

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİMDALI

**ANTİTİROİD BİR İLAÇ OLAN METİMAZOL'ÜN FARMASÖTİK
PREPARATLARDA VE PLAZMADA MİKTAR ANALİZİ**

FATMA KATANALP

**Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU**

Yüksek Lisans Tezi
Erzurum 2006

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

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI**

**ANTİTİROİD BİR İLAÇ OLAN METİMAZOL'ÜN FARMASÖTİK
PREPARATLARDA VE PLAZMADA MİKTAR ANALİZİ**

FATMA KATANALP

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 01/ 09 / 2006
Tezin Sözlü Savunma Tarihi :21 / 09 / 2006
Tez Danışmanı :Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU
Jüri üyesi : Prof. Dr. Yunus KARA
Jüri üyesi : Prof. Dr. Şahin GÜLABOĞLU
Jüri üyesi : Prof. Dr. Yavuz ONGANER
Jüri üyesi : Doç. Dr.H.İnci GÜL

Enstitü Müdürü : Doç. Dr. Adnan TEZEL

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR.....	VII
ÖZET.....	VIII
SUMMARY	X
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Metimazol	6
2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	6
2.1.2. Farmakokinetik Özellikleri	6
2.1.3. Yan Etkileri.....	7
2.1.4. Kullanım Şekli ve Dozu.....	8
2.1.5. Ticari Takdim Şekli	8
2.2. Metimazol ile ilgili Yapılan Çalışmaların Özeti	8
2.3. Spektroskopik Yöntemler	13
2.3.1. Moleküler Absorbans.....	14
2.3.2 . Lambert Beer Kanunundan Sapmalar	17
2.3.3. Ultraviyole Spektrofotometreleri.....	17
2.3.3.1. Tek Işınlı Spektrofotometre	18
2.3.3.2. Çift Işınlı Spektrofotometre	19
2.3.3.3. Işın Kaynağı	20
2.3.3.4. Dalga Boyu Seçici (Monokromatör, filtreler)	20
2.3.3.5. Numune Kabı	20

2.3.3.6. Işın Transduserleri / Dedektörler	21
2.3.4. Uv/Görünür Bölge Spektrofotometre Cihazının Kullanım Amaçları	21
2.3.4.1. Kalitatif Analiz	21
2.3.4.2. Kantitatif Analiz	23
2.4. Türev Spektroskopi.....	23
2.4.1. Türev Spektroskopisi Yönteminin Avantajları ve Dezavantajları	26
2.5. Kromatografik Yöntemler.....	27
2.5.1. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması.....	28
2.5.2. Kromatografide Temel Olan Fiziksel ve Kimyasal Olaylar	29
2.5.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	31
2.5.3.1. Sıvı Kromatografisinin Dayandığı Temel Parametreler	32
2.5.3.1.1. Dağılma (Partisyon) Katsayısı.....	32
2.5.3.1.2. Alıkonma (Retensiyon) Zamanı	33
2.5.3.1.3. Analitin Göç Hızı, Kapasite Faktörü	34
2.5.3.1.4. Seçicilik Faktörü, Farklı Göç Hızları	34
2.5.3.1.5. Kolon Verimi.....	35
2.5.3.1.6. Kolon Performansının Optimizasyonu.....	36
2.5.3.1.7. Kolon Performansına Etki Eden Değişkenler.....	36
2.5.3.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Cihazı	37
2.5.3.2.1. Pompalar.....	37
2.5.3.2.2. Enjektörler	38
2.5.3.2.3. Kolonlar.....	38
2.5.3.2.4. Dedektörler	40
2.5.3.2.4.1. UV-Visible Dedektörler	40

2.5.3.2.4.1.1.Diyod Array Dedektörler.....	41
2.5.3.3. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisinin Uygulama Alanları.....	42
2.5.3.3.1. Saflaştırma.....	42
2.5.3.3.2.Kalitatif Analiz	42
2.5.3.3.3.Kantitatif Analiz	43
2.5.3.3.3.1.Pik Yüksekliğine Dayalı Analizler	43
2.5.3.3.3.2. Pik Alanına Dayalı Analizler.....	44
2.5.3.3.3.3.Standartlarla Kalibrasyon	44
2.5.4. Analitik Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu).....	44
2.5.4.1. Doğruluk, Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik	45
2.5.4.2. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi	46
2.5.4.3. Stabilitate	46
2.5.4.4. Duyarlılık	46
2.5.4.4.1.Tayin Alt Sınırı (Limit of Quantitation:LOQ).....	46
2.5.4.4.2.Gözlenebilme Sınırı (Limit of Dedection:LOD)	47
2.5.4.5. Tutarlılık.....	47
3.MATERYAL VE METOD.....	48
3.1.Kimyasal Maddeler	48
3.2.Cihazlar	48
3.3. Yöntemler ve Uygulamaları.....	49
3.3.1.Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	49
3.3.2.Spektrofotometrik Yöntem Şartları	49
3.3.3. HPLC Kromatografik Yöntem Şartları.....	50
3.4. Plazmadan Ekstraksiyon İşlemi	50

3.5. Biyoanalitik Yöntem Validasyonu	52
3.6. Tabletlerin Hazırlanması.....	52
3.7. Stabilite	52
4.BULGULAR	53
4.1. Metimazol'ün Saflık Kontrolü	53
4.2.UV-Görünür Bölge Spektrofotometri Yöntemi	53
4.2.1. İn-Vitro Çalışması	53
4.2.1.1.Standart Çözeltilerin Hazırlanması ve Spektrumların Alınması	53
4.2.1.2. Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu).....	54
4.2.1.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrileri	54
4.2.1.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ).....	55
4.2.1.2.3. Doğruluk.....	55
4.2.1.2.4. Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik.....	55
4.2.1.2.5. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması.....	56
4.2.2. Plazma Çalışması.....	57
4.2.2.1. Plazma Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	57
4.2.2.2. Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu)	58
4.2.2.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrileri	58
4.2.2.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı(LOQ)	59
4.2.2.2.3. Doğruluk.....	59
4.2.2.2.4. Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik.....	60
4.2.2.2.5.Plazmadan Geri Kazanım.....	60
4.3. Birinci Derece Türev Spektrofotometri Yöntemi	61
4.3.1. İn-Vitro Çalışması	61

4.3.1.2. Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	61
4.3.1.3. Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu).....	62
4.3.1.3.1.Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrileri	62
4.3.1.3.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)	63
4.3.1.3.3.Doğruluk.....	63
4.3.1.3.4. Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik.....	63
4.3.1.3.5. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması.....	64
4.3.2. Plazma Çalışması	65
4.3.2.1. Plazma Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	65
4.3.2.2. Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu).....	66
4.3.2.2.1. Doğrusal Aralık Ve Kalibrasyon Eğrisi	66
4.3.2.2.2.Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)	67
4.3.2.2.3.Doğruluk.....	67
4.3.2.2.4. Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik.....	68
4.3.2.2.5.Plazmadan Geri Kazanım.....	68
4.4. HPLC-DADYöntemi	69
4.4.1. İn Vitro Çalışması.....	69
4.4.1.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	69
4.4.1.2.Yöntem Validasyonu	70
4.4.1.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrileri	70
4.4.1.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı(LOQ)	71
4.4.1.2.3. Doğruluk.....	71
4.4.1.2.4. Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik.....	72
4.4.1.2.5. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması.....	72

4.4.1.2.6.Stabilite	73
4.4.2.Plazma Çalışması.....	74
4.4.2.1.Plazma Standart Çözeltilerin Hazırlanması	74
4.4.2.2. Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu).....	75
4.4.2.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi.....	75
4.4.2.2.2.Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)	76
4.4.2.2.3.Doğruluk.....	76
4.4.2.2.4. Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik.....	77
4.4.2.2.5.Plazmadan Geri Kazanım.....	78
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	79
6. KAYNAKLAR	86
7. EKLER	89
8. ÖZGEÇMİŞ.....	91

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim sonunda yaptığım çalışmaların ürünü olan bu tezin hazırlanmasında katkıları olan;

Çalışmalarımın başından sonuna kadar ilgisini, fikirlerini ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Hocam Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU' na

Çalışmalarımın yönlendirilmesinde katkıda bulunan, ilgisini, yardımlarını esirgemeyen ve etken madde temininde yardımcı olan Sayın Hocam Prof. Dr.Tuncel Özden' e

Çalışmalarım boyunca bana destek olan yardımlarını esirgemeyen Arş.Gör.Fatma DEMİRKAYA'ya ve Arş.Gör.Murat ÖZTÜRK'e

Laboratuvar çalışmalarımı kimyasal madde ve malzeme yönünden destekleyen Atatürk Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fonu Saymanlığına

Ayrıca her zaman bana destek olan ve fedakarlıklarını esirgemeyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

Fatma KATANALP

ÖZET**Antitiroid bir ilaç olan Metimazol'un farmasötik preparatlarda ve plazmada miktar analizi**

Metimazol, hipertiroidizm tedavisinde kullanılan tiyoüre türevi olan antitiroid bir ilaçtır. Farmasötik preparatlarda ve plazmada Metimazol'un analizi için UV-Görünür bölge spektrofotometrisi, 1.türev spektrofotometrisi ve HPLC-DAD yöntemleri geliştirildi ve geçerliliği test edildi. Spektrofotometrik çalışmada optimum koşullar belirlendi. Metimazol, UV-Görünür bölge spektrofotometrisinde 259nm'de maksimum absorpsiyon gösterdi. Gözlenebilme alt sınırı (LOD) değeri $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ve tayin alt sınırı (LOQ) $0.2 \mu\text{g ml}^{-1}$ olarak belirlendi. Gün içi ve günler arası kesinlik değerlerinin yüzde bağıl standart sapması (%RSD) %4'den küçük ve doğruluk değerinin standart sapması da (SD) 0.1'den küçük olduğu tespit edildi. Metimazol Standard çözeltileri insan plazmasına eklendi ve ekstrakte edildi. LOD değeri $0.9 \mu\text{g ml}^{-1}$ ve LOQ değeri $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ olarak belirlendi. Gün içi ve günler arası kesinlik değerlerinin %RSD'si %5'den küçük ve doğruluk değerinin SD'da 0.4'den küçük olduğu tespit edildi. Plazmadan yöntemin geri kazanım değeri %61-87 arasında değiştiği belirlendi. Metimazol 1.türev spektrofotometrisinde 252 nm'de bir maksimum 275 nm'de bir de minimum olmak üzere iki pik verdiği tespit edildi. Kalibrasyon eğrisinin çizimi ve diğer ölçümler 252 nm dalga boyunda yapıldı. LOD değeri $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ve LOQ değeri $0.2 \mu\text{g ml}^{-1}$ olarak belirlendi. Gün içi ve günler arası kesinlik değerlerinin %RSD'si %1.3'den küçük ve doğruluk değerinin SD'da 0.15'den küçük olduğu tespit edildi. Plazma çalışmasında, LOD değeri $0.9 \mu\text{g ml}^{-1}$ ve LOQ değeri $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ olarak belirlendi. Gün içi ve günler arası kesinlik değerlerinin %RSD'si %0.9'dan küçük ve doğruluk değerinin SD'da 0.4'den küçük olduğu tespit edildi. Plazmadan yöntemin geri kazanım değeri %57-85 arasında değiştiği belirlendi. HPLC-DAD yönteminde çalışma parametreleri, ters faz C_{18} ($5\mu\text{m}, 250 \times 4.60\text{mm}$) kolon, metanol+su (40:60 h/h) mobil fazı, değişken kolon sıcaklığı, 1ml/dk akış hızı, 254 nm dalga boyu, $10\mu\text{l}$ enjeksiyon hacmi olarak belirlendi. Standart çözeltiler için, yöntemin LOD değeri $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$ LOQ değeri $0.25 \mu\text{g ml}^{-1}$ ve gün-içi günler-arası kesinlik değerlerinin %RSD'si %2.5'dan küçük ve doğruluk değerinin SD'da 0.2'den küçük olduğu tespit edildi. Plazma çalışmalarında LOD değeri $0.4 \mu\text{g ml}^{-1}$ ve LOQ değeri $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ve gün-içi günler-arası kesinlik değerlerinin %RSD'si %3'den küçük ve doğruluk değerinin SD'da 0.18'den küçük olduğu tespit

edildi. Plazmadan yöntemin geri kazanım değeri %43-57 arasında değiştiği belirlendi. Metimazol'un ticari preparatda (thyromazol) miktar analizi için her üç yöntemin de uygun olduğu, plazmada miktar analizi için ise UV-Görünür bölge spektrofotometrisi ve birinci derece türev spektrofotometrisi yönteminin uygulanabileceği bu çalışmayla gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Metimazol, HPLC, Spektrofotometri, Plazma, Validasyon.

SUMMARY

Quantitative analysis in pharmaceutical preparations and human plasma of the Methimazole which is used as an antithyroid drug.

Metimazol is a thioure derivative medicine which is used in hyperthyroidism treatment. UV-Visible spectrophotometry, first derivative spectrophotometry and HPLC-DAD methods have been developed and validated for determination of Methimazole in pharmaceutical preparation and plasma. Optimum conditions in spectrophotometric study have been determined. Metimazol showed absorption in 259 nm wavelength. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) as $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$ and $0.2 \mu\text{g ml}^{-1}$, respectively. Values of intra-day and inter-day precision were determined as less than relative standard deviation (RSD%) 4% and standard deviation of accuracy value was determined as less than 0.1. Methimazole was spiked into human plasma and extracted. LOD and LOQ values were determined as $0.9 \mu\text{g ml}^{-1}$ and $1 \mu\text{g ml}^{-1}$, respectively. The values of intra-day and inter-day precision were determined as less than RSD% 5 % and less than 0.4 of value of standard deviation of accuracy. The recovery of method from plasma was determined between 61-87%. In first derivative spectrophotometry methods, two peaks were showed as one maximum in 252 nm and one minimum in 275nm. Drawing of the calibration curve and other measurements were made on 252 nm wavelength. LOD and LOQ values were determined as $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$ and $0.2 \mu\text{g ml}^{-1}$, respectively. The values of intra-day and inter-day precision were determined as less than RSD% 1.3% and standard deviation of accuracy value as less than 0.15. In plasma study, LOD and LOQ values were determined as $0.9 \mu\text{g ml}^{-1}$ and $1 \mu\text{g ml}^{-1}$, respectively. The values of intra-day and inter-day precision were determined as less than relative standard deviation (RSD %) 0.9% and less than 0.4 of value of standard deviation of accuracy. The recovery of method from plasma was determined between 57-85%. The study parameters in HPLC-DAD method have been determined as Reversed phase C_{18} ($5\mu\text{m}, 250 \times 4.60\text{mm}$) column, methanol+su (40:60 v/v) as mobile phase, ambient column temperature, flow rate 1ml dk^{-1} , 254 nm wavelength, injection volume $10\mu\text{l}$. For Standard solutions, LOD and LOQ values were determined as $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$ and $0.25 \mu\text{g ml}^{-1}$, respectively. The values of intra-day and inter-day precision were determined as less than relative standard deviation (RSD%) 2.5% and less than 0.2 of value of standard

deviation of accuracy. In plasma study, LOD and LOQ values were determined as $0.4 \mu\text{g ml}^{-1}$ and $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$, respectively. The values of intra-day and inter-day precision were determined as less than RSD% 3% and less than 0.18 of value of standard deviation of accuracy. The recovery of method from plasma was determined as between 43-57 %. In this study, it was shown that three application methods are suitable for the quantitative analysis of Methimazole in commercial preparation (Thyromazol) and also UV-Visible spectrophotometry and first order spectrophotometry methods are suitable for the quantitative analysis of plasma.

Key Words: Methimazole, HPLC, Spectrophotometry, Plasma, Validation

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Hipertiroidizm (tirotoksikoz), tiroid hormonlarının aşırı miktarda salgılanmasına ve dokuların aşırı miktarda hormona maruz kalmasına bağlı bir klinik sendromdur. Seyrek olarak ektoptik dokulardan salgılanma veya aşırı miktarda tiroid hormonunu ilaç olarak alma sonucu ortaya çıkar¹.

Hipertiroidizm'de plazmada ve $T_4:T_3$ oranı değişkendir ve genellikle normalden farklıdır. Eğer T_3 , T_4 ' e oranla belirgin şekilde daha fazla artmışsa bu klinik duruma T_3 tirotoksikozu adı verilir. Bu durumda bazen T_4 düzeyi normal sınırlar içinde olabilir. T_3 tirotoksikozunun, kan hormon düzeyi hariç, diğer semptom ve işareti, tedavi yönünden diğer hipertiroidizm şekillerinden bir farkı yoktur¹.

Hipertiroidizmin başlıca belirtileri bazal metabolizmada yükselme, guvatr, ağırlık kaybı, taşikardi, palpitasyon, aşırı terleme, sıcağa dayanıksızlık, anksiyete, sinirlilik, tremor, güçsüzlük, dispne ve iştah artmasıdır. Graves-Basedow hastalığında onlara ilave olarak retrobulber dokunun infiltrasyonuna bağlı ekzoftalmos ve diğer oftalmolojik bozukluklar ile seyrek olarak infiltratif cilt bozuklukları görülür¹.

Hipertiroidizm tedavisinde antitroid ilaçlar kullanılmaktadır. Antitroid ilaçlar, tiroid folikül hücrelerinde hormon sentezi ile ilgili olan ve hormon biyosentezini inhibe eden ilaçlardır. Bu ilaçların önemli bir bölümü tiyoüre türevi ilaçlardır. Başlıca Metimazol, Karbimazol ve propiltiyoürasil olmak üzere üç tip tiyoüre türevi ilacı vardır.

Tiyoüre türevi ilaçlar başlıca üç mekanizma ile tiroksin ve triiyodotironin sentezini inhibe ederler^{1,2}.

1.Tiroid hücresine giren iyodürün orada iyoda oksidlenmesini ve tirozine bağlanması inhibe ederler.

2. DİT'in diğerk bir DİT (diiodotirozil) veya MİT (monoiyodotirozil) molekülü ile birleşmesini inhibe ederler.

3. Tiroid dışında monodeiyodinyasyonla tiroksinin daha etkin olan triiyodotironine dönüşümünü azaltırlar. 5'-deiyodinaz enzimini inhibe ederler.

Tiyoüre türevleri vücutta total vücut sıvılarının hacmine yaklaşan geniş bir hacimde dağılırlar. Tiroid bezi içinde birikirler. Tiroid bezinde ve karaciğerde kükürt yerine oksijen gelmesi (transsülfürasyon) suretiyle metabolize edilirler. Plasentayı geçerler ve fõtusta guvatr oluşturabilirler. Süt içinde itrah edilirler ve bu ilaçları alan annelerin sütü ile beslenen bebeklerde guvatr meydana gelebilir.

Metimazol, tiroid bezinin oluşumunu inhibe eden, tiroid bezi tarafından salgılanan tiroksin hormonunun üretilmesiyle ortaya çıkan hipertiroidizm tedavisinde kullanılan, tiyoüre türevi olan bir antitiroid ilaçtır^{1,3}.

Metimazol ile ilgili yapılan literatür taramasında plazma ve ticari preparatlarda miktar tayinine yönelik çalışmalara ulaşılmıştır⁴⁻⁹. Aynı zamanda literatür taramasında Metimazol paladyumla türevlendirilerek UV-Görünür Bölge Spektrofotometrisi yöntemiyle idrarda miktar analizine yönelik bir çalışma tespit edildi¹⁰. Metimazol'ü türevlendirme yapılmaksızın UV- Görünür Bölge Spektrofotometrisi ve Türev Spektroskopisi ile miktar analizine yönelik bir çalışmaya rastlanamadı. Bu literatür araştırma bilgilerinden yararlanarak antitiroid bir ilaç olan Metimazol'ün türevlendirme yapılmaksızın direk olarak hem farmasötik preparatlarda hem de plazmada miktar analizine yönelik UV-Görünür bölge spektrofotometrisi ve Birinci türev spektrofotometrisi yöntemlerinin geliştirip geçerlilik testlerinin (valide) yapılması, bu yöntemlere alternatif bir yöntem olarak ta Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) yönteminin geçerlilik testlerinin yapılarak uygulanması, yöntemlerin

doğrusallık, doğruluk, kesinlik, duyarlılık ve stabilite gibi parametreler yönünden geçerlilik testlerinin (validasyonu) yapılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

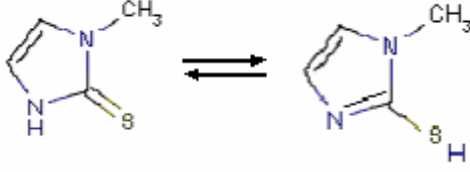
Tiroid hormonlarının aşırı miktarda salgılanması ve dokuların aşırı miktarda hormona maruz kalmasına bağlı olarak hipertiroidizm hastalığı ortaya çıkmaktadır. Ayrıca trioid hormonunun ektoptik dokulardan aşırı miktarda salgılanması veya ilaç olarak aşırı miktarda alınması sonucunda da bu hastalık ortaya çıkmaktadır¹. Hipertiroidizm, difüz toksik guvatr, toksik multinodüler guvatr, aşırı çalışan tek nodül ve aşırı –salgılayan tiroid gibi çeşitli şekillerde olur. Hipertiroidizmin en sık görülen şekli, Avrupa’da Basedow hastalığı ve Anglosakson ülkelerinde Graves hastalığı diye adlandırılan difüz toksik guvatr (Graves- Basedow hastalığı) dir. Kadınlarda, erkeklere göre yaklaşık 6 kez daha sık görülür. Bu hastalıkta hipertiroidizme ilave olarak infiltratif oftalmopati ve dermatopati de (pretibial miksödem) vardır. Oftalmopatinin oto-immün bir hastalık olduğu genellikle kabul edilir; fakat hipertiroidizmin tamamlayıcı parçası mı, yoksa ayrı bir antite mi olduğu belli değildir. Graves-Basedow hastalığında ve daha seyrek olarak toksik multinodüler guvatr olgularında, tirotoksikozun şiddetlenmesine bağlı tiroid krizi veya tiroid fırtınası denilen akut acil bir tablo ortaya çıkabilir. Tiroid kanseri de hipertiroidizm hastalığının durumuna göre oluşur.

