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Bu yöntemin kalibrasyon eğrisinin regresyon analizinden regrasyon doğru denklemi $y = 15.893x + 0.0579$ (y: pik alanı, x: derişim) ve korelasyon katsayısı $r = 0.9998$ olarak bulunmuştur. Yöntemin LOD değeri 3 ve LOQ değeri 10 olarak belirlenmiştir. Gün içi ve günler arası kesinlik yüzde bağıl standart sapma (% BSS) ve doğruluk bağıl hata değerleri sırasıyla 5.40 – 2.38’ den küçük bulunmuştur. Geçerlilik testleri yapılan yöntemlerin bosentan içeren tracler ve diamond tabletlere uygulaması ile geri kazanım değerleri % 99.1 ile % 102.0 arasında olduğu bulunmuştur.

Geliştirilip, geçerlilik testleri yapılan yöntemlerin kesinlik ve doğruluğunun iyi olduğu, geri kazanım değerlerinin yüksek olduğu bundan dolayı da yöntemlerin rutin kalite kontrol laboratuvarlarında rahatlıkla kullanılabilceği söylenebilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, bosentan etkin maddesinin farmasötik preparatlarda kantitatif analizi için UV-Görünür Bölge Absorbsiyon Spektrofotometri ve Birinci Türev Absorbsiyon spektrofotometri ve HPLC-UV yöntemleri geliştirilip, geçerlilik testleri yapılmıştır.

Bu yöntemlerin hassas, seçici, doğru, kesin ve tekrarlanabilir olmasından dolayı bosentan içeren farmasötik preparatlara uygulanabilir olduğu sonucuna varılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen verilerin ilerleyen çalışmalara yol göstereceği kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Tracleer TM (Bosentan) Product Information. <https://www.tracleer.com>. 20.03.2014.
2. Kayaalp SO. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*, 12. Baskı. Ankara, Pelikan Yayıncılık, 2009:1265-1275.
3. Vatter H, Seifert V. Ambrisentan, a non-peptide endothelin receptor antagonist. *Cardiovascular Drug Reviews*, 2006, 24:63-76.
4. Sarma R.V.S.N. Endotelial dysfunction. www.dr.sarma.in. 16 Ocak 2014.
5. Migneault A, Sauvageau S, Villeneuve L, Thorin E, Fournier A, Leblanc N, Dupuis J. Chronically elevated endothelin levels reduce pulmonary vascular reactivity to nitric oxide. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2005, 171:506-513.
6. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 1988, 332:411-415.
7. Kusumoto K, Awane Y, Fujiwara S, Watanabe T. Role of endogenous endothelin in extension of rabbit myocardial infarction. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 1993, 22:5339-5342.
8. Kiowski W, Lüscher TF, Linder L, Bühler FR. Endothelin-1-induced vasoconstriction in humans: reversal by calcium channel blockade but not by nitrovasodilators or endothelium-derived relaxing factor. *Circulation*, 1991, 83:469-475.
9. Kloog Y, Ambar I, Sokolovsky M, Kochva E, Wollberg Z, Bdolah A. Sarafatoxin a novel vasoconstrictor peptide: Phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain. *Science*, 1988, 242:268.

10. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1989, 86:2863-2867.
11. Yanagisawa M, Masaki T. Molecular biology and biochemistry of endothelins. *Trends in Pharmacological Sciences*, 1989, 10:374-378.
12. Sakurai T, Goto K. Endothelins. *Drugs*, 1993, 46:795-804.
13. Simonson MS, Dunn MJ. Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *The FASEB Journal*, 1990, 4:2989-3000.
14. MacLean MR. Endothelin-1: a mediator of pulmonary hypertension?. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 1998, 11:125-132.
15. Masuda Y, Miyazaki H, Kondoh M, Watanabe H, Yanagisawa M, Masaki T, Murakami K. Two different forms of endothelin receptors in rat lung. *FEBS Letters*, 1989, 257:208-210.
16. Tamirisa P, Frishman WH, Kumar A. Endothelin and endothelin antagonism: roles in cardiovascular health and disease. *American Heart Journal*, 1995, 130:601-610.
17. Masaki T. The discovery of endothelins. *Cardiovascular Research*, 1998, 39:530-533.
18. Gandhi CR, Berkowitz DE, Watkins WD. Endothelins: biochemistry and pathophysiologic actions. *Anesthesiology*, 1994, 80:892.
19. Clozel M, Salloukh H. Role of endothelin in fibrosis and anti-fibrotic potential of bosentan. *Annals of Medicine*, 2005, 37:2-12.
20. Steiner MK, Preston IR. Optimizing endothelin receptor antagonist use in the management of pulmonary arterial hypertension. *Vascular Health and Risk Management*, 2008, 4:943.