Graves-Basedow hastalığı otoimmün nitelikli bir hastalıktır. Tiroid folikül hücrelerinin membranlarındaki bazı kritik makromoleküllere (TSH reseptörleri ve onun çevresindeki diğer makromoleküllere) karşı aşırı miktarda antikor oluşturur. Bunlar IgG sınıfı immünoglobülinlerdir; tiroid stimüle edici immünoglobülinler (TSİ) diye adlandırılırlar ve olguların yaklaşık % 80’inde plazmada bulunurlar. Etkinlikleri bakımından çeşitli türleri vardır. Bunların kaynağının tiroid bezi içindeki lenfositler olduğu sanılmaktadır. Sözkonusu hastalıkta olguların yaklaşık % 50’sinde plazmada

varolduğu gösterilen uzun etkili tiroid stimulatörü (LATS, long-acting thyroid stimulator) adlı madde, bu spesifik antikorların bir türüdür. Benzer nitelikte ve belki de kısmen aynı olması muhtemel bulunan, fakat farklı test sistemlerinde incelendikleri için ayrı adlar alan verilen diğer aktif IgG türleri, LATS-protector (LATS'a karşı tiroid hücre membranını koruyucu faktör) ve TSH-displacing antibody (membrana TSH-bağlanmasını inhibe edici antikor)'dur. Bu patolojik faktörlerin önemli bir özelliği, tiroid hücre membranı üzerinde TSH'ye özgü reseptörleri aktive ederek tiroid hücresinde hormon sentezini ve salgılanmasını aşırı derecede stimüle etmeleridir; böylece TSH'yi taklit ederler. Bu faktörlere bağlı stimülasyon, salgılanan T₃ ve T₄ tarafından feedback inhibisyonla frenlenmez; fakat tiroid hormonları sözkonusu hastalıkta hipofiz ön lobundan TSH salgılanmasını normalde olduğu gibi inhibe etmekte devam ederler. Graves-Basedow hastalığında tiroide hormon sentez ve salgılanması hipotalamik-pitüviter eksenin kontrolünden kurtulmuştur. Bu nedenle tiroiddeki hiperaktivite, TSH tarafından değil, TSI'ler tarafından sürdürülür. Oftalmopati olgularda yukarıdakilerden farklı ve retro-orbital antijene bağlanan özel bir oftalmopatik immünoglobülin G'nin plazmada varlığı gösterilmiştir^{1,2}.

Karbimazol ile Graves-Basedow olgularında yapılan yeni incelemeler, bu ilacın tiroid bezindeki lenfositlerde tiroid antikorlarının oluşumunu inhibe etmesi olasılığının bulunduğunu göstermiştir. Tiroidi stimüle eden bu antikorların azalması Karbimazol (daha doğrusu vücutta ondan oluşan Metimazol) ve belki de diğer tiyoüre türevlerinin antitiroid etkinliklerine katkıda bulunabilir¹.

2.1. Metimazol



Şekil 2.1: Metimazol'ün molekül yapısı

2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Metimazol, 2H-İmidazole-2-thione, 1,3-dihidro-1-metil-1-Metylimidazole-2-thiol yapısında olup kapalı formülü $C_4H_6N_2S$ şeklindedir^{11,12}.

Metimazol keskin karakteristik kokusu ve acı bir tadı ile beyaz ,renksiz, parlak, toz kristaller halinde bulunan bir maddedir¹¹.

Çözünürlüğü : Suda 1:5 oranında, alkolde 1:5 oranında ve kloroformun yaklaşık 1:5 oranında çözünür. Asetonda serbestçe çözünür. Eterde az bir şekilde çözünür.

Molekül ağırlığı: 114,2 g/mol

Erime noktası : 144-147 °C

Depolama : Hava geçirmeyen kontaminantlarda muhafaza edilmelidir. Işıktan korunmalıdır.

2.1.2. Farmakokinetik Özellikleri

Metimazol hipertiroidizm tedavisinde kullanılan üç tiyoüre türevinden (propiltiyourasil, Karbimazol, Metimazol) biridir¹³. Bu ilaçlar ağız yolundan alınır ve mide-barsak kanalından tamamiyle absorbe edilirler. Metimazol 60 dakikadan daha az bir sürede absorbe edilir, fakat eliminasyonu daha yavaştır. Plazmada eliminasyon yarılanma ömrü 6 saat kadardır; etkisi propiltiyourasile oranla daha uzun (8saat kadar)

sürer. Agranülositoz yapma potansiyeli propiltiyourasilinkinden daha düşüktür. Karbimazol bir ön ilaçtır ve vücutta hidrolizle Metimazol'e dönüşmek suretiyle etkinlik kazanır.

2.1.3.Yan etkileri

Tiyoure türevlerinin en sık görülen yan etkileri ciltte döküntüler, böbrek iltihabı, karaciğer sirozu, alerjiler, ateşli farenjit, ilaç ateşi ve agranülositozdur^{1,3}. Bunlardan en ciddi olanı agranülositozdur ve bu ilaçları alanlarda %1' e yakın oranda görülür. Agranülositoz, anjin ve ateş yükselmesi ile başlar; hastaya, bu belirtiler ortaya çıkarsa derhal doktora başvurması tavsiye edilir. Böyle durumda ilaç kesilir, glukokortikoid ve antibakteriyel ilaçlarla tedavi yapılır. Agranülositoz insidensi yaşlı hastalarda yükselir; bir incelemede sözkonusu ilaçlara bağlı agranülositoz riskinin 40 yaşın üstündeki hastalarda bu yaşın altındakilere göre yaklaşık 6 kez daha yüksek olduğu belirtilmektedir.

Söz konusu ilaçlar sık olarak granülositopeni yaparlar. Granülositopeni hipertiroidizmin de bir belirtisi olduğu için böyle bir durum saptandığında bunun mutlaka ilacın kemik iliğini deprese etmesine bağlı olması gerekmez. Tedavi sırasında belirli intervallerle granülosit sayımı yapılır; bu hücrelerin sayısında devamlı artan bir azalma granülositopeninin ilaca bağlı olduğunu gösterir. Bazı olgularda granülositopeni, agranülositoza dönüşür ve onun habercisidir¹.

Seyrek görülen yan etkileri arasında artriti taklit eden eklem ağrıları, myalji, nörit, kolestatik sarılık, saç ağarması, trombositopeni, lenf düğümü ve tükürük bezlerinin şişmesi ve toksik psikoz gibi belirtiler de bulunur¹.

Tiyöüre türevi ilaçlarla tedavi sırasında; hipertiroidizimli hastaların bir kısmında guvatrın büyümeğe başlaması sonucu, trakea üzerindeki mekanik baskı belirgin hale gelir ve solunum zorluğuna neden olabilir. Tiroiddeki büyümeğe önlemek için böyle olgularda ya tiyöüre türevi ilaçlarla tedaviden vazgeçilir veya tiyöüre türevi ilaçlarla birlikte tiroid hormonu verilir.

2.1.4.Kullanım Şekli ve Dozu

Metimazol, hastalığın ağırlığına göre günde 15-60 mg arasındaki dozlarda verilir ve bu doza hasta ötiroid olana kadar, genellikle 4-8 hafta devam edilir. Sonra doz aşamalı olarak azaltılarak günlük idame dozu olan 5-15 mg' a inilir. Tedavi genellikle 18 ay uygulanır. Çocuklarda başlangıç dozu günde 0.4 mg/kg, idame dozu bunun yarısıdır. Deri döküntüleri sık görülür ve bu durumda propiltiourasil ile tedavi sürdürülür. Diğer bir seçenek Metimazol'ü kesmeden döküntülerin ve kaşıntının antihistaminiklerle tedavi edilmesidir. Ancak, agranülositoz komplikasyonu nedeniyle boğaz ağrısı olduğunda hastalara hemen hekime bildirmesi öğütlenmelidir².

2.1.5. Ticari Takdim Şekli

Thyromazol	(Abdi İbrahim)	tablet	5mg
------------	----------------	--------	-----

2.2. Metimazol ile ilgili Yapılan Çalışmaların Özeti

Aslanoğlu ve ark.³; pH: 7.2 de 0.1 M Tris-HCL tamponunda Kare Dalga Voltametrisi (SWV) ve alkali ortamda 10-500 µmol derişim aralığında Metimazol'ün iyot ile reaksiyonunun potansiyometrik titrasyon ile miktar analizini incelemişlerdir. Potansiyometrik titrasyon yönteminde 0.75-1.25 M NaOH derişim aralığı içerisinde

oluşan reaksiyonun stokiyometrik oranını belirlemişlerdir. Kare Dalga Voltametrisi (SWV) yöntemin 1-700 $\mu\text{mol/l}$ derişim aralığında doğrusal olduğunu belirlemiş ve kalibrasyon eğrisini elde etmişlerdir. Metimazol'un tayin edilebilir en düşük derişimi 0.5 $\mu\text{mol/l}$ olarak tespit etmişlerdir. Potansiyometrik titrasyon yöntemi ve SWV yönteminde Thyromazol tabletinin bağıl standart sapması (RSD) değerini sırasıyla % 0.81 ve %2.89 olarak, geri kazanım değerini de sırasıyla %99.2 ve %96.8 olarak tespit etmişlerdir.

Aletrari ve ark.⁴; Karbimazol Tabletlerde Metimazol'un tayini için iki yöntem kullanmışlar. Bunların birincisi, British Pharmacopoeia 1993 (BP'93) de bildirilen TLC yöntemi, ikincisi de BP' Addendum 1997'de BP komisyon tarafından önerilen TLC yöntemini biraz değiştirerek uyguladıkları yöntem. Uyguladıkları iki yöntem arasındaki fark, kloroform yerine diklormetan çözücü olarak kullanılmış ve 10 μl Metimazol çözeltisi yerine 20 μl Karbimazol çözeltisi TLC tabakasında kullanılmış ve lekelerin belirlenmesinde renklendirilme yapılmaksızın UV lambası altında belirlenme işlemi yapılmış. Ayrıca Aletrari ve arkadaşları Karbimazol tabletler içerisinde kullandıkları yöntemlere alternatif bir yöntem olarak da HPLC yöntemini de denemişlerdir.

Hollosi ve ark.⁵ ; katı faz ekstraksiyon tekniği kullanılarak zebra balığının tüm vücut homojenatlarında Metimazol (MET) ile onun metaboliti olan N-metilidantoin (MEH) ve 2-merkaptimidazol (SHMET) bileşiklerinin miktar analizi için UV dedektörlü HPLC yöntemini uygulamışlardır. Katı faz ekstraksiyonda, ters faz ayırma temel prensibine göre bir difonksiyonele bağılı silika gradient elüsyon kolonu kullanmışlardır. Yöntemin 0.1-30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişim aralığında doğrusal olduğu, bileşiklerin alıkonma faktörlerinin 1.53 ile 5.66 arasında değiştiiği, MET ve SHMET bileşiklerinin tayin sınırı için 0.4ng, MTU bileşiiği için 0.6ng ve MEH bileşiiği için de

2.6 ng olarak tespit edilmiştir. Ekstraksiyon yönteminin geri kazanım değerleri % 85.2 ile 97.6 arasında elde edilmiştir.

Skellern ve ark.⁶; plazmada Karbimazol ve Metimazol'un belirlenmesi için bir HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Yöntemde, internal standart olarak benzamid, 10 μ m silikayla kaplı kuru kolon, %2 metanol içeren kloroform ile %1 metanol içeren kloroform mobil fazı ve 1.2 ml dak⁻¹ akış hızı kullanmışlar ve 0.2-1.4 μ g ml⁻¹ derişim aralığında doğrusallık sağlanmıştır. Alıkonma zamanları Karbimazol için 0.5 dak, Metimazol için 4.0 dak ve benzamid 6.0 dak olarak tespit edilmiştir.

Bending ve ark.⁷; Metimazol ve Karbimazol plazmadan kloroform ile ekstrakte edildikten sonra Termoyonik Azot-Fosfor dedektörlü Gaz-Sıvı kromatografisi yöntemiyle analizleri gerçekleştirilmiştir. Internal standart olarak S-Etil Metimazol ve metanolde hazırlanmış 6-Hidroksi Pridazin-3(2H) kullanılmış. Fırın sıcaklığı 195°C, enjeksiyon sıcaklığı 300°C, dedektör sıcaklığı 250°C, taşıyıcı gaz olarak 40ml/dk. akış hızında He, dedektör gazı olarak H₂ ve Hava 2ml/dk koşullarında çalışma yürütülmüştür. Metimazol'un LOD değeri 0.1 μ g ml⁻¹ olarak bulunmuştur.

Floberg ve ark.⁸; benzil klorür ile pentaflorobenzil bromür bileşikleri kullanılarak ekstraktif alkilasyon işlemi sonrasında plazmadan ekstraksiyon sonucunda Metimazol miktar analizi gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Döteryumlu Metimazol de internal standart olarak kullanılmıştır.

Moretti ve ark.⁹; sığır plazmasında Metimazol, pentiltiyourasil, propiltiyourasil, metiltiyourasil ve tiourasilin bileşiklerinin etilasetat çözücüsü ile sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildikten sonra miktar analizi UV dedektörlü ters faz HPLC yöntemini kullanarak gerçekleştirmişleridir. Metimazol 258 nm dalga boyunda, pentiltiyourasil, propiltiyourasil, metiltiyourasil ve tiourasil bileşikleride 276 nm dalga boyunda

maksimum absorbans gösterdiği tespit edilmiş ve analizler bu dalga boylarında gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda metiltiyourasil verilmiş genç boğaların plazmalarında geliştirilen yöntem ile miktar analizinin yapılabileceği de gösterilmiştir.

Sánchez ve ark.¹⁰; Metimazol ya da Karbimazol miktar analizi 325 nm dalga boyunda spektrofotometrik dedeksiyonlu bir akış-enjeksiyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu işlem, bu antitiroid ilaçlar ve 0.5M HCl de Pd(II) arasındaki reaksiyon sonucunda sarı renkli komplekslerin oluşumu esasına dayanarak gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda geliştirilmiş yöntem farmasötik preparatlarda Metimazol ya da Karbimazol ile insan idrarına eklenen Metimazol analizi için uygulanmıştır.

Bir başka çalışmada, bir ağız yolundan alınmada, iki intra venüz olarak verilmede, üç olarakta pluronik ve lecitin içeren pluronik lesitin organik (PLO) jelinin transdermal olarak verilmesinde sağlıklı kedilere Metimazol'un biyoyararlanım çalışması gerçekleştirmişler¹⁴. Serum biyoyararlanım çalışmasını gerçekleştirirken miktar analizi de HPLC yöntemini kullanmışlar ve kan numuneleri 0, 5, 15, 30, 60 dakika ile 2, 4, 6, 12, 24 saatte alınmıştır. Transdermal olarak verilen Metimazol'un absorpsiyonunun zayıf ve değişken olduğu, sadece altı kediden ikisinde tayin edilebilir derişimlerde olduğu belirtilmektedir. Çalışmada her üç verilme şekline göre kinetik parametreler elde edilmiştir.

Economou ve ark.¹⁵; ilaçlarda Metimazol ve Karbimazol miktar analizi için katalizör olarak Cu(II) iyonun kullanıldığı luminol ve H₂O₂ arasındaki kemilüminesans (CL) reaksiyona göre Metimazol ve Karbimazol'un inhibisyonu esasına göre indirekt akış-enjeksiyon yöntemini geliştirmişlerdir. Bu yöntemde Metimazol'un 2-100 mg l⁻¹ derişim aralığında ve Karbimazol'un de 3-120 mg l⁻¹ derişim aralığında doğrusal ve 50

mg l⁻¹ derişimdeki Karbimazol ve Metimazol'ün bağıl satandart sapmasının sırasıyla %2.1 ve %1.9 olduğu belirlenmiştir. %100± 4 geri kazanımla yöntemin farmasötik formülasyonlarda Metimazol ve Karbimazol'ün analizi için uygulanabileceği gösterilmiştir.

Sun ve ark.¹⁶; karbon fiber mikro disk elektrot(CFE) bağlantılı elektrokimyasal dedektörlü kapiler elektroforez (CE-EC) yöntemi ile Metimazol'ün analizi gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde Metimazol'ün belirlenmesine ayırma voltajı kadar enjeksiyon süresinin, fosfat tamponunun pH değeri, derişim ve dedeksiyon potansiyelinin etkisi araştırılmıştır. Dedeksiyon potansiyeli 1.30 V, 10 mmol/l derişiminde fosfat tamponu (pH:7.0), 20 cm yükseklikte 30 s enjeksiyon süresi, 15 kV ayırma voltajı, 0.9995 korelasyon sabitli 1.0 x10⁻⁷ - 2.0 x10⁻⁴ M derişim aralığında doğrusal olacak şekilde çalışma koşulları optimize edilmiştir. LOD (S/N=3) değeri 5.0x10⁻⁸ M olarak bulunmuştur. Daha sonra geliştirilen yöntem insan idrarında ve tabletlerde Metimazol analizine de uygulanmıştır.

Propiltiourasil (PTU) plesantadan serbest olarak Metimazol'den daha az geçtiğine inanılır. Bu sebeplede hamilelerin hipertirodizim tedavisinde bu ilaç kullanılmaktadır. Mortimer ve arkadaşları bu bilginin doğruluğunu araştırmak için klinik bir çalışma tasarlamışlardır. Çalışmalarında iki farklı derişimde hazırladıkları Propiltiourasil ve Metimazol'ün izole edilmiş Perfused Human Term Plasental Lobuldan geçip geçmediğini incelemişlerdir. Her iki bileşiğin miktar analizinde GC-MS yöntemini kullanmışlar ve çalışma sonucunda yaklaşık iki saat sonra her iki bileşiğinde eşit miktarlarda geçtiği belirlenmiştir. Bu çalışmayı gerçekleştirirken her iki bileşiğin plasentalden taşınma kinetiği de tespit edilmiřtir¹⁷.

2.3.Spektroskopik Yöntemler

Spektroskopik yöntemler; inorganik ve organik bileşiklerin kalitatif, kantitatif analizlerinde, asit-baz denge sabitlerinin ve molekül yapılarının aydınlatılmasında oldukça yaygın bir şekilde kullanılan, atomik ve moleküler spektroskopiye dayanan bir analitik yöntemler grubudur.

Spektroskopi kavramı ilk zamanlar ışığın (görünür ışığın) dalga boylarına ayrılıp spektrumlarının elde edilmesi ile uğraşan bilim dalı olarak tanımlanırken; günümüzde ise elektromagnetik ışımının, madde ile etkileşmesini inceleyen bilim dalı olarak tanımlanmaktadır. Elektromagnetik ışımaya uzayda çok büyük bir hızla hareket eden dalga ve parçacık yapısında bulunan bir enerji şeklidir. Öteki enerjilerde olduğu gibi bu enerjinin de çeşitli şekilleri vardır. Bunlardan en çok bilinenleri ışık, ısı, radyo dalgaları ve X-ışınlarıdır. Işımanın madde (atom ya da moleküller) tarafından soğurulması veya yayılması incelenirse sırasıyla, soğurma (absorpsiyon) veya yayılma (emisyon) spektroskopileri olarak adlandırılır. Elektromagnetik ışımının moleküller tarafından soğurulması moleküldeki atomların türüne, düzenlenmesine, moleküllerin şekline, büyüklüğüne vb. bağlı olduğundan spektroskopik yöntemler maddelerin yapılarının ve stereokimyasal özelliklerinin bulunması, tanınması ve saflık kontrolü v.b. gibi çok geniş bir alanda uygulanmaktadır. Bunun için madde üzerine dalga boyu 110 nm den 3000 nm ye kadar değişen ışınlar düşürülür. Bütün bu dalga boylarını verecek ve hangi dalga boylarının absorplandığını tespit edecek tek bir cihaz yapmak mümkün olmadığından, belirli dalga boyları arasında çalışan cihazlar geliştirilmiştir. 110-1000 nm dalga boylarındaki ışınlarla çalışan cihazlara ultraviyole ve görünür alan, 2500-25000 nm dalga boylarında çalışan cihazlara infrared ve dalga boyları yüzlerce metreye kadar değişen radyo dalgalarıyla çalışan cihazlara da nükleer magnetik rezonans cihazları

denir. Bu cihazların geçerli oldukları alan spektroskopilerine de sırasıyla Ultraviyole ve Görünür (UV-Visible), İnfrared (IR titreşim) ve Nükleer Magnetik Rezonans (NMR) spektroskopileri adı verilir¹⁸⁻²¹.

Analitik amaçlar için önemli spektral bölgelerin dalga boyu ve dalga sayısı aralıkları, her aralık için ilgili spektroskopik yöntemler ve spektroskopik tekniklerin esası olan atomik ve moleküler kuantum geçişi tipleri Tablo 2-1 de gösterilmektedir.

Tablo 2-1: Elektromagnetik ışımalara dayalı yaygın spektroskopik yöntemler

Spektroskopi tipi	Dalgaboyu aralığı	Dalgasayısı aralığı cm^{-1}	Kuantumgeçişinin tipi
γ -ışını emisyonu	0.005-1.4 Å	Nükleer
X-ışını absorpsiyonu, emisyonu, floresansı, difraksiyonu	0.1-100 Å	İçenerji seviyesindeki elektronlar
Vakum ultraviyole absorpsiyonu	10-180 nm	1×10^6 - 5×10^4	Bağ elektronları
Ultraviyole görünür bölge absorpsiyonu, emisyonu ve floresansı	180-780 nm	5×10^4 - 1.3×10^4	Bağ elektronları
İnfrared absorpsiyonu ve raman saçılması	0.78-300 μm	1.3×10^6 - 3.3×10^1	Moleküllerin titreşim ve dönmeleri
Mikrodalga absorpsiyonu	0.75-3.75mm	13-27	Moleküllerin dönmeleri
Elektron spin rezonans	3 cm	0.33	Magnetikalanda elektron spini
Nükleer magnetik rezonans	0.6-10 m	1.7×10^{-2} - 5×10^3	Magnetik alanda çekirdeklerin spini

2.3.1. Moleküler Absorbans

Çeşitli dalga boylarında ışın içeren bir demet, saydam veya şeffaf bir ortamdan geçirilirse, içinden bazı dalga boylarının kaybolduğu görülür. Buna ışının absorplanması denir. Absorpsiyonla ışın enerjisi, maddenin iyon, atom veya moleküllerine aktarılır. Böyle ışın enerjisini absorplamış olan iyon, atom veya moleküller uyarılmış hale

geçerler. Uyarılmış atom veya molekül 10^{-8} saniye kadar yaşayabilir. Sonra absorpladığı ışın enerjisini geri vererek tekrar eski haline veya temel haline döner. Madde tarafından absorplanan ışın enerjisinin geri verilmesi, genellikle ısı şeklinde olur ve madde az çok ısınır. Bazı maddelerde ise absorplanan ışın enerjisi daha uzun dalga boylu ışınlar halinde yayınlanır. Buna fotoluminesans olayı denir. Bu olayın çok kısa süreli olanına floresans, daha uzun süreli olanına fosforesans adı verilir.

Moleküller, UV, görünür ve infrared ışınları ile uyarıldıkları zaman kuantlaşmış 3 tip geçiş vardır. Bunlar elektronik geçişler ve ışın ile oluşturulabilen titreşim ve dönme geçişleridir. Bir moleküldeki toplam enerji

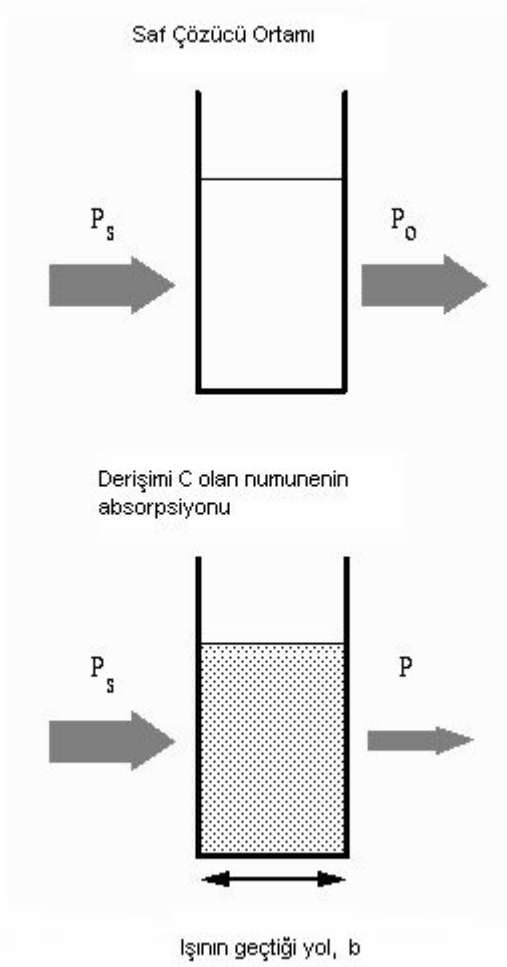
$$E_T = E_{\text{elektronik}} + E_{\text{titreşim}} + E_{\text{dönme}}$$

Elektronik geçiş enerjisi; molekülün çeşitli dış orbitallerindeki elektronlarla ilişkin enerji, titreşim enerjisi; atomlar arası titreşimlere ilişkin enerji, dönme enerjisi ise molekül ağırlık merkezi etrafında dönmesine ilişkin enerjidir. Titreşim ve dönme geçişleri çok atomlu moleküller için geçerlidir^{18,19}.

Bir madde çözeltisinden polikromatik bir ışın demeti geçirilirse, demette bulunan bazı ışınlar madde tarafından absorplanır ve ışın demeti çözeltilen şiddetinden bir miktar kaybederek çıkar¹⁸⁻²¹ (Şekil 2.2). Bunun sonucu çözeltiliye P_s şiddetinde giren ışın demeti, çözeltiliyi P şiddetinde terk eder. Başka bir deyişle çözeltiliden geçen ışın demetinin şiddeti P_s dan P 'ye düşmüş olur. Buna göre ışın demetinin çözeltiliden geçme oranı P / P_s olur. Bu orana geçirgenlik (T) denir ve geçirgenlik

$$T = \frac{P}{P_s}$$

şeklinde gösterilir.



Şekil 2.2: Polikromatik bir ışın demetinin saf çözücü ve çözelti ortamındaki davranışı

Geçirgenliğin eksi logaritması absorptans (A) olarak adlandırılır ve absorptans

$$A = -\log_{10} T = -\log \frac{P}{P_s}$$

şeklinde formüle edilir. Çalışmalarda absorplanan ışın miktarı ya geçirgenlik ya da absorptans olarak verilir. Geçirgenlik, genellikle yüzde olarak verilir:

$$\% T = \frac{P}{P_s} 100$$

şeklinde ifade edilir.

Ayrıca, absorbans ışının çözelti içinde aldığı yolla (b) ve çözeltide absorpsiyon yapan taneciklerin derişimiyle (c) doğru orantılıdır. Buna göre, ϵ bir sabit olmak üzere absorbans,

$$A = \epsilon bc$$

şeklinde de verilebilir ve burada ϵ *molar absorbans* ya da *molar absorptivite* olarak adlandırılır.

Lambert Beer Kanunu aşağıdaki denklem ile de ifade edilebilir¹⁸⁻²¹.

$$P = P_s 10^{-\epsilon b c}$$

2.3.2. Lambert-Beer Kanunundan Sapmalar

Lambert-Beer kanunu sadece çok seyreltik çözeltilere uygulanabilen bir kanundur. Bunun nedeni yüklü taneciklerin bir birinin yük dağılımını etkilemeleri veya değiştirmeleridir. Yük dağılımı değişen bir taneciğin absorplama kabiliyeti çok değişir. Bu da derişimle absorbans arasındaki lineer bağıntının bozulmasına neden olur. Absorplayan maddenin derişimi düşük olabilir fakat yanında bulunan maddelerin derişimi yüksek olursa yine sapma gözlenebilir. Kanundan sapmalar ortamda yüklü tanecikler bulunduğu zaman daha da büyük olur^{18,19}. Sapmalar;

- 1- Cihazdan gelen sapmalar
- 2- Kimyasal maddelerden gelen sapmalar
- 3- Analizci hatasından gelen sapmalar

2.3.3. Ultraviyole Spektrofotometreleri

Ultraviyole spektrofotometreleri daha önce de söylendiği gibi genellikle görünür bölgeyi de içine alırlar. Çalışma alanları 110 nm den 1000 nm ye kadar değişir. Ancak

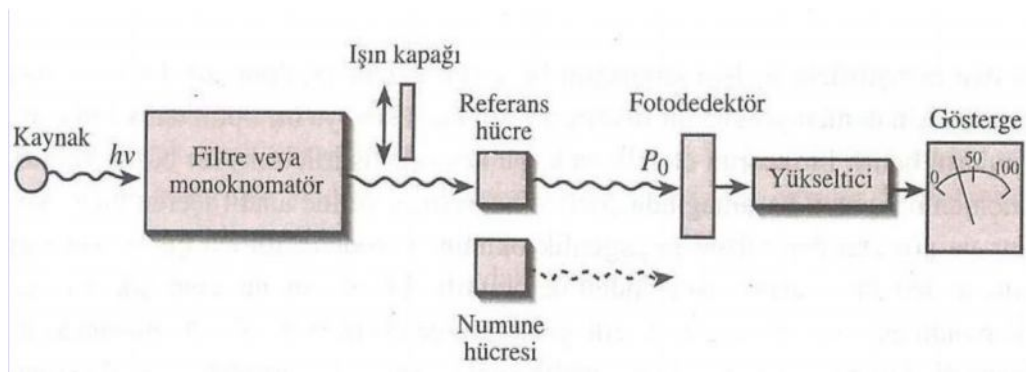
110 nm ile 190 nm dalga boyu aralığında çalışan cihazlar vakum tertibatlı ve oldukça pahalı cihazlardır. Bundan dolayı laboratuvarlar da kullanılan spektrofotometri cihazları 190 nm ile 800 nm dalga boyu aralığında çalışmaktadırlar. Ultraviyole spektrofotometreleri yapılarına göre iki kısma ayrılır¹⁸⁻²¹.

1- Tek ışınlı spektrofotometreler

2- Çift ışınlı spektrofotometreler

2.3.3.1. Tek Işınlı Spektrofotometreler

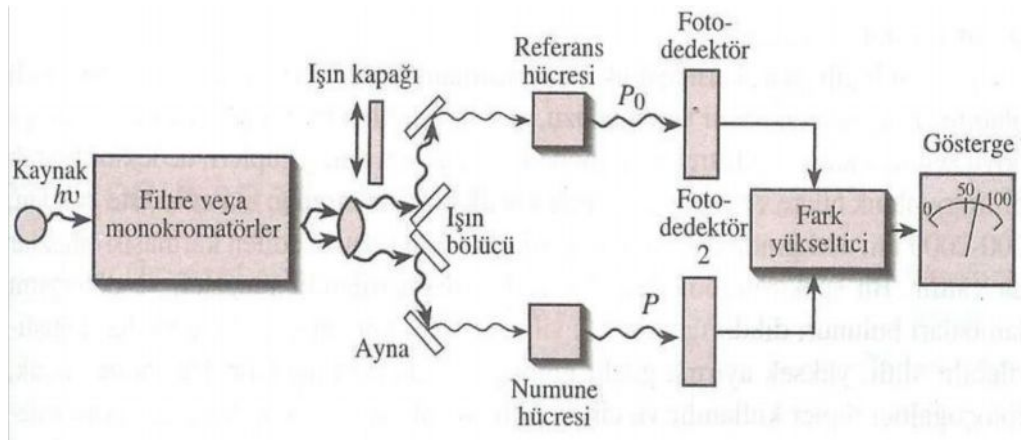
Absorbsiyon ve % geçirgenlik ölçümlerinde kullanılan basit, ucuz ve bakım kolaylığı olan bir cihazdır. Tek ışınlı spektrofotometreler aşağıda gösterildiği gibi ışın kaynağı, dalga boyu seçici, filtre veya monokromatör, ışın yoluna konacak eşlenik iki hücre, dedektör, yükseltici ve bir gösterge aletinden oluşur. Absorbsiyon ve % geçirgenlik okumak için önce numune bölmesine referans madde konularak alet ve referans hücreye göre cihaz sıfırlanır. Daha sonra numune hücresi konur ve ölçüm yapılır. (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 : Tek ışınlı spektrofotometre cihazının şematik gösterimi

2.3.3.2.Çift Işınlı Spektrofotometreler

Modern spektrofotometrelerin pek çoğu çift ışınlı tasarıma sahiptir. Bu cihazlar tek ışınlı cihazlara göre hem optik hem de elektronik yönden daha karmaşıktırlar. Çift ışınlı spektrofotometreler 190-800 nm aralığında çalışmak üzere tasarlanmışlardır. Cihaz sıra ile devreye giren tungsten ve döteryum lambaları, yansıtımlı grating monokromatörü ve bir fotoçoğaltıcı dedektörü ile donatılmıştır. Bu cihazlardaki ışın bölücü, motorla dönen, üç bölmeli bir diskdir ve “çopı” adını alır. Çopırın üç bölmesinden biri saydam, ikincisi yansıtıcı, üçüncüsü ise opakdır. Her dönüşte dedektör, üç ayrı sinyal alır. Bu sinyallerin ilki I_0 'a, ikincisi I 'a, üçüncüsü de karanlık akıma karşılık gelir. Üç sinyal, elektronik olarak işlenerek numunenin geçirgenliği veya absorbansı göstergeden okunur. Çift ışınlı cihazlar, ışık kaynağındaki bütün dalgalanmaları giderebilme, kaçak ışınları ve saçılan ışıklardan gelen sapmaları minimize etme ve yükselticideki voltaj değişikliklerinden fazla etkilenmeme gibi üstün özelliklere sahiptirler (Şekil 2.4). Günümüz modern optoelektronik teknolojisinin ürünlerinden olan çok kanallı veya diod serili spektrofotometrelerdir. Bu cihazlar, çok kısa zamanda bütün ultraviyole, görünür bölge spektrumunun kaydını mümkün kılar.



Şekil 2.4 : Çift ışınlı spektrofotometre cihazının şematik gösterimi

UV- Görünür Bölge Spektrofotometre cihazları aşağıdaki kısımlardan oluşur.

1. Işın kaynağı
2. Dalga Boyu Seçici (Monokromatör/Filtreler)
3. Numune Kabı
4. Işın Transduserleri/Dedektörler
5. Okuyucu (Display)

2.3.3.3. Işın Kaynağı:

Moleküler absorpsiyon ölçümlerinde; oldukça geniş bir dalga boyu aralığında, gücü ani olarak değişmeyen sürekli ışın kaynağı tercih edilir. UV bölgesi için ışın aralığı 140-400 nm arasında olan Hidrojen ve Döteryum lambaları kullanılır. Görünür bölge için ışın aralığı 400-800 nm arasında olan Tugsten lambası kullanılır. Spektrofotometre açıldığında hem tugsten hem de döteryum lambaları birlikte açılır. UV-Görünür-NIR bölge için gücü 45-450 W arasında olan ksenon lambası kullanılır.

2.3.3.4. Dalga Boyu Seçici (Monokromatör, Filtreler):

Analit tarafından absorblanan veya yayılan dar bir ışın bandını diğer ışınlardan ayırıp seçebilecek sistemlerdir.

2.3.3.5. Numune Kabı

Numune kabı veya hücreler, çalışılan spektrum bölgesinde ışını geçiren absorplamayan maddelerden yapılmaktadır. Bu malzemeler kuvarz, cam, plastiktir. Genellikle UV bölgede absorbans ölçümlerinde kuvarz küvetler (350 nm altında) , 350-

2000 nm dalga boyu aralığındaki absorbans ölçümlerinde silikat cam küvetler ve görünüm bölgedeki absorbans ölçümlerinde plastik küvetler kullanılmaktadır.

2.3.3.6. Işın Transduserleri / Dedektörler

Dedektörler; her hangi bir fiziksel olgunun varlığını gösteren aletlerin genel adıdır. İdeal bir elektromagnetik ışın transduseri; geniş bir dalga boyu aralığında, düşük düzeyde ışın enerjisinde hızla tepki verir ve kolayca şiddetlendirilebilen gürültüsü düşük bir enerji sinyali oluşturur. Elektrik sinyali ışın şiddeti ile doğru orantılıdır. Transduserlerin 2 genel tipi vardır.

1. Foton Dedektörleri
2. Isı Dedektörleri

UV-Görünür-NIR bölgesinde foton dedektörleri kullanılır. Fotonlar; aktif bir yüzeye ya elektron koparması (fotoemisyon) ya da yüzeyin elektronlarını uyararak yüzeyi iletken hale getirmesi (fotoiletkenlik) esasına dayanır^{22,23}.

2.3.4. UV-Görünür Bölge Spektrofotometre Cihazının Kullanım Amaçları

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

2.3.4.1. Kalitatif Analiz

Bilinmeyen bir madde saflaştırıldıktan sonra UV spektrumu alınır. Bu spektrum, her yönüyle aynı şekilde daha önce alınmış olan spektrumlarla karşılaştırılır. Bilinmeyen maddenin spektrumu daha önceki madde spektrumlarından hangisine

uyuyorsa, bilinmeyen madde o maddedir. Bilinmeyen madde, bilim dünyası tarafından bilinmeyen yeni bir madde değil, sadece analizi yapan kişi tarafından bilinmeyen maddedir. Bundan başka maddenin ne olduğu biliniyor fakat saf olup olmadığı bilinmiyorsa, maddenin spektrumu alınır. Spektrumda beklenmedik piklerin görünmesi maddenin saf olmadığını gösterir. Ayrıca Ultraviyole ışınlarla yapılan spektrofotometrik ölçümlerde benzer kromofor grupların kalitatif tayininde de yararlı olur¹⁸⁻²¹. Çok karmaşık yapıları organik moleküllerin bile, fonksiyonel gruplar dışında kalan kısımları, 180 nm'den daha uzun dalga boylarına karşı geçirgendir. Onun için, 200-400 nm aralığında bir veya daha çok pik gözleniyorsa bu, molekülde doymamış grupların veya kükürt, halojen gibi hetero atomların varlığını gösterir. Çoğu zaman, analitin spektrumu, çok sayıda kromofor grup içeren ve yapısı bilinen başka bir molekülün spektrumu ile karşılaştırılarak, analitteki fonksiyonel grup hakkında bir fikir edinilebilir. Fakat genel bir kural olarak, analitin kesin yapısını anlamak için yeterli ayrıntılı bilgileri, ultraviyole spektrumlarında bulamayız. Bu yüzden, ultraviyole spektrumlarından elde edilen kalitatif veriler, NMR, MS gibi başka fiziksel ve kimyasal verilerle desteklenmeli mümkünse çözünürlük, erime noktası, kaynama noktası gibi bilgilerle birleştirilmelidir.

Kalitatif analiz amaçlı ultraviyole spektrumları genelde analitin seyreltik çözeltileri kullanılarak elde edilir. Fakat, uçucu bileşiklerin gaz halindeki spektrumları alınabilirse, daha ayrıntılı ve dolayısıyla daha yararlı spektrumlar ele geçer. Ultraviyole-Görünür bölge spektroskopisinde kullanılacak çözücünün bu bölgedeki ışınlar için geçirgen olması ve numuneyi, belirgin pikler verebilecek derişimlerde çözmesi gerekir. Ayrıca, çözücü ile absorpsiyon yapan tür arasındaki mümkün etkileşmeleri de hesaba katmak gerekir. Örneğin, su, alkol, ester ve keton gibi polar çözücüler, spektrumdaki titreşim ayrıntılarını örtme etkisi gösterirler. Polar çözücüler, hem spektrumun

titreşimlerinden ileri gelen küçük piklerin kaybolmasına, hem de absorpsiyon bandlarının ve dolayısıyla piklerin esas yerlerinden kaymasına neden olurlar.

Kalitatif Analizde, kullanılacak bir çözücüde aranan başlıca özellikler şöyle olmalıdır:

1. Saydam olmalı,
2. Spektrumu alınacak maddeyi çözmeli,
3. Spektrumu alınacak maddenin absorplama yaptığı alanda absorplama yapmamalı (boş olmalı)
4. Polar olmamalı
5. Çözdüğü maddenin kromofor grubuyla reaksiyona girmemeli.