21. Yokoyama Y, Tomatsuri M, Hayashi H, Hirai K, Ono Y, Yamada Y, Todoroki K, Toyo'oka T, Yamada H, Itoh K. Simultaneous microdetermination of bosentan, ambrisentan, sildenafil, and tadalafil in plasma using liquid chromatography/tandem mass spectrometry for pediatric patients with pulmonary arterial hypertension. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014, 89:227–232.
22. Lausecker B, Hess B, Fischer G, Mueller M, Hopfgartner G. Simultaneous determination of bosentan and its three major metabolites in various biological matrices and species using narrow bore liquid chromatography with ion spray tandem mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 2000, 749:67–83.
23. Parekh JM, Shah DK, Sanyal M, Yadav M, Shrivastav PS. Development of an spe-ic-ms/ms method for simultaneous quantification of bosentan and its active metabolite hydroxybosentan in human plasma to support a bioequivalence study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2012, 70:462-470.
24. Ganz N, Singrasa M, Nicolas L, Gutierrez M, Dingemans J, Dobelin W, Glinski M. Development and validation of a fully automated online human dried blood spot analysis of bosentan and its metabolites using the sample card and prep dbs system. *Journal of Chromatography B*, 2012, 885:50-60.
25. Atila A, Ozturk M, Kadioglu Y, Halici Z, Turkan D, Yayla M, Un H. Development and validation of uflc–ms/ms method for determination of bosentan in rat plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014, 97:33-38.
26. Lakshmi S, Ravi SV. Development and validation of uv spectroscopic and hptlc methods for the determination of bosentan from tablet dosage form. *Science Academi Journal Pharmacy*, 2014, 3:123-127.

27. Kumar AA, Sankar DG. Development, estimation and validation of bosentan in bulk and in its pharmaceutical formulation by uv-vis spectroscopic method. *International Journal and Pharma Bio Sciences*, 2011, 2:225-230.
28. Khan MA, Sinha S, Todkar M, Parashar V, Swamy K. Development and validation of a stability indicating analytical method for the related substances of bosentan drug substance by hplc. *American Journal of Scientific Industrial Research*, 2012, 3:69-80.
29. Annapurna MM, Pavani S, Anusha S, Harika M. Validated stability indicating rp-hplc method for the determination of bosentan in presence of degradation products. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 2013, 3:4528-4540.
30. Ersöz A, Kani İ, Erdem M, Özcan A, Berber H. *Aletli Analiz Teknikleri*, 1.Baskı. Eskişehir, Anadolu Üniversitesi Basımevi, 2010:279.
31. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Principles of Instrumental Analysis. Çeviri: Köseoğlu F, Kılıç E, Yılmaz E. *Enstrümantal Analiz İlkeleri*, 5.Baskı. Ankara, Bilim Yayıncılık, 1998:116-137.
32. Gündüz T. *Instrumental Analiz*, 9.Baskı. Ankara, Gazi Kitapevi, 2005:1225-1251.
33. Kricka LJ, Park JY. Analytical techniques and instrumentation. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE (eds). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 50th ed. Missouri, Elsevier, 2012:233-257.
34. Sunheimer RL, Threatte GA, Pincus MR, Lifshitz MS. Analysis: Principles of instrumentation. In: McPherson RA, Pincus MR(eds). *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 22nd ed. Philadelphia, Elsevier, 2011:37-63.