2.3.4.2. Kantitatif Analiz

Ultraviyole ve görünür bölge absorpsiyon spektroskopisi, kimyacıların kantitatif analizlerde en çok faydalandıkları tekniklerden biridir. Kantitatif analizde, ilk önce analizi yapılacak maddenin en iyi absorpsiyon yaptığı dalga boyu bulunur ve dalga boyunda spektrumu alınır. Belirlenen dalga boyu sabit tutularak, artan derişimlerde hazırlanan çözeltilerin absorpsiyonları okunur. Derişime karşı absorpsiyon grafiğine geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edilir. Sonra bilinmeyen maddenin derişimi kalibrasyon eğrisi yardımıyla bulunur ve ayrıca seçilen dalga boyu sabit tutularak absorbtivite katsayısı da belirlenmeye çalışılır.

2.4. Türev Spektroskopisi Yöntemi

Türev Spektroskopisi; dalga boyunun bir fonksiyonu olarak dalga boyuna karşı absorpsiyonun 1, 2, 3,....., n türevidir. $F(\lambda)$ ' nin fonksiyonu olarak $dA/d\lambda$, $d^2A/d\lambda^2$, $d^3A/d\lambda^3$, denklemleri ile verilir.

Aşağıdaki eşitliklerde Lambert-Beer kanununda elde edilen farklılıklar gösterilmektedir.

$$\text{Zero-order Türev : } A = \epsilon \times b \times C$$

$$\text{Birinci Türev : } dA/d\lambda = b \times C \times d\epsilon/d\lambda$$

$$\text{İkinci Türev : } d^2A/d\lambda^2 = b \times C \times d^2\epsilon/d\lambda^2$$

...

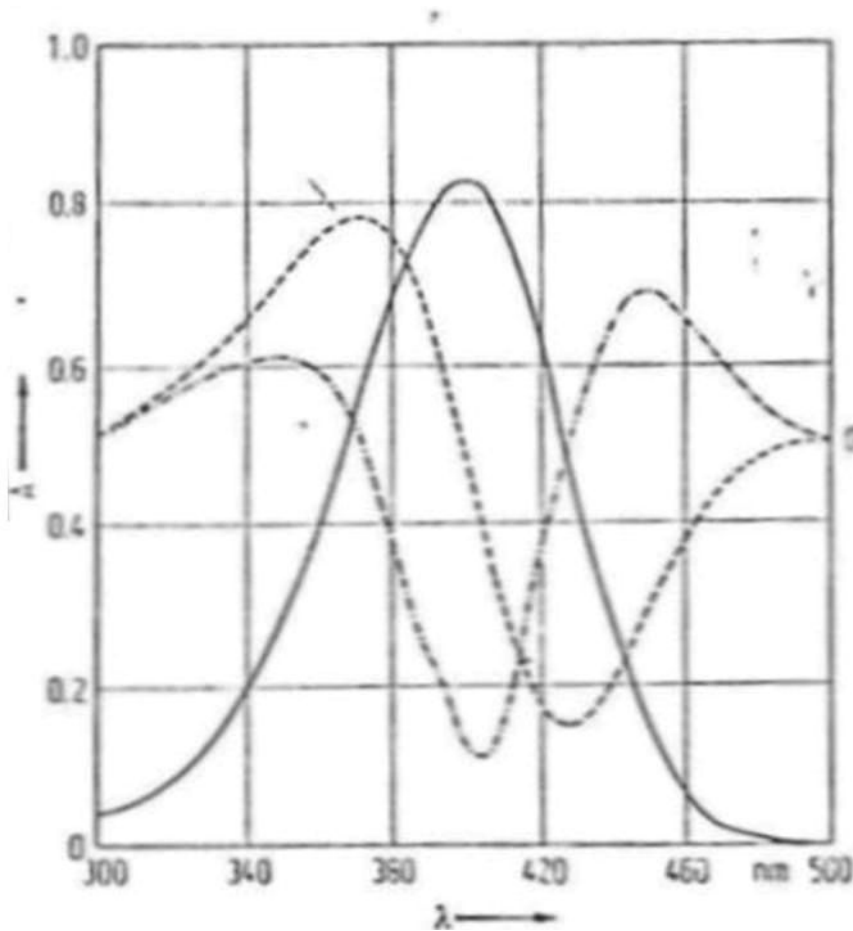
$$\text{n. Türev : } d^nA/d\lambda^n = b \times C \times d^n\epsilon/d\lambda^n$$

Türev spektroskopi yöntemi oldukça eskiye dayanır. İlk defa 1920'lerde Rutherford tarafından kütle spektrumları yorumlanmasında kullanılmış sonra genel kullanıma 1950 ler de başlanmış ve 1953-1955 Hammand ve ark., Marsson, Giese ve French bu yöntemi kullanmıştır^{24,25}. Mikro işlem teknolojisindeki gelişmelere paralel olarak türev spektroskopisi yönteminin yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanılmıştır. Günümüzde geliştirilen spektrofotometreler bu şekilde donatılmıştır. Son senelerde yayınlanan ilaç analizlerinde araştırmacıların çoğunda bu yöntemle ilgili çalışmalar bulunmaktadır.

Türev spektrofotometresi; türev spektrumlarının kullanılması esasına dayalı bir analiz yöntemidir. Türev eğrilerinin hazırlanması matematiksel işlemler gerektirmektedir. Orjinal spektrum herbir noktasındaki türevinin hesaplanması ve bulunan sonuçların grafiğe geçirilerek yani türev eğrilerinin hazırlanması oldukça zordur. Bilgisayar yardımı ile hesaplamalar yapılabilir.

Günümüzde 1.den 4'e kadar türev eğrisi çizen cihazlar bulunmaktadır. Yalnız 3. türevden sonra türev spektrumu alınması pek istenmemektedir. Çünkü ana maddenin yapısı her türev alındığında bozulur.

1.Türev; Orijinal absorpsiyon bandının her noktasındaki eğimini anlatır. Burada orijinal spektrumun maksimum noktası kaybolur buna karşılık orijinal spektrumda absorpsiyonun yükseldiği kısımlar için pozitif azaldığı kısımlar için negatif değerler almaktadır. Orijinal spektrumdaki eğri üzerinde eğimin en büyük olduğu noktada yani eğrinin yarı yüksekliğine karşılık bir maksimum bir minimum göstermekte ve eğimin en düşük olduğu tepe noktasında sıfırdır. Gaus eğrisinin maksimum noktasında (λ_{max}) birinci türev eğrisine bir kesim noktasına (zero-crossing) karşılık gelmektedir ($dA/d\lambda=0$). Birinci türev spektrumunda %53 civarında eliminasyon vardır ve türev eğrilerinin aynı dalga boyu aralığı içerisinde alınması nedeniyle piklerin genişliği azalmaktadır. Bu azalma birinci türevde yarısına eşittir^{24,25}.



Şekil 2.5 : 0., 1., 2., Türev spektrumlarının tipik özellikleri (orijinal UV(____), birinci türev (-----), ikinci türev (-.-.-.-))

2.Türev; Aynı şekilde ikinci türev spektrumu; orijinal eğrinin maksimum noktasına (λ_{\max}) karşılık gelen bir kesim noktası vardır ($d^2A/d\lambda^2 = 0$). İkinci türev spektrumunda % 40 eliminasyon vardır ve pik genişliğindeki azalma %53 civarındadır.

3.Türev; Aynı şekilde üçüncü türev spektrumu; orijinal eğrinin maksimum noktasına (λ_{\max}) karşılık gelen bir kesim noktası vardır ($d^3A/d\lambda^3 = 0$). Üçüncü türev spektrumunda % 30 eliminasyon vardır ve pik genişliğindeki azalma % 40 civarındadır.

4.Türev; için $d^4A/d\lambda^4 = 0$ kesim noktası, n. türev için $d^nA/d\lambda^n = 0$ kesim noktası karşılık gelmektedir.

Türev spektroskopisi; absorpsiyon spektrumun eğimlerindeki herhangi bir değişikliğe karşı son derece hassastır ve üstüste çakışan piklerin olduğu absorbans bantlarının analizinde çok uygun bir metottur²⁵⁻²⁷.

Türev spektrumlarıyla 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 sağlar²⁵⁻²⁷.

2.4.1. Türev Spektroskopisi Yönteminin Avantajları ve Dezavantajları:

Avantajları:

1. 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.

2. Çoğunlukla orijinal spektrumda elde edilen bu eğriler bir çok pikin üst üste gelmesiyle meydana gelmiştir. Türev alma ile bu absorpsiyon eğrileri daha ayrıntılı şekle girer ve böylece bir anda bulunan piklerin tek tek görünmesi sağlanır.

3. Bilindiği gibi spektrofotometride bulanık çözeltiler ile çalışırken çökme hızı tanecik büyüklüğü gibi faktörlere bağlı olarak büyük oranda hata yapılabilir. Türev eğrilerinin hazırlanması ile bulanıklığın oluşturduğu bu olumsuz etki ortadan kaldırılabilir.

4. Birden fazla maddenin karışım halinde bulunduğu ortamlarda ekstraksiyon ve kromatografi ile herhangi bir ayırma işlemine başvurmaksızın tek tek miktarları tayin edilebilir.

5. Reaksiyon ortamından kaynaklanan gürültü piklerinin yok edilmesi sağlanır

Dezavantajları:

1. Kullanımı çok kolay olmasına karşılık pahalı spektrofotometrelerde bulunur ve oldukça karmaşık bir elektronik yapıya ihtiyaç vardır.

2. Türev spektrumlarında çok sayıda uyduruk piklerde görülür. Bu pikler bir karışım ile çalışırken başka bileşenlerinde varlığına bizi götürür. Türev derecesi arttıkça bu cins piklerin sayısı da artacağı için karışıklık daha da artacaktır²³.

2.5. Kromatografik Yöntemler

Karmaşık karışımlardaki kimyasal bileşiklerin ayrılması, tanınması ve teşhisi için yaygın olarak kullanılan analitik yöntemler topluluğuna kromatografi adı verilmektedir. Kimyada diğer ayırma yöntemlerinden hiç birisi kromatografi kadar etkili olmayıp uygulamada yaygın olarak kullanılmaz. Bu nedenle de kromatografik yöntemler daha çok araştırma amacıyla kullanılır. Bu sebeple çok geniş ve verimli bir alandır.

Çok değişik sistem ve tekniğe uygulandığı için, kromatografi teriminin tam olarak tanımını yapmak çok zordur. Bununla birlikte, bu yöntemlerin tümünde ortak olarak bir sabit faz ve bir de hareketli faz olmak üzere iki faz mevcuttur. Akış halinde gaz veya sıvı bir fazla birlikte karışımındaki bileşenler, durgun faz üzerinden geçirilirler; geçirilme esnasında bileşenlerin göç hızlarına bağlı olarak ayırma işlemi gerçekleşir. Bu bilgiler ışığında genel bir tanım yapmağa çalışırsak; kimyasal maddeler sabit bir ortama ilave edip bunların belli bir hareketli faz yardımıyla yüzey adsorpsiyonu, dağılma, iyon değiştirme ve eleme gibi farklı özelliklerine bağlı olarak, sabit ortamdan ayrılma yöntemlerine kromatografi denir¹⁸⁻²¹.

2.5.1.Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması

Kromatografik yöntemler, durgun fazın ortamda bulunma şekline göre kolon ve düzlemsel olmak üzere ikiye ayrılır. Kolon kromatografisinde durgun faz dar bir boruda tutulur, hareketli faz ise yer çekimi veya basınç etkisiyle borudan geçirilir. Düzlemsel kromatografisinde ise, durgun faz düz bir yüzeyde veya bir kağıdın gözeneklerinde tutulur. Bu durumda hareketli faz, durgun faz üzerinde kılcal veya yer çekim etkisiyle hareket eder. Bunun dışında kromatografik yöntemler ayırma işlemlerinin farklılığına göre çok daha değişik şekillerde sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırmalar aşağıdaki şekilde verilebilir¹⁸⁻²¹.

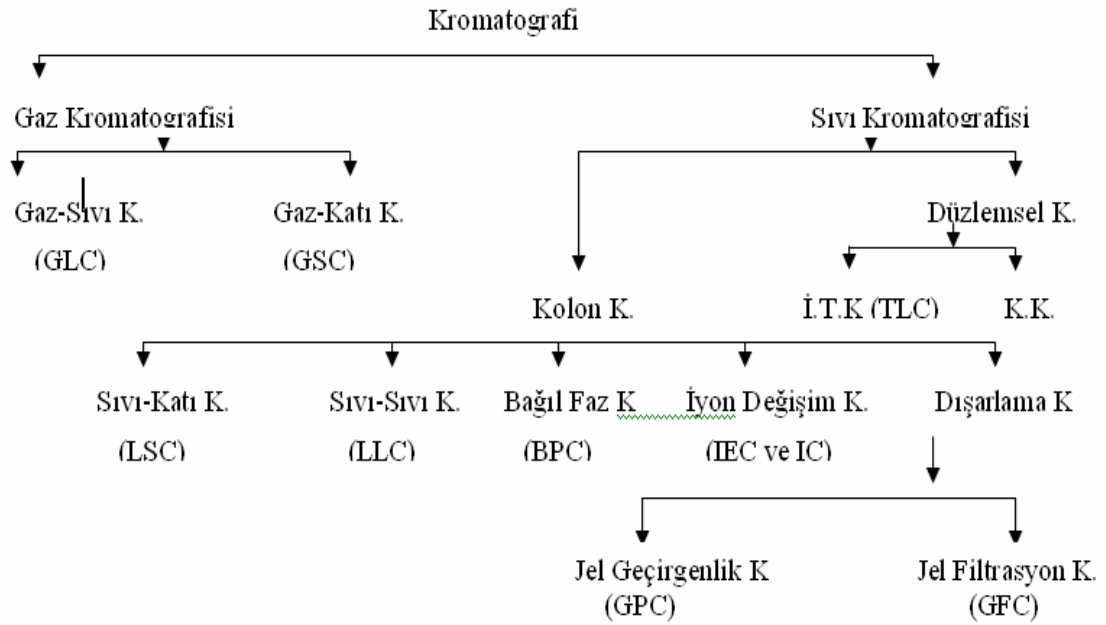
1. Teorik Sınıflandırma

- a- Paylaşım Kromatografisi
- b- Adsorpsiyon Kromatografisi
- c- Jel Filtrasyon Kromatografisi
- d- İyon Değişim Kromatografisi

2. Pratik Sınıflandırma

- a- Kağıt Kromatografisi
- b- İnce Tabaka Kromatografisi
- c- Kolon Kromatografisi
- d- Gaz Kromatografisi
- e- Sıvı Kromatografisi

3. Hareketli ve Durgun Fazlara Göre Sınıflandırma



2.5.2. Kromatografide Temel Olan Fiziksel ve Kimyasal Olaylar

Kromatografik yöntemlerde maddelerin ayrılmasında etkin olan dört ayrı mekanizma mevcuttur. Bunlar aşağıda özetlenmiştir.

1. Dağılma Kromatografisi: Dört ayrı tip sıvı kromatografi içinde en yaygın kullanılanıdır. Dağılma çözünen maddenin hareketli faz ile katı faz üzerinde adsorplanmış sıvı fazdaki çözünürlüğüne veya hareketli faz gaz ise uçuculuğuna dayanan bir olaydır. Sıvı-sıvı ve bağlı-sıvı faz kromatografisi olmak üzere iki alt sınıfa

ayrılabilir. Bu teknikler arasındaki fark, destek katısına durgun fazın tutunma farkına dayanır. Sıvı-Sıvı kromatografisinde, sıvı bir durgun faz dolgu maddesinin yüzeyine fiziksel absorpsiyonla tutturulmuştur. Bağlı-sıvı faz kromatografisinde ise katı destek yüzeye bağlı organik sıvı türler kimyasal olarak tutturulmuştur. Dağılma kromatografisinde hareketli ve durgun fazların bağıl polarlıklarına bağlı olarak iki kısma ayrılmaktadır. Durgun faz oldukça polar ve hareketli fazda apolar ise buna Normal-Faz Kromatografisi, Durgun faz apolar (çoğu zaman bir hidrokarbon) hareketli faz ise nispeten polar (su, asetonitril, metanol) ise buna da Ters-Faz Kromatografisi denir.

2. Adsorpsiyon Kromatografisi: Bir karışımdaki maddelerin katı destek üzerinde farklı kuvvetlerde tutunması prensibine göre birbirlerinden ayrıldıkları kromatografi olarak adlandırılır. Çözücü ve katı sabit fazın polarlıkları bir kolon boyunca veya bir yüzey boyunca çözünen maddenin hareketinin hızını tayin eder.

3. İyon Değiştirme Kromatografisi: İyon değiştirici reçinelerin kullanımına dayanan iyonların ayrılması ve tayini için etkili bir yöntemdir. İyon değiştirme olayları, çözültideki iyonlar ve çözünmeyen, yüksek molekül ağırlıklı bir katının yüzeyindeki benzer işaretli iyonlar arasındaki değiştirme dengesi temeline dayanmaktadır. Bu teknikte katyon değiştirici ve anyon değiştirici reçineler kullanılır. Katyon değiştirici reçinelerin en genel aktif bölgeleri kuvvetli bir asit olan sülfonik asit grubu ($-\text{SO}_3\text{H}^+$) ve zayıf bir asit olan karboksil grubudur ($-\text{COO}^-\text{H}^+$). Anyonik iyon değiştiriciler, kuvvetli bir baz olan tersiyer amin grupları ($-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{OH}^-$) veya daha zayıf bir baz olan primer amin gruplarını ($-\text{NH}_3^+\text{OH}^-$) içermektedir.

İyon değiştirme kromatografisi, ilaçlar ve bunların metabolitleri, serumlar, gıda koruyucu maddeler, vitamin karışımları, şekerler ve farmasötik preparatlar gibi birçok farklı organik ve biyokimyasal sistemlere uygulanabilmektedir.

4.Boyut-Eleme Kromatografisi: Jel-geçirgenlik veya jel-süzme kromatografi adı da verilen boyut-eleme kromatografisi, özellikle yüksek mol kütleli maddelere uygulanabilen önemli bir tekniktir. Boyut-eleme kromatografi için dolgu maddeleri, çözünen madde ve çözücü moleküllerinin içine difüzlenebileceği düzgün bir gözenek ağı içeren küçük boyutlu silis veya polimer taneciklerinden meydana gelmiştir. Gözenekler içinde küçük moleküller etkin bir şekilde yakalanabilmekte, büyük moleküllerde gözenek dışında kaldığından dolayı hareketli faz akımı ile kolondan kolaylıkla elue edilebilmekte ve daha sonrada gözeneklerde tutulan küçük moleküllerde hareketli faz akımı ile yüzeyden kolaylıkla uzaklaştırılabilmektedir. Gözenek içinde ortalama kalma süresi, analit molekülünün etkin büyüklüğüne bağlıdır.

2.5.3.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Tanecik büyüklüğü ve polaritesi gibi özellikleri farklı ve çözücünün içinden kolaylıkla geçebileceği gözenek büyüklüğüne sahip olan katı bir destek maddesine sahip bir kolon içirisinden hareket kabiliyetlerine bağlı olarak bir karışımdaki maddeleri birbirinden ayırmak mümkün olabilmektedir. Kolon destek maddesinin tanecik boyutu küçüldükçe çözücünün hareket edebileceği gözenek büyüklüğüde küçülmektedir. Hareketli fazın katı destek maddesi üzerinden kolaylıkla hareketini sağlayabilmek için uygun basıncın uygulanması gerekmektedir. Bu ihtiyaçtan dolayı yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) geliştirilmiştir. Yüksek performanslı

sıvı kromatografisinde hareketli faz sıvı, durgun faz ise katı veya katı destek maddesi üzerine tutturulmuş sıvı fazdır.

Yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi bütün analitik ayırma teknikleri arasında en yaygın kullanılanıdır. Yöntemin bu kadar yaygın olmasının sebepleri, duyarlılığı, doğruluğu, kesinliği ve seçiciliğinin yüksek olması, kantitatif analizlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan türlerin veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen türlerin ayrılmasında uygun olması ve hepsinden de önemlisi sanayinin, birçok bilim dalının ve halkın birinci derece ilgilendiği maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir. Bu gibi maddelere örnek olarak; amino asitler, proteinler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, ilaçlar, terpenoidler, pestisitler, antibiyotikler, steroidler, metal-organik türler, çeşitli organik bileşikler sayılabilir. Kısacası, uygun dedektör, uygun kolon ve uygun hareketli faz olduğu sürece bütün kimyasal maddelerin ayrılmasında ve analizinde HPLC kullanılabilir^{18-21,25}.

2.5.3.1 Sıvı Kromatografisinin Dayandığı Temel Parametreler

2.5.3.1.1. Dağılma (Partisyon) Katsayısı

Dağılma kromatografisiyle bir karışımdaki maddelerin farklı iki faz (hareketli faz ve durgun faz) arasındaki farklı çözünmelerinden yararlanılarak birbirlerinden ayrılması gerçekleştirilebilmektedir. Bütün bu ayırma işlemlerinde etkili olan parametre, çözünenlerin hareketli ve durgun sıvı faz arasındaki dağılma (partisyon) derecesini temel alır. A çözüneni için söz konusu denge, aşağıdaki eşitlikle gösterilebilir.

$$A_{\text{hareketli}} \leftrightarrow A_{\text{sabit}}$$

Bu reaksiyonun denge sabiti K'ya, dağılma (partisyon) oranı veya dağılma (partisyon) katsayısı adı verilir ve

$$K = C_s / C_m$$

şeklinde gösterilir. Burada C_s , analitin durgun faz içindeki molar derişimi C_m ise analitin hareketli faz içindeki molar derişimidir. İdeal olarak çözünen madde derişimlerinin geniş aralıkta dağılma oranı sabittir, diğer bir deyişle C_s doğrudan C_m ile orantılıdır^{18-21,25}.

2.5.3.1.2. Alıkonma (Retensiyon) Zamanı:

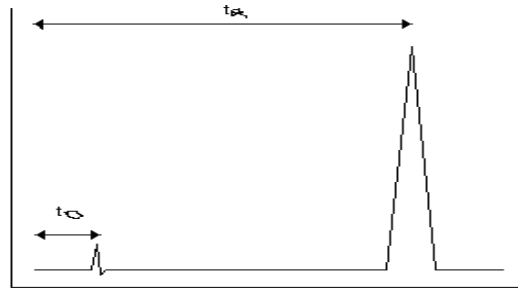
Şekil 2.6'da tek bir analit içeren numune için tipik bir kromatogram verilmiştir. Numune enjeksiyonundan sonra gelen pik için, pik süresi ölü zaman olarak adlandırılır ve t_m ile gösterilir. Ölü zaman, hareketli fazın ortalama göç hızını verir ve analit piklerinin tanınmasında önemli rol oynar. Numune içinde veya hareketli fazda çoğu zaman kolonda tutulmayan bir tür olabilir. Yoksa bile diğer piklerin tanınmasına yardımcı olmak için böyle bir tür ortama katılabilir. Şekilde sağ taraftaki pik bir analit türüne aittir. Numunenin enjeksiyonu ile bu pikin dedektöre ulaşması için geçen süreye alıkonma (tutulma) zamanı denir ve t_R simgesiyle gösterilir.

Analitin kolon içerisinde hareketi esnasında ortalama göç hızı V ;

$$V = L / t_R$$

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

$$U = L / t_M$$



Şekil 2.6: Tek bileşenli bir karışım için tipik bir kromatogram

2.5.3.1.3. Analitin Göç Hızı, Kapasite Faktörü

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

$$k' = (t_R - t_M) / t_m$$

t_R ve t_M değerleri kromatogramlardan kolayca bulunur. Bir çözünen madde için kapasite faktörü birden çok küçük ise, ayrılma hızlı gerçekleşir ve alıkonma zamanının doğru olarak belirlenmesi zor olur. Öte yandan kapasite faktörü 20-30 gibi bir sayıdan daha büyük olursa ayrılma zamanı gereksiz bir şekilde uzun olur. İdeal bir ayırma da kapasite faktörü değerinin 1 ile 5 arasında olması gerekmektedir. Kapasite faktörü hareketli faz ve durgun faz bileşimlerinin değiştirilmesiyle ayarlanabilir. Her maddenin kendine özgü bir kapasite faktör değeri vardır.

2.5.3.1.4. Seçicilik Faktörü, Farklı Göç Hızları

Bir karışımdaki analitlerin kapasite faktörlerinin oranı seçicilik veya ayırım faktörü olarak adlandırılır. Bir kolondaki analitlerin seçicilik katsayısı; bir kolonun söz konusu maddeleri ne kadar iyi ayıracağına bir ölçüsüdür.

Bir karışımda bulunan A ve B maddeleri bir kolonda ayrılmaya çalışılınsın. Bu sistem için seçicilik faktörü α , şu şekilde tanımlanır;

$$\alpha = K_B / K_A$$

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

$$\alpha = [(t_R)_B - t_M] / [(t_R)_A - t_M]$$

2.5.3.1.5.Kolon Verimi

Başarılı bir kromatografinin amacı verimli bir ayırım ve dar bir kromatografik bant elde etmektir. Kromatografik kolon verimliliklerinin kantitatif ölçümünde birbiriyle bağıntılı iki terim sıkça kullanılır:

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

Bu ikisi arasındaki bağıntı aşağıdaki eşitlikle verilir;

$$N = L / H$$

L: Kolon dolgusunun uzunluğu (cm)

Bir kolonda tabaka yüksekliğinin azalması ve teorik tabaka sayısının artmasıyla kolon verimliliği artar. Hareketli ve durgun fazların bileşimi, kolon dolgu maddesinin tanecik büyüklüğü ve kolon çapına bağlı olarak kolonun tipi kolon verimliliğine etki etmektedir. Kolon dolgu maddesinin tanecik çapı küçüldükçe kolon tabaka sayısı artmakta bu da kolon verimliliğini artırmaktadır.

Martin ve Synges'in kromatografik bir kolonda birçok ayrı fakat bitişik dar tabakalardan meydana geldiğini düşünerek teorik bir çalışmayla tabaka yüksekliği ve teorik tabaka sayısı terimlerinin ortaya çıkışına öncülük etmişlerdir. Her tabakada

maddenin hareketli ve durgun faz arasında kurduğu dengenin, yeniden meydana geldiği kabul edilmiştir. Analitin kolon içerisinde hareketi, dengedeki mobil fazın bir tabakadan diğerine geçişi olarak kabul edilmiştir. Teorik tabaka sayısı şu şekilde hesaplanır;

$$N=16 (t_R / W)^2 \quad \text{veya} \quad N= 54,4 (t_R / W_{1/2})^2$$

W : Pik taban genişliği

Teorik tabaka sayısı N ve tabaka yksekligi H, literatürlerde ve kromatografik cihaz üreticileri tarafından, kolon performansının bir ölçümü olarak kullanılır ¹⁸⁻²¹ .

2.5.3.1.6.Kolon Performansının Optimizasyonu

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

Bant genişlemesi ve dolayısıyla kolon verimliliğinin kaybı, çözünen bileşenlerin kolon içerisinde gleri sırasında yer alan çok sayıda ktlenaktarım işlemlerinin belli hızlara sahip oluşunun bir sonucudur. Bu hızları etkileyen bazı değişkenler denetlenebilir ve ayırmaları iyileştirmek için kullanılabilir.

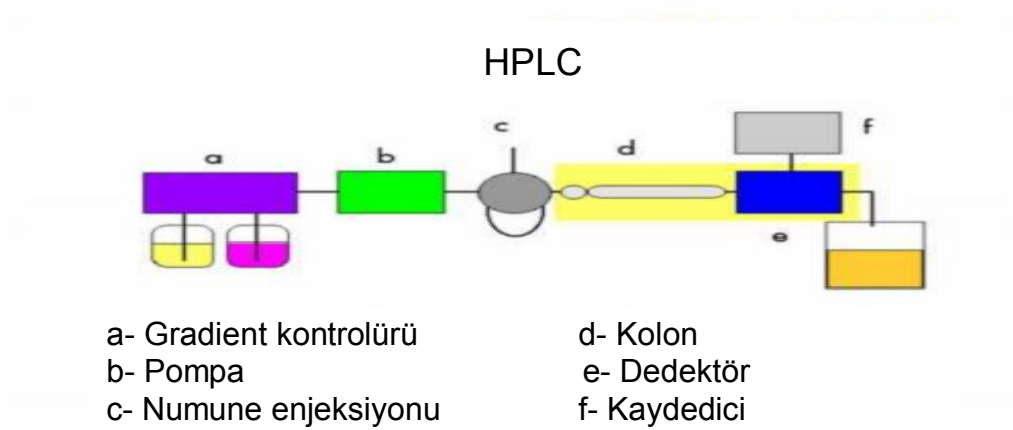
2.5.3.1.7.Kolon Performansına Etki Eden Değişkenler

İstenilen ayırmayı sağlamak için optimum koşullar araştırılırken α , k' ve N (veya H) gibi temel parametrelerin az ya da çok birbirinden bağımsız olarak ayarlanabileceği unutulmamalıdır. Böylece α ve k' , en kolay sıcaklık ve hareketli fazın bileşimindeki oynamalar ya da değişik bir kolon dolgusu kullanılarak değiştirilebilir. Her hangi bir çalışmada, teorik tabaka sayısı, kolon boyunun değiştirilmesi, tabaka yksekligi,

hareketli fazın akış hızı, dolgu maddesi tane büyüklüğü, hareketli fazın viskozitesi ve sabit fazı oluşturan absorbe edilmiş sıvı filmin kalınlığı gibi parametreler değiştirilerek iyi bir ayırım gerçekleştirilebilir.

2.5.3.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Cihazı

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazı, kendine özgü işlevlere sahip olan pompa, enjektör, kolon, dedektör, ve kaydedici olmak üzere beş ana bölümden oluşan bir sistemdir¹⁸⁻²⁰ (Şekil 2.7).



Şekil 2.7: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi cihazının şematik görünüşü

2.5.3.2.1. Pompalar

Pompalar, sıkıca doldurulmuş kolon içinden hareketli fazın akışını sağlayan aletlerdir. Her birinin kendine göre üstünlük ve sakıncaları bulunan üç tip pompa vardır.

Pistonlu pompalar; cihazların %90'ında kullanılan pompalardır. Motor kontrollü bir pistonun ileri ve geri hareketiyle çözücünün pompalandığı küçük bir silindirden meydana gelmiştir. Bu pompaların üstünlüğü; küçük iç hacimleri, yüksek çıkış basıncı, gradiyent elüsyona uyarlanmaya hazır oluşları ve kolon geri basıncından ve çözücü

viskozitesinden büyük ölçüde bağımsız olan sabit akış hızlarıdır. Pulsu (hava veya gaz kabarcığı) bir akış ürettiklerinden dolayı sakıncalıdır

Sürgülü pompalar; bir kademeli motordan güç alan vidalı güdüm mekanizması ile kumanda edilen pompalardır. Viskoziteden ve geri basınçtan bağımsız bir akış üretirler, pulsuz akış üretirler. Sakıncası sınırlı çözücü kapasitesi ve çözücü değiştirilmesinde karşılaşılan güçlüklerdir.

Pnömatik pompalar; en basit pompalardır. Akış pulsuzdur ancak kapasitesi sınırlı olup, çıkış basıncı düşüktür.

2.5.3.2.2.Enjektörler

İlk ve en basit numune verme sistemi şırınga ile enjeksiyondur. Bu amaçla 100 atm basınca kadar dayanıklı mikro şırıngalar kullanılır. Bu tekniğin avantajı basitliğidir. Ne yazık ki, şırınga ile enjeksiyonun tekrarlanabilirliği nadiren %2-3' den daha iyidir. Çoğu zaman da daha kötüdür.

Numune giriş sarımlarının kullanılması esasına dayanan otomatik enjeksiyon sistemleri en yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir. Birçok sıvı kromatografisi cihazının ayrılmaz bir parçası olan bu sarımlar, değiştirilebilir nitelikte olup 5 µL- 500 µL arasında değişen hacimlerde numune enjeksiyonu yapabilmektedir.

2.5.3.2.3.Kolonlar

Kolon, sistemin en önemli kısımlarından biri olup normal olarak düzgün iç çaplı paslanmaz çelik borulardan imal edilir. Ancak bazen kalın cidarlı cam borularda kullanılır. Cam kolonların çalışma basınçları 600 psi ile sınırlıdır. Analitik amaçlar için kullanılan kolonlar 5-150 cm uzunluğunda ve iç çapları 4-10 mm arasında

değişmektedir. Dolgu maddesinin taneciklerinin çapı ise 5-10 μm ile 35-125 μm arasında değişmektedir ve sistemin performansını büyük ölçüde belirleyen etkidir. Günümüzde, 25 cm uzunluğunda, 4.6 mm iç çapında ve 5 μm tanecik büyüklüğüne sahip dolgu maddesi doldurulmuş kolonlar çok fazla tercih edilmektedirler. Bu tip kolonlar bir metresinde 40000-60000 kadar tabaka bulunur. Son yıllarda 3- 7.5 cm ve iç çapı 1-4.6 mm olan yüksek performanslı mikro kolonlar da imal edilmeye başlanmıştır. Bu kolonların dolgu maddelerinin parçacık boyutları 3-5 μm ve tabaka sayısı 100000 tabaka/m' ye kadar çıkmaktadır. Bu mikro kolonlar ile çok az miktarda çözücü ile hızlı bir şekilde ayırma yapılabilir. Preparatif çalışmalarda kullanılan kolonların çapları daha geniş olabilmektedir. Ayırabildikleri maksimum madde miktarına göre kolonlar aşağıdaki gibi sınıflandırılabilirler.

Tablo 2-2: Ayırabildikleri maksimum madde miktarına göre kolonlar

Kolon Tipi	Çapı(m)	Uzunluk(cm)	Örnek miktarı(mg)	AkışHızı(ml/dk)
Mikrobor Analitik	1-2	7-30	0.01	0.1
Standart Analitik	3-5	7-30	0.1	1.0
Preparatif	5-20	25-50	1.0	10.0

Satın alınan kolonlarda kolonun maksimum hangi basınca dayanıklı olduğu, hangi akış hızlarında ve pH aralığında çalışması gerektiği gibi üretici firmanın kolon için belirlediği çalışma parametreleri bulunmaktadır. Çalışma esnasında bu parametrelere uyulduğu sürece hem kolondan beklenen maksimum verim alınır hem de kolonun ömrü uzun olur.

Analitik kolonların ömrünü uzatmak için analitik kolondan önce emniyet (klavuz, ön ya da guard) kolon denilen kolonlar kullanılır. Bu kolonların görevi hem hareketli faz hem de numune içerisinde bulunan toz parçacıklarını veya yabancı maddeleri tutarak uzaklaştırmaktır. Ayrıca bu kolonlar hareketli fazı durgun faz ile doyurularak

sıvı-sıvı kromatografisinde durgun fazın sürüklenme ile kaybı minimuma indirilir. Emniyet kolonunun dolgusunun bileşimi ile analitik kolonunki benzer olmalıdır. Ancak, basınç düşmelerini azaltmak için, emniyet kolonun dolgu maddesinin parçacık boyutu analitik kolonunkinden genellikle daha büyüktür¹⁸⁻²¹.

2.5.3.2.4.Dedektörler

Işık enerjisini elektrik enerjisine dönüştüren cihazlara denir. Sıvı kromatografi dedektörleri temel olarak iki tiptir. Birinci tip dedektörler, hareketli fazın kırma indisi, dielektrik sabiti veya yoğunluğu gibi, analit tarafından değiştirilebilen yığın özelliklerine göre cevap veren dedektörlerdir. İkinci tip dedektörler ise, analitin UV absorpsiyonu, floresans şiddeti veya difüzyon akımı gibi hareketli fazın sahip olmadığı analit ile ilgili özelliklere cevap veren dedektörlerdir¹⁸. HPLC’de kullanılan dedektörler; UV-Vis. Dedektör, Diyod Array Dedektör, Floresans Dedektör, Refraktif İndeks Dedektör, Elektrokimyasal Dedektör ve Kütle Spektroskopik Dedektör şeklinde sıralayabiliriz. Çalışmamızda UV-Vis. esaslı Diyod Array Dedektör (DAD) kullanıldı.

2.5.3.2.4.1.UV-Visible Dedektörler

Çoğu ilaç analizinde kullanılan UV-Visible absorpsiyon dedektörler, fotometrelerden farklı olarak, küçük bir akış hücresi (flow-cell) taşıyan ve bu hücrenin içinden geçerken maddeler tarafından absorplanan UV radyasyonu ya da görünen ışığı saptayabilen dedektörlerdir. Bunlar iki tiptir.

Sabit dalga boylu dedektörler: Basit bir dedektör olup, dalga boyunun seçimi için farklı interferanslı filtreler kullanılır. Bu dedektörlerde genellikle UV kaynağı olarak civa lambası kullanılır. Bunun dışında alternatif ışık kaynakları ile daha değişik dalga

boylarını gözlemekte mümkündür. 214 nm çinko, 229 nm kadmiyum, 206 nm magnezyum.

Değişken dalga boylu dedektörler: 108-400 nm arasında sürekli radyasyon verebilen döteryum lambaya yada 400-700 nm arasında ışık veren bir tungsten lambaya sahip bulunan istenilen dalga boyunu seçmek içinde bir monokromatör taşıyan fotometrelerdir. Maddenin maksimum absorpsiyonunun bulunduğu dalga boyunda çalışma olanağı sağlayan bu dedektörler, hassasiyet artırdığı için ve düşük dalga boyunda çalışabildiği için son derece değerlidir.

2.5.3.2.4.1.1.Diyod Array Dedektör

Değişken dalga boylu UV-Visible dedektörlerdir. Hem sabit hem de taramalı dalga boylarında incelemeye müsait olan dedektörlerdir. Diyod array dedektörler seçimlilik ve hassasiyet açısından değişken dalga boylu UV dedektör ile aynı avantajlara sahiptir. Buna ek olarak;

1. Aynı anda spektrumun bütün dalga boylarında piklerin ölçümü yapılabilir.
2. Tek bir enjeksiyonla maksimum dalga boyu saptanabilir.
3. Birden fazla dalga boyunda kromatogramların ve kromatogramlardaki piklerin UV-Görünür bölge spektrumları alınabilir.
4. Kromatografik olarak ayrılmamış piklerin nicel analizi yapılabilir.
5. Spektrumların çakıştırılması yöntemi ile pik saflığının tespiti yapılabilir.
6. Pikin kimliğinin doğrulanması yapılabilir.

2.5.3.3.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinin Uygulama Alanları

HPLC, yapıları benzer kimyasal türlerin ayrılması ve saflaştırılması işlemlerinde güçlü ve kullanışlı bir araçtır. Buna ek olarak ayrılan türlerin kalitatif ve kantitatif analizlerinde de kullanılan bir yöntemdir ¹⁸⁻²¹.

2.5.3.3.1.Saflaştırma

Her hangi bir karışım içerisindeki hedef bir bileşiğin, diğer bileşiklerden ya da safsızlıklardan ayrılmasıdır. Saflaştırma işlemi, saflaştırılacak bileşiğin özelliklerine uygun mobil faz ve kolon seçimi yapıldığında iyi bir ayırım gerçekleştirebilir ve ayrıca yüksek saflık elde edebilmek için diğer bileşiklerin kolon içerisindeki göç hızlarının yeteri derecede birbirinden farklı olması gerekmektedir.

2.5.3.3.2.Kalitatif Analiz

Az sayıda ve bilinen türleri içeren karışımlardaki bileşenlerin varlığını tanımak amacıyla HPLC yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Örneğin, tek bir kromatogramla, bir protein hidrolizatında 30 kadar amino asit yeterince kesin bir şekilde görülebilir. Öte yandan kromatogram, karışımdaki her tür için, tutulma süresi gibi yalnızca tek bir bilgi içerir; bu nedenle anılan tekniğin bilinmeyen bileşimde karmaşık numunelere uygulanmasındaki başarı sınırlıdır. Kromatografi kolonu doğrudan ultraviyole, infrared veya kütle spektrofotometrelerine bağlanmasıyla, bu sınırlamalar önemli ölçüde aşılmıştır. Böylece oluşturulan ikili cihazlar, karmaşık karışımlardaki bileşenlerin tanınmasında güçlü araçlar olarak kullanılır. Bu tip ayırmalar yapılırken en çok dikkat edilmesi gereken nokta, bilinen bir örneğin verdiği pikin kesin olarak saptanmış

olmasıdır. Ancak yinede kesin bir sonuç elde etmek için, birkaç yöntemin karşılaştırılması olarak denenmesi gerekmektedir.

2.5.3.3.3.Kantitatif Analiz

HPLC, hızlı büyümesini kısmen hızına, basitliğine ve ayırmalarda yaygın uygulanabilen bir araç oluşuna bağlıdır. Ancak, ayrılan türler hakkında kantitatif bilgi vermeseydi, bu denli yaygınlaşması mümkün olamazdı. Kantitatif analizde, analit pikinin yüksekliği veya alanının bir veya daha çok sayıda standart değerleriyle karşılaştırılması temeline dayanır. Şartlar uygun biçimde denetlenirse, bu parametrelerin ikisi de derişim ile doğrusal olarak değişir^{18-21,25}.

2.5.3.3.3.1. Pik Yüksekliğine Dayalı Analizler

Kromatografi pikinin yüksekliğini ölçmek için pikin iki yanındaki zemin çizgisi bir doğru ile birleştirilir ve dorudan pikin yüksekliği düşey olarak belirlenir. Numune ve standart kromatogramlarının alındığı süre içinde, pik genişliğini etkileyecek kolon şartları değişmez ise, bu ölçüm yeterince tekrarlanabilir şekilde yapılabilir ve doğru sonuçlar alınabilir. İyi bir şekilde denetlenmesi gereken şartlar, kolon sıcaklığı, hareketli faz akış hızı ve numune enjeksiyon hızıdır. Bunlara ek olarak kolonun aşırı yüklenilmesinden kaçınılması gerekmektedir. Numune enjeksiyon hızının etkisi, kromatogramda erken gelen pikler için özellikle önemlidir. Şırınga ile yapılan enjeksiyonlarda % 5 ile % 10'a varan bağıl hatalar sıkça görülebilir.