35. Onur F, Biryol İ, Yücesoy C, Erk N, Özkan S, Dermiş S, Dinç E, Uslu B, Yılmaz N. *Analitik Kimya Laboratuvar Föyü*. 1.Baskı. Ankara, Ankara Üniversitesi Yayını, 1999:176.
36. Perkampus HH, Grinter HC, Threlfall T. *UV-VIS Spectroscopy and its Applications*, 1st ed. Berlin, Springer-Verlag, 1992:81-88.
37. Hergenç G. Kromatografi/Kütle Spektrometri Tekniği. İçinde: Tietz Klinik Kimyada Temel İlkeler, Aslan D, (Çeviri editörü). *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, Bowers LD, Ullman DM, Burtis CA. 1.Baskı, Ankara, Palme Yayıncılık, 2005:133-150.
38. Genç L. *Kromatografik Sistemler*, 1.Baskı. Eskişehir, Anadolu Üniversitesi Basımevi, 2011:1-9.
39. Türkiye 10. Gıda Kongresi. Süt Teknolojisinde Metot Validasyonu ve Uygulamaları, 2008:749-751.
40. Pasteelnick LA. Analytical methods validation. In: Berry IR, Nash RA(eds). *Pharmaceutical Process Validation*, 2nd. New York, Marcel Dekker, 1993:411-428.
41. Rodriguez LC, Campana AM, Linares CJ, Ceba MR. Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibration experiment. *Analytical Letters*, 1993, 26:1243-1258.
42. Türklab- Kalibrasyon ve Deney Laboratuvarları Derneği. Kimyasal Analizlerde Metod Validasyonu ve Verifikasyonu Rehberi, 2007: 5-30.
43. Söğüt EÖ, Kayalı A. An overview on analytical method validation. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 2005, 34:41-57.
44. Ertas SÖ. Evaluation of the Analytical Validation Parameters of Atomic Absorption Spectrometry. Graduate School of Health Sciences, Analytical Chemistry. Ph. D. Thesis, İzmir: Ege University 1997.

45. Green JM. Peer reviewed: a practical guide to analytical method validation. *Analytical Chemistry*, 1996, 68:305-309.
46. Say R, Uysal ÜD, Şahin M, Diltemiz SE, Özcan A, Ersöz A, Özcan AA, Şahin Y. *Analitik Kimya*, 1.Baskı. Eskişehir, Anadolu Üniversitesi Basımevi, 2009:20-36.
47. İnal BB, Topkaya Ç. Klinik biyokimya laboratuvarlarında akreditasyona geçiş. *İstanbul Tıp Dergisi*, 2010, 2:74-76.



EK 1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Didar TÜRKAN Doğum tarihi: 23.09.1982 Doğum yeri: Tuzluca Medeni hali: Bekar Uyruğu: T.C. Adres: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, 25240 ERZURUM Tel: 0442 342 47 14 Faks: 0442 231 52 01 E-mail: dturkan1@hotmail.com
Eğitim
Lise: Kahramanmaraş Lisesi (1999) Lisans: Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi (2004-2011) Yüksek lisans: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı (2012-2015) Doktora:
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce : Orta derecede (YDS 57.5, Eylül 2015)
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
İlgi Alanları ve Hobiler
Sinema, tarihi yerleri gezmek

EK 2. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Eczacılık Fakültesi Dekanlığı
Etik Alt Kurulu

Sayı : 93722986.12/ 372
Konu: Etik Alt Kurul Kararı

17/12/2013

Sayın: Yrd. Doç. Dr. Alptuğ ATİLA

İlgi: 16.12.2013 tarih ve 1106 sayılı dilekçeniz.

Fakültemiz Alt Etik Kurulunun 17.12.2013 tarihinde almış olduğu 15' nolu karar ile "Bosentan Etkin Maddesinin Farmasötik Preparatlarda Analitik Yöntemlerle Miktar Tayini" başlıklı, yüksek lisans öğrenciniz Didar TÜRKAN ile beraber yürüteceğiniz çalışmanızın etik kurulunuz tarafından kabulüne karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Zühal GÜVENALP
Etik Alt Kurul Başkanı

Toplantı Tarihi: 17.12.2013
Toplantı Sayısı: 5

15-Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Alptuğ ATİLA'nın yürütücülüğünde Analitik Kimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarlarında yürütülecek olan "Bosentan Etkin Maddesinin Farmasötik Preparatlarda Analitik Yöntemlerle Miktar Tayini" başlıklı araştırma çalışması ile ilgili 16.12.2013 tarih ve 1106 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğunun mevcut oybirliği ile kabulüne karar verildi.