2.5.3.3.3.2. Pik Alanına Dayalı Analizler

Pik alanı, bir önceki bölümde verilen değişkenlerle oluşan genişleme etkilerinden bağımsızdır. Bu bakımdan analitik parametre olarak alan ölçümü pik yüksekliğinden daha uygundur. Öte yandan pik yüksekliğinin ölçülmesi daha kolay olup özellikle de dar piklerde daha doğru ölçümler yapılabilmektedir. Modern kromatografi cihazlarının çoğunda bağlı pik alanlarının tekrarlanabilir şekilde ölçülmesini sağlayan elektronik integratörler vardır. Bu tür bir olanak yoksa ölçüm elle yapılmalıdır. Simetrik piklerde oldukça başarılı olan bir metot, pik yüksekliğinin yarı yükseklikteki pik genişliği ile çarpılmasıdır.

2.5.3.3.3.3. Standartlarla Kalibrasyon

Kantitatif kromatografi analizlerinde en çok kullanılan yöntem, bilinmeyen maddenin bileşimine benzer bir madde yardımıyla bir seri standart çözelti hazırlanır ve HPLC kromatogramları alınır. Kromatogramlardaki pik yüksekliği veya pik alan değerleri derişime karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edilir. Böyle bir grafik, sıfır noktasından geçen bir doğru şeklinde olmalıdır; analizler bu grafikte yapılır. En doğru sonuçların alınabilmesi için kalibrasyonun sık sık yapılması gereklidir. Kalibrasyon standartlarına dayalı analizlerde en önemli hata kaynağı, genellikle numune hacmindeki belirsizliktir; enjeksiyon hızı da bazen bir etken olabilir¹⁸⁻²¹.

2.5.4. Analitik Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu)

USP XXIII/NF'de verilen tanıma göre bir analitik yöntemin geçerlilik testi (validasyonu), bir analiz yönteminin performans özelliklerini istenilen analitik uygulamada, belirlenen gerekli koşullarda sağladığını göstermek için yapılan işlemlerin

tümüdür²⁸. Analitik yöntemin kabul edilebilirliğini göstermek için kullanılan analitik parametreler:

- 1.Saklanan örneklerin stabilitesi (Stability)
- 2.Doğrusallık (Linearity)
- 3.Doğruluk (Accuracy)
- 4.Kesinlik (Precision)
- 5.Tekrarlanabilirlik (Reproducibility)
- 6.Seçicilik (Selectivity)
- 7.Duyarlılık Limiti (Sensitivity Limit)
- 8.Tutarlılık (Ruggedness)

İn-vivo ortamlardaki miktar tayininde; farmakokinetik parametrelerin doğru kesin bir şekilde hesaplanması, biyoyararlanım ve atılım çalışmalarında ilaç ve metabolitin plazma ve idrar gibi fizyolojik sıvılardaki derişiminin doğru bir şekilde saptanmasına bağlıdır. Analitik yöntemlerden güvenilir sonuçların elde edebilmesi için yöntemin iyi bir şekilde tanımlanmış ve geçerlilik testlerinin tam olarak yapılmış olması gerekmektedir.

2.5.4.1. Doğruluk, Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik

Doğruluk bulunan değerin gerçek değere olan yakınlığı olarak ifade edilir. Buda bağıl ve mutlak hata ile verilir. Yüksek duyarlılıkta bir tayin, düşük duyarlılık limiti ve kesinlik ile geliştirilebilir. Kesinlik, deney sonucu elde edilen değerlerin birbirine olan yakınlığı ile ve bağıl standart sapma (% RSD) ile verilir. Tekrarlanabilirlik, farklı koşullarda aynı yöntemle hazırlanan örneklerden elde edilen sonuçların uyumunu ifade eder. Kesinlik çalışma sonuçları tekrarlanabilirlik için kullanılabilir.

2.5.4.2. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi

En düşük derişimden en yüksek derişime doğru bir seri standart çözeltiler hazırlanarak yöntemin doğrusal olduğu aralık belirlendikten sonra çözeltilerin derişimine karşı ölçüm yapılan cihazın verdiği cevap grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi türetilir. Ağırlıklı ve ağırlıksız en küçük kareler yöntemi esas alınarak kalibrasyon eğrisinin regrasyon analizi yapılarak standart eğrinin doğru denklemi elde edilir. Kalibrasyon doğrusunun eğimi, doğrusallığın matematiksel bir ölçüsüdür.

2.5.4.3.Stabilite

Saklanan örneklerde analiz süresince analitin bozunmadan stabil kaldığından emin olmak için, yöntem geliştirirken stabilite testlerinin yapılması gereklidir. Saf analit ve/veya analit çözeltilisinin normal laboratuvar şartlarında nem, sıcaklık, ışık, hava ve örneklerin dondurulup eritilmesi gibi etkilere maruz bırakılarak bozunmadan stabil kaldığı süre tespit edilmeli ve elde edilen bilgiler aynı zamanda literatür bilgisi ile de desteklenmelidir. Stabilite çalışmalarında derişimi bilinen çözeltiler kullanılır.

2.5.4.4.Duyarlılık

Analitik yöntemin en düşük derişimleri saptayabilme yeteneğidir.

2.5.4.4.1. Tayin Alt Sınırı (Limit of Quantitation LOQ)

Belirlenen deney koşulları altında, örnek içinde kabul edilebilir doğruluk ve kesinlik değerleri ile ölçülebilen en düşük madde derişimidir. Kromatografik çalışmalarda tayin alt sınırı pik alanının gürültü alanına oranının 10 olduğu derişim olarak belirlenir.

2.5.4.4.2.Gözlenebilme Sınırı (Limit of Detection LOD)

Belirlenen deney koşulları altında analitik yöntemle saptanabilen en düşük derişimdir. Bir sınır değeri olup, bu derişimin üzerinde ki derişimlerde madde analiz edilebilir. Genellikle kromatografik cevapta sinyal/gürültü (S/G) oranının 2:1 veya 3:1 olması kabul edilebilir cevaptır. Bu sınır, saptama sınırında hazırlanmış uygun sayıda örneğin analizi ile gerçekleşir.

2.5.4.5.Tutarlılık

Yöntemin farklı deney koşullarında, farklı alet, farklı analist, farklı laboratuvar, farklı koşullarda hazırlanan reaktiflerle ve farklı günlerde aynı yöntemle analiz sonucunda elde edilen bulguların birbiriyle uygunluk derecesidir. Analiz sonuçları birbiriyle uyumlu ise analitik yöntemin uygulanabilirliğini ve tekrarlanabilirliğini gösterir.

3.MATERYAL VE METOD

3.1.Kimyasal Maddeler

- Metanol HPLC grade (Merk, Germany)
- Metimazol (Novagenix- Türkiye)
- Etanol analitik grade (Sigma-Aldrich)
- Kloroform (Merck)
- Etil asetat (Merck)
- n-Oktanol (Merck)
- Deiyonize su

3.2.Cihazlar

- NMR Varian 200 Mhz
- Santrifüj (Hettich, RPMx100)
- Ultrasonik Banyo (Elma LC 30)
- Terazi (Mettler Toledo)
- Karıştırıcı Vorteks (IKA)
- Mekanik Çalkalayıcı (Yellow Line)
- Su Banyosu (GFL)
- Membran Filtre (47 mm 0,45um Phenomenex)
- Vakum Pompası (phenomenex)
- Etüv (Memmert)

UV-Görünür Bölge Spektrofotometre (ThermoSpectronic HeLIOS β)

- Kuvartz Küvet
- Autosampler vial kit (Thermoquest, 1,8 ml screw cap)
- Yazıcı (Lexmark)

- Thermospectronic software

HPLC-DAD Sistemi

- DAD Dedektör (Thermoquest UV 6000 LP)
- Degazer (Thermoquest SCM 1000)
- Pompa (Thermoquest SCM 1000)
- Kolon (Ters faz C₁₈ kolon 5µm, 250x4,6 mm) (Ace)
- Otosampler (Thermoquest AS 3000)
- Bilgisayar (Vestel)

3.3. Yöntemler ve Uygulamaları

3.3.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Spektrofotometrik çalışmalarda analitik grade etanolde ve kromatografik çalışmada HPLC grade metanolde Metimazol çözülerek 100 µg ml⁻¹ derişiminde stok çözeltileri hazırlandı. Stok çözeltilerden, spektroskopik çalışmalar için 0.5-10 µg ml⁻¹ derişim aralığında ve kromatografik çalışma için de 0.25-9 µg ml⁻¹ derişim aralığında standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Her üç yöntemin plazma deneylerinde, 1 ml boş plazmaya kalibrasyon eğrisini elde edilebilecek derişimde hazırlanan çalışma çözeltileri eklenip karıştırıldı ve ekstraksiyon işlemi uygulanarak istenilen derişimlerde çözeltiler elde edildi. Hazırlanan bütün çözeltiler laboratuvar şartlarında saklandı.

3.3.2. Spektrofotometrik Yöntem Şartları

Spektrofotometrik ölçümlerde 235-300 nm dalga boyu aralığında Thermospectronic çift ışınlı UV-Görünür bölge spektrofotometresi kullanıldı. Çalışma, 1 cm kuvarz küvetlerde 600 nm min⁻¹ dalga boyu tarama hızı ve 2 nm spektral band

genişliği kullanılarak gerçekleştirildi. UV- Görünür bölge spektrumlar, madde üzerine gönderilen ışığın dalga boylarına karşı absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesi ve birinci türev spektrumları da madde üzerine gönderilen ışığın dalga boylarına karşı elde edilen absorbans değerlerinin birinci türevinin alınması ile elde edildi.

3.3.3. HPLC Kromatografik Yöntem Şartları

HPLC-DAD çalışmasında uygulanan Şartlar

Kolon	:Ters faz C ₁₈ kolon (5µm, 250x4.6 mm)
Mobil Faz	:metanol+su (40:60)
Akış Oranı	:1mldak ⁻¹
Dalga Boyu	: 254 nm
Dedektör	: Diyot Array Dedektör
Kolon Sıcaklığı	:Değişken
Alıkonna Zamanı	: 4.010 dak
İnjeksiyon Hacmi	: 10 µl

3.4. Plazmadan Ekstraksiyon İşlemi

HPLC-DAD Yöntemi İçin

- 1 ml plazma bulunan santrifüj tüplerinin her birine 0,5 ml etanolde znmş madde (90-2,5 µg ml⁻¹) ilave edildi.
- 30 saniye vortekslendi
- 5ml (%0,25 n-oktanol içeren kloroform) eklendi
- mekanik çalkalayıcı ile karıştırıldı (15 dak)
- santrifüjlendi (60 rpm10 dak)

- organik faz alındı
- 40°C de azot gazında buharlaştırıldı
- Kalıntı 5 ml metanolde çözüldü
- 30 saniye vortekslendi
- 45 µm çapındaki filtreden süzöldü
- viallere konuldu ve HPLC cihazına verildi
- 10 µl enjeksiyon yapıldı

UV- Görünür Bölge Spektrofotometre için

- 1 ml plazma bulunan santrifüj tüplerinin her birine 0,5 ml etanolde çözünmüş madde (100-10 µg ml⁻¹) ilave edildi
- 30 saniye vortekslendi
- 2 ml etanol eklendi
- 1 dakika vortekslendi
- 5 ml kloroform eklendi
- 5 dakika vortekslendi
- santrifüjlendi (60 rpm10 dak)
- organik faz alındı
- kalıntıya sırasıyla
- 3 ml kloroform
- 2 ml etil asetat ilave edildi
- 5 dakika vortekslendi
- santrifüjlendi (60 rpm10 dak)
- tekrar organik faz alındı ve organik fazlar birleştirildi
- 40°C de azot gazı altında uçuruldu

- kalıntı 5 ml etanolde çözüldü
- 30 saniye vortekslendi
- kuvarz küvetlere konuldu

Not: Kör numune, Metimazol ihtiva etmeyen plazma örneğinin ekstraksiyonu ile yapılarak elde edildi.

3.5.Biyoanalitik Yöntem Validasyonu

Metimazol'un analizinde kullanılan yöntemlerin validasyonu "International Conference on Harmonisation Guidelines" de kabul edilen analitiksel yöntem validasyonu esas alınarak gerçekleştirilmiştir²¹.

3.6.Tabletlerin Hazırlanması

20 adet tabletin ağırlığı belirlendi, iyice toz haline gelinceye kadar öğütüldü ve iyice harmanlandı. Bu karışımdan 5 mg Metimazol olacak şekilde belirli bir miktarda tartılarak 100 ml'lik balon jøjeye koyuldu. Spektrofotometrik çalışma için, etanol ilave edilip karıştırılarak çözüldü ve sonra hacim 100 ml ye tamamlandı. Kromatografik çalışma için, metanol ilave edilip karıştırılarak çözüldü ve sonra hacim 100 ml ye tamamlandı. Daha sonra süzüldü ve gerekli derişimdeki çözeltiler hazırlanıp analizleri yapıldı.

3.7.Stabilite

Stabilite çalışmalarında farklı derişimlerde hazırlanan Metimazol çözeltileri laboratuvar şartlarında üç gün süresince incelenerek bozunmadan stabil kaldığı tespit edilmiştir.

4.BULGULAR

4.1. Metimazol'ün Saflık Kontrolü

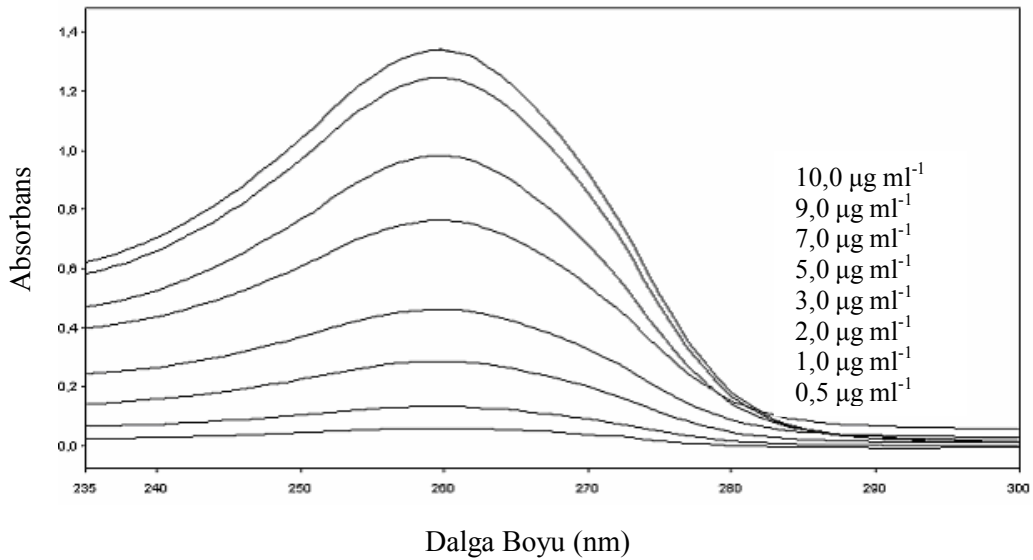
Novagenix'den elde edilen Metimazol'ün saflık kontrolü ^1H NMR alınarak saflığı teyit edildi (Ek 1.).

4.2.UV-Görünür Bölge Spektrofotometri Yöntemi

4.2.1. İn-Vitro Çalışması

4.2.1.1.Standart Çözeltilerin Hazırlanması ve Spektrumların Alınması

Analitik grade etanolde 0,5, 1, 2, 3, 5, 7, 9 ve 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişim aralığında hazırlanan Metimazol standart çözeltilerinin UV-Görünür Bölge Spektrofotometrisi spektrumları 259 nm dalga boyunda absorpsanları okunarak kaydedildi (Şekil 4-1).

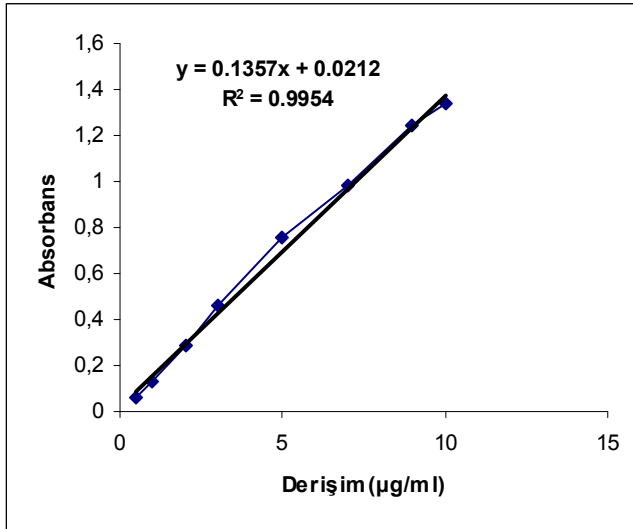


Şekil 4.1: UV-Görünür Bölge spektrofotometrisi çalışmasında Metimazol'ün absorpsiyon spektrumu

4.2.1.2. Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu)

4.2.1.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrileri

0,5 -10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişim aralığında hazırlanan bir seri Metimazol çözeltilerinin derişimlerine karşı UV-Görünür Bölge Spektrofotometrisi absorbansları grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: UV-Görünür Bölge spektrofotometrisi yönteminde Metimazol standart çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi

UV-Görünür Bölge spektrofotometrisi çalışmasında standart metimazol çözeltileri için elde edilen regresyon eşitliğinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.1'de verildi.

Tablo 4.1: UV-Görünür Bölge spektrofotometrisi çalışmalarda Metimazol'un standart çözeltilerinin istatistiksel analiz sonuçları (n:6)

Metod	Dalga boyu (nm)	Doğrusal Aralık ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	LR	Sa	Sb	r
UV-Görünür Bölge Spektrofotometrisi	259	0,5-10,0	A =0,1357x+0,0212	0,0005	0,0003	0,9977

LR: Regrasyon Doğ.Denklemi Sa: Regrasyon doğrusundaki kaymanın standart sapması r: Korelasyon katsayısı Sb: Regrasyon doğrusu eğiminin standart sapması A: Absorbans x: Derişim ($\mu\text{g ml}^{-1}$)

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

Kalibrasyon eğrisinin en küçük değeri olan $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ den daha küçük derişimlerde bir seri çözelti hazırlandı ve absorbansları ölçüldü. Spektrofotometri ile belirlenebildiği en düşük derişim LOD ve tayin edilebilme sınırındaki en düşük değer de LOQ olarak alındı. Bu çalışmada LOD değeri $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$, LOQ değeri de $0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$ olarak belirlendi.

4.2.1.2.3. Doğruluk

Doğruluk çalışmaları için Metimazol'un 4 farklı derişiminin ($8, 6, 4$ ve $2 \mu\text{g ml}^{-1}$) ölçülen absorbans değerleri, standart Metimazol çözeltisinin kalibrasyon eğrisinde yerine koyularak derişimleri bulunmuş olup standart sapma ve doğruluk değerleri Tablo 4.2' de verildi.

Tablo 4.2: UV-Görünür Bölge spektrofotometrisi çalışmasında Metimazol'un standart çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası bulunan doğruluk değerleri

Derişim (μgml^{-1})	Gün-içi			Günler-arası		
	Bulunan (μgml^{-1})	Standart.sapması	Doğruluk	Bulunan (μgml^{-1})	Standart.sapması	Doğruluk
2,000	2,158	0,012	+7,900	2,090	0,073	+4,500
4,000	4,300	0,023	+7,500	4,312	0,010	+7,798
6,000	6,045	0,025	+0,750	6,070	0,014	+1,166
8,000	8,390	0,035	+4,875	8,510	0,092	+6,375

Doğruluk : (%bağıl hata): (bulunan-eklenen)/eklenenx100

4.2.1.2.4. Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik

Yöntemin kesinliği ve tekrarlanabilirliği gün-içi ve günler arası değişkenler ile belirlendi. Gün-içi ve günler-arası kesinlik sonuçları, bulunan değerlerin ortalaması,

standart sapması ve bağıl standart sapması ile verildi. Absorbans spektrumları için gün-içi ve günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik sonuçları Tablo 4.3' de verildi.

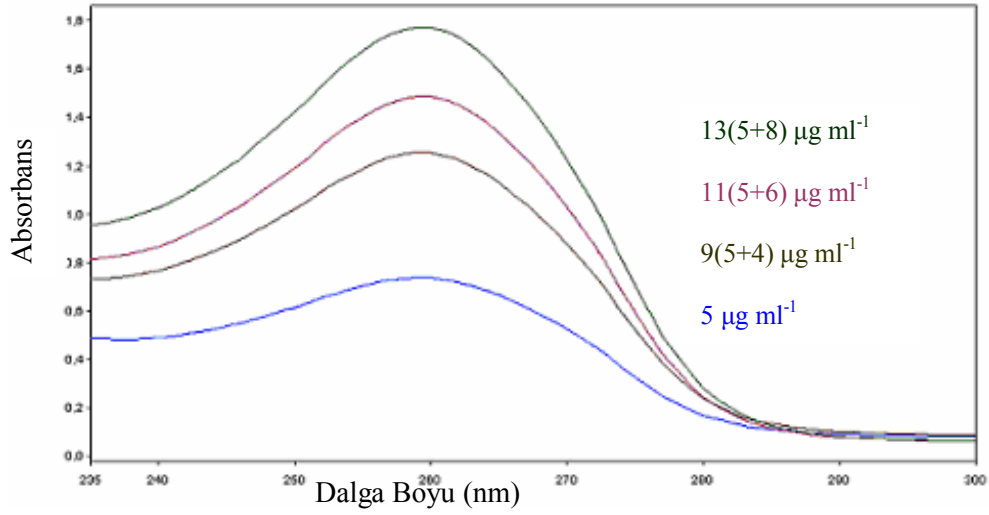
Tablo 4.3:UV-Görünür Bölge spektrofotometrisi çalışmasında Metimazol'un gün-içi ve günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik değerleri

Derişim (μgml^{-1})	Gün-İçi				Günler-Arası			
	Abs	X	SD	%RSD	Abs	X	SD	% RSD
2	0,315 0,315 0,315 0,315 0,314 0,314	0,315	0,001	0,159	0,291 0,292 0,311 0,311 0,315 0,315	0,306	0,011	3,695
4	0,608 0,607 0,606 0,606 0,605 0,605	0,606	0,001	0,198	0,606 0,606 0,605 0,605 0,608 0,608	0,606	0,001	0,231
6	0,843 0,843 0,843 0,841 0,842 0,840	0,842	0,001	0,154	0,842 0,844 0,850 0,850 0,843 0,843	0,845	0,004	0,426
8	1,163 1,161 1,162 1,160 1,159 1,158	1,1605	0,0019	0,164	1,178 1,180 1,191 1,191 1,160 1,161	1,177	0,014	1,173

Abs: Absorbans, X:ortalama, SD: standart sapma, %RSD: bağıl standart sapma

4.2.1.2.5.Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Yöntem, 5 mg Metimazol içeren Thyromazol ticari preparata uygulandı. Thyromazol'den $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ lik çözeltisi bölüm 3.6'da belirtildiği şekilde hazırlandı. Thyromazol'den $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ lik çözeltinin absorbans spektrumları ve tablet çözeltisine 4, 6 ve $8 \mu\text{g ml}^{-1}$ lik standart çözeltiler eklenerek elde edilen değerler yüzde geri kazanım olarak belirlendi. UV-Görünür Bölge spektrumları Şekil 4.3 ve elde edilen yüzde geri kazanım değerleri Tablo 4.4 'de verildi.



Şekil 4.3: UV-Görünür Bölge spektrofotometrisi çalışmasında Metimazol içeren Thyromazol tablet çözeltilerinin ($5\text{-}13\mu\text{g ml}^{-1}$) absorpsiyon spektrumu

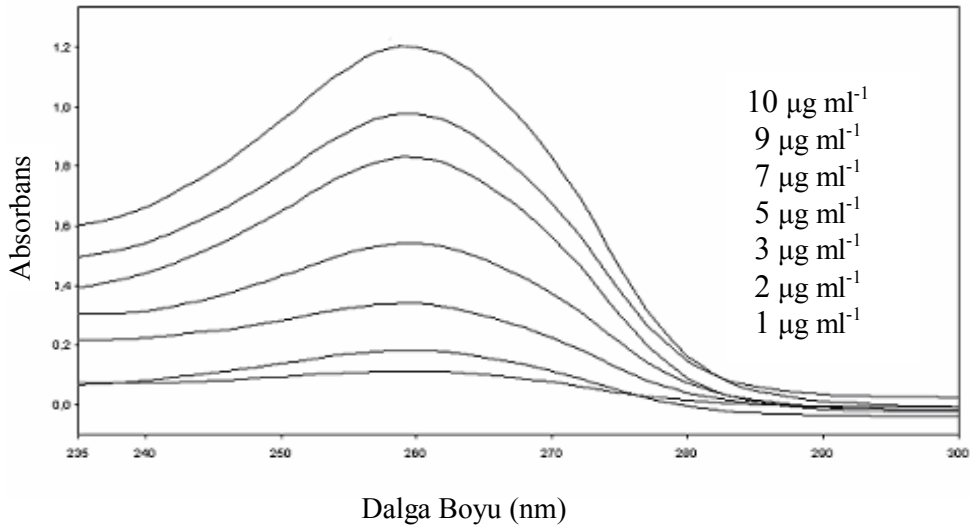
Tablo 4.4: UV-Görünür Bölge spektrofotometrisi çalışmasında Metimazol içeren Thyromazol tablet çözeltilerinin yüzde geri kazanım değerleri

Thyromazol Tablet Konsantrasyonu (μgml^{-1})	Eklene Standart Konsantrasyonu (μgml^{-1})	Bulunan \pm STD Sapma(μgml^{-1})	% R.S.D	% Geri Kazanım
5,000	-	5,265 \pm 0,005	0,10	105
5,000	4,000	9,087 \pm 0,005	0,05	101
5,000	6,000	10,807 \pm 0,006	0,05	98
5,000	8,000	12,921 \pm 0,008	0,06	99

4.2.2. Plazma Çalışması

4.2.2.1. Plazma Standart Çözeltilerin Hazırlanması

$100\ \mu\text{g ml}^{-1}$ stok çözelti hazırlandı. Yakutiye Araştırma Hastanesi Kan Merkezinden temin edilen plazma örneklerine hazırlanan stok çözeltilerden değişen miktarlarda eklenip bölüm 3.4'de belirtilen ekstraksiyon prosesi uygulandı. Metimazol'un plazmadan ekstraksiyonuyla elde edilen çözeltilerin absorbands spektrumu alındı (Şekil 4.4).

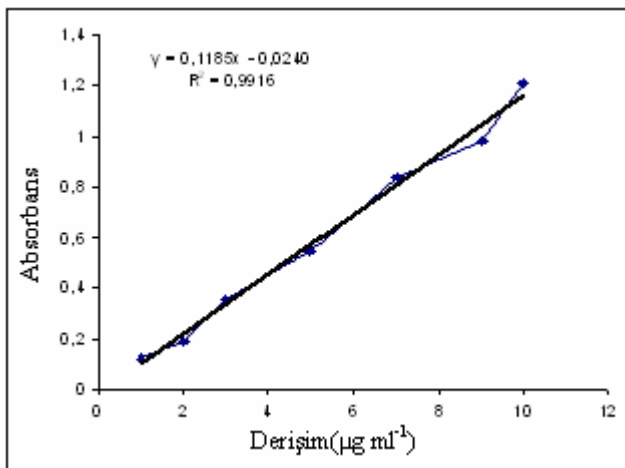


Şekil 4.4: UV-Görünür Bölge spektrofotometrisi plazma çalışmasında Metimazol'un plazmadan 1-10 µg ml⁻¹ derişimi aralığındaki çözeltilerin absorpsiyon spektrumu

4.2.2.2. Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu)

4.2.2.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi

Metimazol'un plazmadan ekstraksiyonu ile elde edilen 1-10 µg ml⁻¹ derişim aralığında Metimazol'un derişimine karşı okunan absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edildi ve Şekil 4.5'de verildi.



Şekil 4.5: UV-Görünür Bölge spektrofotometrisi plazma çalışmasında Metimazol'un kalibrasyon eğrisi

UV-Görünür Bölge spektrofotometrisi plazma çalışmasında Metimazol çözeltileri için elde edilen regresyon eşitliğinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.5’de verildi.

Tablo 4.5: UV-Görünür Bölge spektrofotometrisi plazma çalışmasında Metimazol’ün istatistiksel analiz sonuçları(n:6)

Metod	Dalga boyu (nm)	Doğrusal Aralık ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	LR	Sa	Sb	r
UV-Görünür Bölge Spektrofotometrisi	259	1-10	$A = 0,1185x - 0,0240$	0,0059	0,0001	0,9958

LR: Regrasyon Doğru Denklemi Sa: Regrasyon doğrusundaki kaymanın standart sapması r: Korelasyon katsayısı Sb: Regrasyon doğrusu eğiminin standart sapması A: Absorbans x: Derişim ($\mu\text{g ml}^{-1}$)

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

Plazma çalışmasında kalibrasyon eğrisinin en küçük değeri olan $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ den daha küçük derişimlerde bir seri çözeltiler hazırlandı. LOD değeri için $0,9 \mu\text{g ml}^{-1}$, LOQ değeri için $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ olarak belirlendi.

4.2.2.2.3. Doğruluk

Doğruluk çalışmaları için Metimazol’ün 3 farklı derişiminin ($8, 6$ ve $2 \mu\text{g/ml}$) ölçülen pik alanları, standart Metimazol çözeltilerinin kalibrasyon eğrisinde yerine koyularak derişimleri bulunup ve standart sapma ile doğruluk değerleri bulundu ve Tablo 4.6’da verildi.

Tablo 4.6: UV-Görünür Bölge spektrofotometrisi çalışmasında plazmadan ekstrakte edilen Metimazol’ün gün-içi ve günler-arası bulunan değerlerin doğruluk değerleri

Gün- içi				Günler -arası		
Derişim (μgml^{-1})	Bulunan	Standart sapma	Doğruluk	Bulunan (μgml^{-1})	Standart sapma	Doğruluk
2,000	1,790	0,005	-10,480	1,831	0,023	-8,440
6,000	5,549	0,005	-7,525	5,494	0,082	-8,438
8,000	8,086	0,012	+1,071	7,629	0,343	-4,643

Doğruluk : (%bağıl hata): $(\text{bulunan} - \text{eklenen}) / \text{eklenen} \times 100$

4.2.2.2.4. Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik

Yöntemin kesinliği ve tekrarlanabilirliği gün-içi ve günler-arası değişkenler ile belirlendi. Gün-içi ve günler-arası kesinlik sonuçları, absorbans değerlerin ortalaması, standart sapması ve bağıl standart sapması ile verildi (Tablo 4.7).

Tablo 4-7: UV-Görünür Bölge spektrofotometrisi çalışmasında plazmadan ekstrakte edilen Metimazol'un gün-içi ve günler arası kesinlik sonuçları

Derişim (μgml^{-1})	Gün-içi				Günler-Arası			
	Abs	X	SD	%RSD	Abs	X	SD	% RSD
2	0,179 0,184 0,187 0,190 0,193 0,196	0,188	0,006	3,294	0,190 0,190 0,193 0,193 0,196 0,196	0,193	0,003	1,399
6	0,634 0,634 0,634 0,633 0,633 0,633	0,634	0,001	0,079	0,633 0,634 0,634 0,634 0,615 0,614	0,627	0,010	1,578
8	0,932 0,933 0,934 0,935 0,935 0,936	0,934	0,002	0,161	0,853 0,854 0,854 0,854 0,932 0,933	0,880	0,041	4,614

Abs: Absorbans, X: ortalama, SD: standart sapma, %RSD: bağıl standart sapma

4.2.2.2.5. Plazmadan Geri Kazanım

Geri kazanım çalışması, belirli derişimlerde Metimazol plazmaya eklenip sonra ekstraksiyonun yapılması sonucunda elde edilen değerler standart Metimazol çözeltileriyle elde edilen değerler ile ilişkilendirilerek yüzde geri kazanım değerleri elde edildi (Tablo 4.8).

Tablo 4.8: Plazma çalışmasında metimazol'e ait geri kazanım değerleri (n=6)

Eklene ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Bulunan\pmSD ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Geri Kazanım (%)
10,000	8,745 \pm 0,033	87,446
9,000	7,067 \pm 0,031	78,520
7,000	5,997 \pm 0,044	85,671
5,000	3,869 \pm 0,046	77,372
3,000	2,387 \pm 0,054	79,580
2,000	1,230 \pm 0,046	61,520
1,000	0,699 \pm 0,025	69,860

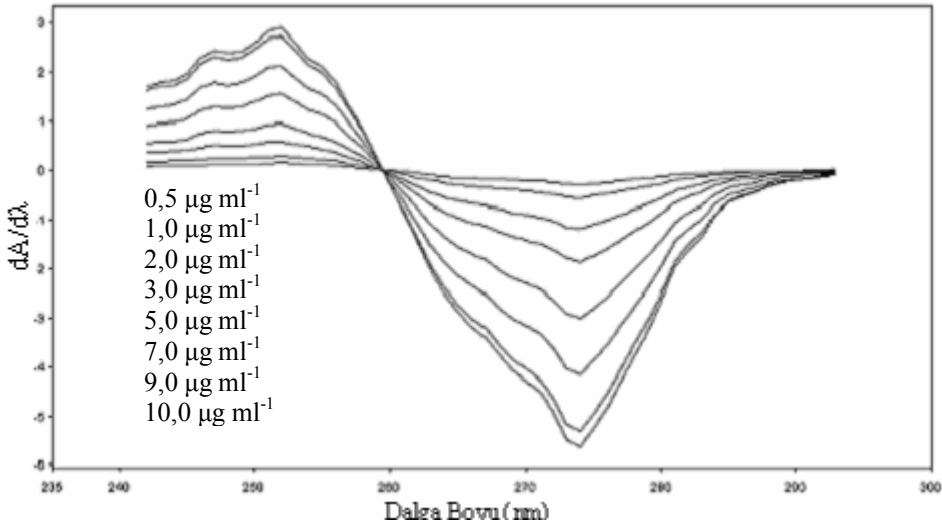
SD: standart sapma

4.3. Birinci Derece Türev Spektrofotometri Yöntemi

4.3.1. İn-Vitro Çalışması

4.3.1.2. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Analitik grade etanolde 0,5, 1, 2, 3, 5, 7, 9 ve 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişim aralığında hazırlanan Metimazol standart çözeltilerinin Birinci Türev Spektrofotometrisi spektrumları 252 nm dalga boyunda absorpsanları okunarak kaydedildi (Şekil 4.6).

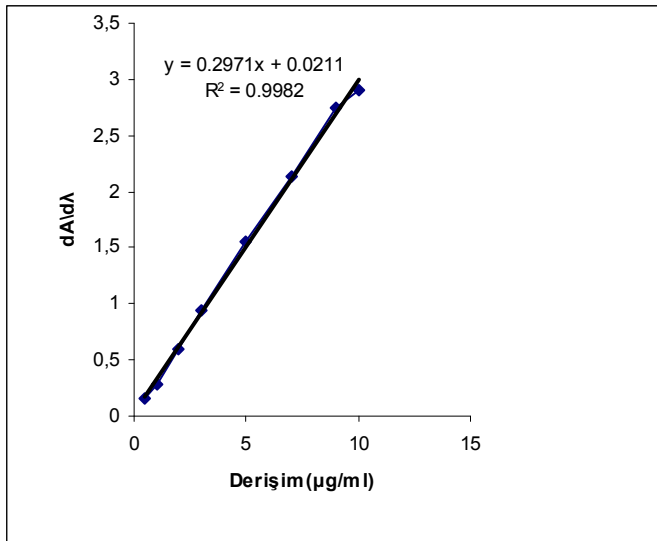


Şekil 4.6: Birinci Türev spektrofotometrisi çalışmasında Metimazol'un absorpsiyon spektrumu

4.3.1.3. Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu)

4.3.1.3.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrileri

0.5 -10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişim aralığında hazırlanan bir seri Metimazol çözeltilerinin derişimlerine karşı Birinci Türev çalışmasında maksimum absorbans verdiği 252 nm dalga boyunda okunan absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesi suretiyle kalibrasyon eğrisi elde edildi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: Birinci Türev spektrofotometrisi yönteminde Metimazol standart çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi

Birinci Türev spektrofotometrisi çalışmasında standart Metimazol çözeltileri için elde edilen regresyon eşitliğinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.9'da verildi.

Tablo 4.9: Birinci Türev spektrofotometrisi çalışmasında Metimazol'un standart çözeltilerinin istatistiksel analiz sonuçları (n:6)

Metod	Dalga boyu (nm)	Doğrusal Aralık ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	LR	Sa	Sb	r
Birinci Türev Spektrofotometri	252	0,5-10,0	$y=0,2971x+0,0211$	0,0027	0,0005	0,9990

LR: Regrasyon Doğ.Denklemi Sa: Regrasyon doğrusundaki kaymanın standart sapması r: Korelasyon katsayısı
Sb:Regrasyon doğrusu eğiminin standart sapması y: Absorbans x: Derişim ($\mu\text{g ml}^{-1}$)

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

Kalibrasyon eğrisinin en küçük değeri olan $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ den daha küçük derişimlerde bir seri çözelti hazırlandı ve absorbanları ölçüldü. Birinci türev spektrofotometrisi ile belirlenebilen en düşük derişim LOD ve tayin edilebilme sınırındaki en düşük değer de LOQ olarak alındı. Bu çalışmada LOD değeri $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$, LOQ değeri de $0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$ olarak belirlendi.

4.3.1.3.3. Doğruluk

Doğruluk çalışmasında, 3 farklı derişimde hazırlanan Metimazol ($8, 6$ ve $2 \mu\text{g ml}^{-1}$) çözeltileri için gün-içi ve günler-arası okunan absorban değerleri, kalibrasyon eğrisinde yerine koyularak bulunan değerlerin standart sapması ve doğruluk değerleri elde edildi ve sonuçlar Tablo 4.10' da verildi.

Tablo 4.10: Birinci Türev spektrofotometrisi çalışmasında Metimazol'un standart çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası doğruluk değerleri

Derişim (μgml^{-1})	Gün-içi			Günler-arası		
	Bulunan (μgml^{-1})	Standart sapma	Doğruluk	Bulunan (μgml^{-1})	Standart sapma	Doğruluk
2,000	2,037	0,011	+1,840	2,028	0,014	+1,390
6,000	5,919	0,017	-1,353	5,977	0,070	-0,390
8,000	8,120	0,021	+1,500	8,225	0,104	+2,818

Doğruluk : (%bağl hata): (bulunan-eklenen)/eklenenx100

4.3.1.3.4. Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik

Yöntemin kesinliği ve tekrarlanabilirliği gün-içi ve günler arası değişkenler ile belirlendi. Gün-içi ve günler arası kesinlik sonuçları, bulunan değerlerin ortalaması,

standart sapması ve bağıl standart sapması ile verildi. Absorbans spektrumları için gün-içi ve günler-arası kesinlik sonuçları Tablo 4.11' de verildi.

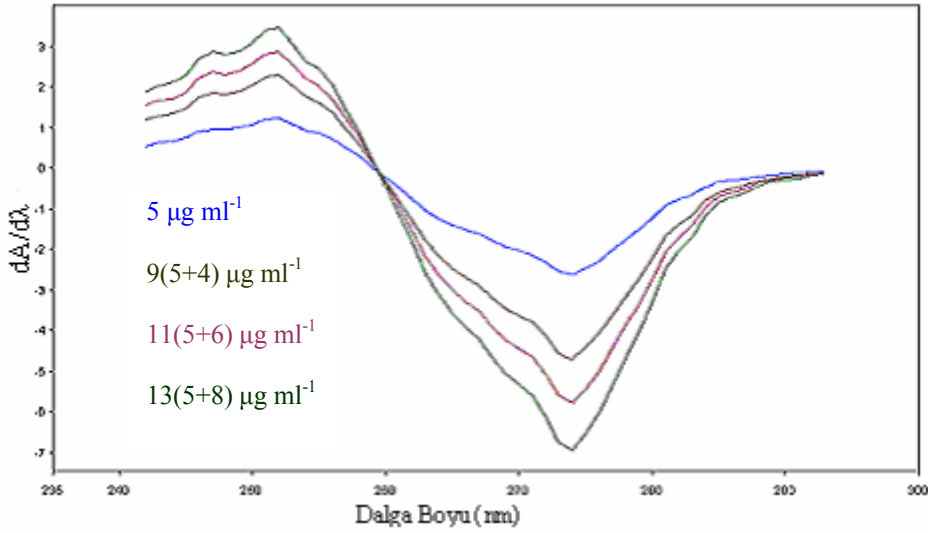
Tablo 4.11: Birinci Türev spektrofotometrisi çalışmasında Metimazol'un standart çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik sonuçları

Derişim (μgml^{-1})	Gün-İçi				Günler-Arası			
	Abs	X	SD	%RSD	Abs	X	SD	% RSD
2	0,630 0,628 0,626 0,624 0,621 0,629	0,626	0,003	0,543	0,626 0,617 0,626 0,628 0,624 0,621	0,624	0,004	0,641
6	1,776 1,780 1,774 1,787 1,777 1,784	1,780	0,005	0,281	1,798 1,792 1,816 1,825 1,774 1,776	1,797	0,021	1,152
8	2,429 2,426 2,433 2,432 2,442 2,440	2,434	0,006	0,255	2,489 2,464 2,489 2,493 2,426 2,429	2,465	0,031	1,250

Abs: Absorbans, X:ortalama, SD: standart sapma, %RSD: bağıl standart sapma

4.3.1.3.5. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Yöntem, 5 mg Metimazol içeren Thyromazol ticari preparata uygulandı. Thyromazol'den $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ lik çözeltisi bölüm 3.6'da belirtildiği şekilde hazırlandı. Thyromazol'den $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ lik çözeltinin absorbans spektrumları ve tablet çözeltisine 4, 6 ve $8 \mu\text{g ml}^{-1}$ lik standart çözeltiler eklenerek elde edilen değerler yüzde geri kazanım olarak belirlendi. Birinci Türev spektrumları Şekil 4.8 ve elde edilen yüzde geri kazanım değerleri Tablo 4.12 'de verildi.



Şekil 4.8: Birinci Türev spektrofotometrisi çalışmasında Metimazol içeren Thyromazol tablet çözeltilerinin ($5\text{-}13\mu\text{g ml}^{-1}$) spektrumu

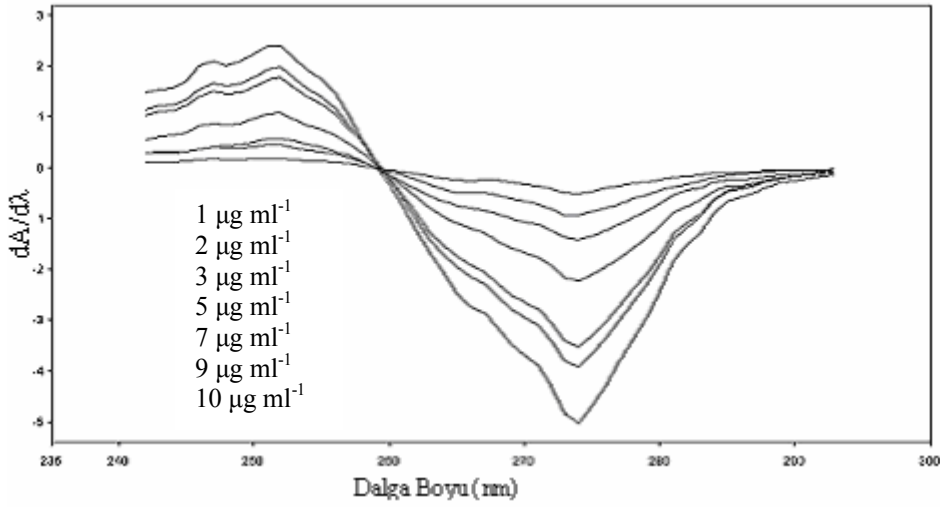
Tablo 4.12: Birinci Türev spektrofotometrisi çalışmasında Metimazol içeren Thyromazol tablet çözeltilerinin yüzde geri kazanım değerleri

Thyromazol Tablet Çözelti Derişimi (μgml^{-1})	Eklenen Standart Çözelti Derişimi (μgml^{-1})	Bulunan \pm STD (μgml^{-1})	% R.S.D	% Geri Kazanım
5,000	-	5,075 \pm 0,001	0,02	102
5,000	4,000	8,996 \pm 0,008	0,09	100
5,000	6,000	10,927 \pm 0,017	0,16	99
5,000	8,000	12,882 \pm 0,025	0,19	99

4.3.2. Plazma Çalışması

4.3.2.1. Plazma Standart Çözeltilerin Hazırlanması

$100\ \mu\text{g ml}^{-1}$ stok çözelti hazırlandı. Yakutiye Araştırma Hastanesi Kan Merkezinden temin edilen plazma örneklerine hazırlanan stok çözeltilerden değişen miktarlarda eklenip bölüm 3.4'de belirtilen ekstraksiyon prosesi uygulandı. Metimazol'un plazmadan ekstraksiyonuyla elde edilen çözeltilerin absorban spektrumu alındı (Şekil 4.9).

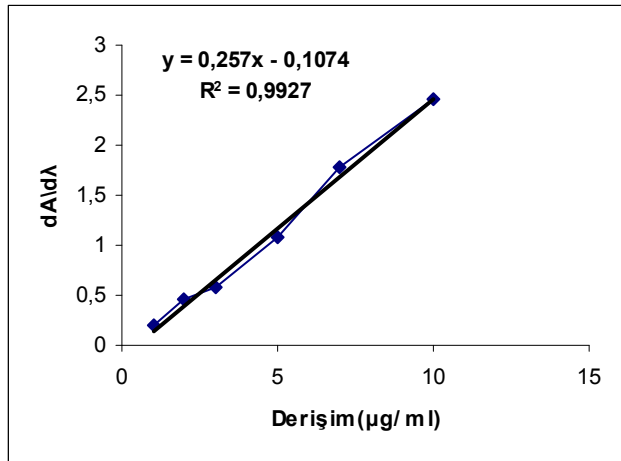


Şekil 4.9: Birinci Türev spektrofotometrisi plazma çalışmasında Metimazol'un plazmadan 1-10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişimi aralığındaki çözeltilerinin spektrumu

4.3.2.2. Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu)

4.3.2.2.1. Doğrusal Aralık Ve Kalibrasyon Eğrisi

Metimazol'un plazmadan ekstraksiyonu ile elde edilen 1-10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişim aralığında Metimazol'un derişimine karşı okunan absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edildi ve Şekil 4.10'da verildi.



Şekil 4.10: Birinci Türev spektrofotometrisi çalışmasında Metimazol'un plazma kalibrasyon eğrisi

Birinci Türev spektrofotometrisi plazma çalışmasında Metimazol çözeltileri için elde edilen regresyon eşitliğinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.13'te verildi.

Tablo 4.13: Birinci Türev spektrofotometrisi plazma çalışmasında Metimazol'un istatistiksel analiz sonuçları(n:6)

Metod	Dalga boyu (nm)	Doğrusal Aralık ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	LR	Sa	Sb	r
Birinci Türev Spektrofotometrisi	252	1-10	$y = 0,257x - 0,1074$	0,0048	0,0009	0,9963

LR: Regrasyon Doğ.Denklemi Sa: Regrasyon doğrusundaki kaymanın standart sapması r: Korelasyon katsayısı
Sb:Regrasyon doğrusu eğiminin standart sapması y: Absorbans x: Derişim ($\mu\text{g ml}^{-1}$)

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

Plazma çalışmasında kalibrasyon eğrisinin en küçük değeri olan $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ den daha küçük derişimlerde bir seri çözelti hazırlandı. Birinci Türev Spektrofotometrisi ile belirlenebilen en düşük derişim LOD ve tayin edilebilme sınırındaki en düşük değer de LOQ olarak alındı. Bu çalışmada LOD değeri $0,9 \mu\text{g ml}^{-1}$, LOQ değeri de $1,0 \mu\text{g ml}^{-1}$ olarak belirlendi

4.3.2.2.3.Doğruluk

Birinci türev spektrofotometrisi doğruluk çalışmasında 3 farklı derişim (8, 6 ve $2 \mu\text{g ml}^{-1}$) de hazırlanıp, plazmaya eklenip ekstraksiyonu yapılmış Metimazol çözeltileri için okunan absorbans değerleri plazma kalibrasyon eğrisinde yerine koyularak derişimleri bulunup, bu değerlerin standart sapması ve doğruluk değerleri elde edildi (Tablo 4.14).

Tablo 4.14: Birinci Türev spektrofotometrisi plazma çalışmasında Metimazol'un gün-içi ve günler-arası bulunan doğruluk değerleri

Derişim (μgml^{-1})	Gün-içi			Günler-arası		
	Bulunan (μgml^{-1})	Standart sapma	Doğruluk	Bulunan (μgml^{-1})	Standart sapma	Doğruluk
2,0000	2,1987	0,0140	+9,9350	2,1922	0,0159	+9,6100
6,0000	5,3965	0,0100	-10,0583	5,3978	0,0117	-10,0360
8,0000	8,1351	0,0359	+1,6888	8,1157	0,0213	+1,4463

Doğruluk : (%bağlı hata): (bulunan-eklenen)/eklenenx100

4.3.2.2.4. Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik

Yöntemin kesinliği ve tekrarlanabilirliği gün-içi ve günler-arası değişkenler ile belirlendi. Gün-içi ve günler-arası bulunan değerlerin ortalaması, standart sapması ve bağıl standart sapması ile verildi (Tablo 4.15)

Tablo 4.15: Birinci Türev spektrofotometrisi çalışmasında plazmadan ekstrakte edilen Metimazol'un gün-içi ve günler arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik sonuçları

Derişim (μgml^{-1})	Gün-İçi				Günler-Arası			
	Abs	X	SD	%RSD	Abs	X	SD	% RSD
2	0,451 0,456 0,459 0,460 0,460 0,460	0,458	0,004	0,787	0,451 0,451 0,456 0,459 0,459 0,460	0,456	0,004	0,899
6	1,275 1,283 1,279 1,280 1,280 1,280	1,280	0,003	0,203	1,283 1,283 1,280 1,279 1,275 1,279	1,280	0,003	0,234
8	1,992 1,973 1,985 1,977 1,977 1,996	1,983	0,009	0,464	1,977 1,973 1,985 1,985 1,973 1,977	1,978	0,006	0,278

Abs:Absorbans,X:ortalama, SD: standart sapma, %RSD: bağıl standart sapma

4.3.2.2.5.Plazmadan Geri Kazanım

Geri kazanım çalışması, belirli derişimlerde metimazol plazmaya eklenip sonra ekstraksiyonun yapılması sonucunda elde edilen değerler standart Metimazol

çözeltileriyle elde edilen değerleriyle ilişkilendirilerek yüzde geri kazanım değerleri elde edildi (Tablo 4.16).

Tablo 4.16: Birinci Türev Spektrometrisi plazma çalışmasında Metimazol'e ait geri kazanım değerleri (n=6)

Derişim ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Bulunan \pm SD ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Geri Kazanım (%)
10,000	8,210 \pm 0,019	82,1020
9,000	6,622 \pm 0,047	73,5722
7,000	5,902 \pm 0,048	84,3100
5,000	3,563 \pm 0,022	71,2500
3,000	1,894 \pm 0,023	63,1166
2,000	1,469 \pm 0,012	73,4700
1,000	0,575 \pm 0,007	57,4700

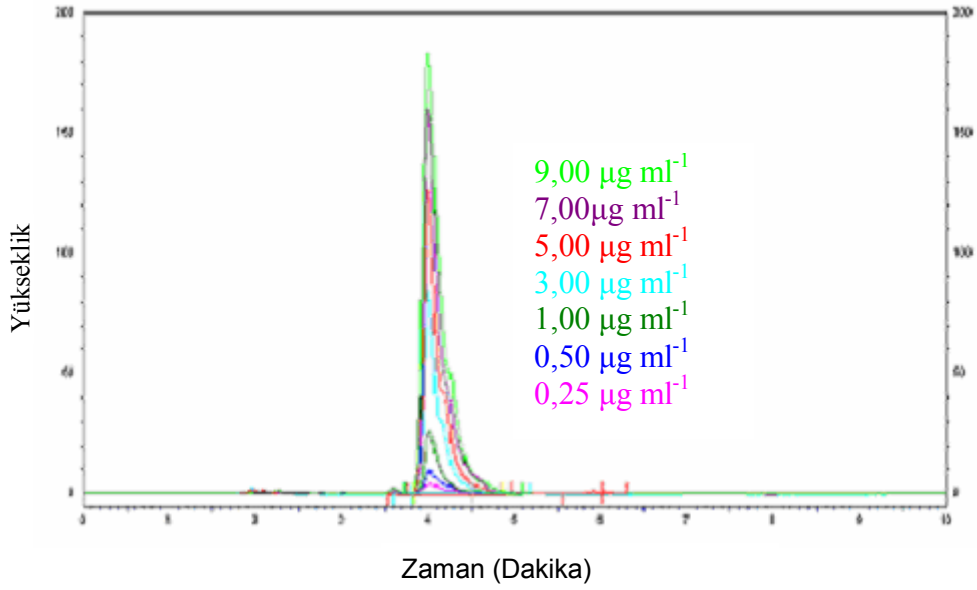
SD: standart sapma

4.4. HPLC-DAD Yöntemi

4.4.1. İn-Vitro Çalışması

4.4.1.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

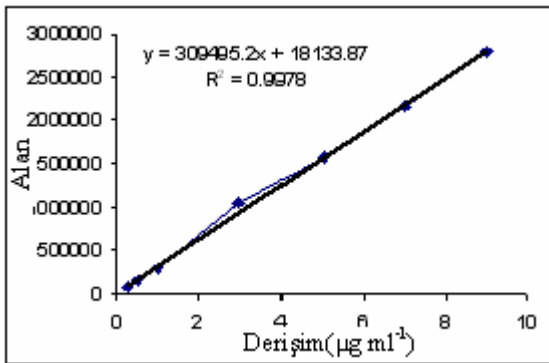
100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişiminde metanolde Metimazol stok çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden belirli hacimlerde alınıp HPLC grade metanol ile seyreltilerek 0,25, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişimlerinde standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan bütün çözeltiler 45 μm çapındaki filtrelerden süzülerek viallere konuldu. Cihazda 200-780 nm dalga boyu aralığında tarama yapıldı ve uygun dalga boyu olarak 254 nm seçildi. Hazırlanan çalışma çözeltilerinin sinyalleri Diyod Array Dedektör ile kaydedildi. Elde edilen kromatogram Şekil 4.11 de verildi.



Şekil 4.11: HPLC-DAD sisteminde 0,25-9,00 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişim aralığındaki Metimazol standart çözeltilerinin kromatogramı

4.4.1.2.Yöntem Validasyonu 4.4.1.2.1.Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrileri

Kalibrasyon eğrisi Metimazol'ün derişimine karşı elde edilen piklerin alanlarının grafiğe geçirilmesi ile elde edildi(Şekil 4.12)



Şekil 4.12: HPLC-DAD sisteminde Metimazol'ün standart çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi

HPLC-DAD çalışmasında standart Metimazol çözeltileri için elde edilen regresyon eşitliğinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.17'de verildi.

Tablo 4.17: HPLC-DAD sisteminde Metimazol standart çözeltilerinin istatistiksel analiz sonuçları

Yöntem	Dalga boyu (nm)	Doğrusal Aralık ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	LR	Sa	Sb	r
HPLC-DAD	254	0,25-9,00	$y=309495,2x+18133,87$	8039,341	5420,198	0,9989

LR: Regrasyon Doğ.Denklemi Sa: Regrasyon doğrusundaki kaymanın standart sapması r: Korelasyon katsayısı
Sb: Regrasyon doğrusu eğiminin standart sapması y: Peak-alan oranı x: Derişim ($\mu\text{g ml}^{-1}$)

4.4.1.2.2. Gözlenebilirlik Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Kalibrasyon eğrisinin en düşük değeri olan $0,25 \mu\text{g ml}^{-1}$ den daha küçük derişimlerde bir seri çözelti hazırlandı. HPLC-DAD sisteminde sinyal/gürültü oranı 3 olduğu derişim LOD ve sinyal/gürültü oranı 10 olduğu derişimde LOQ olarak alındı. Bu çalışmada LOD değeri $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$, LOQ değeri de $0,25 \mu\text{g ml}^{-1}$ olarak belirlendi.

4.4.1.2.3. Doğruluk

HPLC yöntemi doğruluk çalışmasında 3 farklı derişimde ($0,75$, 4 ve $8 \mu\text{g ml}^{-1}$) hazırlanan Metimazol çözeltileri için elde edilen HPLC piklerinin alanları, kalibrasyon eğrisinde yerine koyularak derişimleri bulundu. Bu değerlerin standart sapması ve doğruluk değerleri belirlendi (Tablo 4.18).

Tablo 4.18: HPLC-DAD sisteminde Metimazol çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası bulunan doğruluk değerleri

Derişim (μgml^{-1})	Gün-içi			Günler-arası		
	Bulunan (μgml^{-1})	Standart sapma	Doğruluk	Bulunan (μgml^{-1})	Standart sapma	Doğruluk
0,750	0,725	0,026	-3,307	0,728	0,012	-3,000
4,000	3,963	0,053	-0,925	4,071	0,065	+1,773
8,000	7,904	0,110	-1,196	8,249	0,169	+3,110

Doğruluk : (%bağıl hata): $(\text{bulunan-eklenen})/\text{eklenen} \times 100$

4.4.1.2.4. Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik

Yöntemin kesinliği ve tekrarlanabilirliği gün-içi ve günler arası değişkenler ile belirlendi. Gün-içi ve günler arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik sonuçları, bulunan değerlerin ortalaması, standart sapması ve bağıl standart sapması ile verildi. Sonuçlar Tablo 4.19’da verildi.

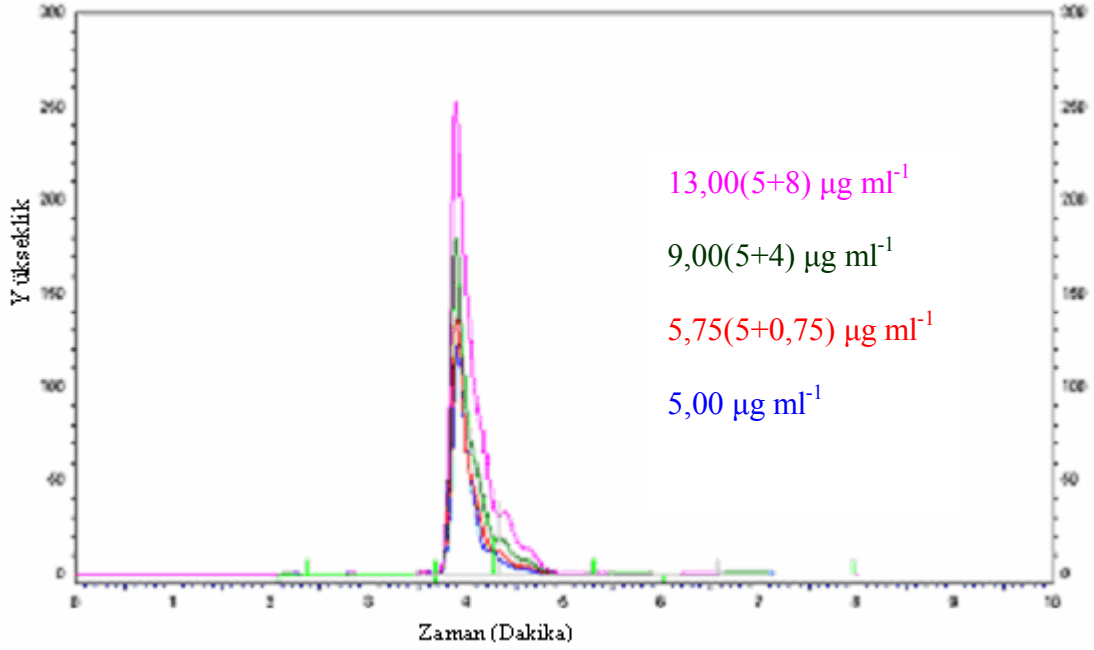
Tablo 4.19: HPLC-DAD sisteminde Metimazol çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik sonuçları

Derişim (μgml^{-1})	Gün-İçi				Günler-Arası			
	Alan	X	SD	%RSD	Alan	X	SD	%RSD
0,75	233976	242594,8	7402,957	3,052	244514	243295,7	4002,270	1,645
	254129				244514			
	244514				247035			
	247035				247035			
	237577				238338			
	238338				238338			
4,00	1276536	1244653	16366,910	1,315	1294999	1278074	20197,020	1,580
	1230641				1285959			
	1234632				1268268			
	1241327				1298744			
	1243939				1276536			
	1240842				1243939			
8,00	2504761	2464481	33952,140	1,378	2504761	2571112	52254,140	2,032
	2505381				2505381			
	2432187				2619009			
	2434204				2612319			
	2468134				2589973			
	2442221				2595228			

X:ortalama, SD: standart sapma, %RSD: bağıl standart sapma

4.4.1.2.5. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Yöntem, 5 mg Metimazol içeren Thyromazol ticari preparata uygulandı. Thyromazol'den $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ lik çözeltisi bölüm 3.6'da belirtildiği şekilde hazırlandı. Bu çözeltinin HPLC kromatogramı alındı ve daha sonra bu çözelti üzerine $0,75$, 4 ve $8 \mu\text{g ml}^{-1}$ lik Metimazol standart çözeltisi eklenerek kromatogramlar alındı (Şekil 4.17). Metimazol kalibrasyon eğrisi yardımıyla yüzde geri kazanım değerleri elde edildi (Tablo 4.20).



Şekil 4.13: HPLC-DAD sisteminde 5-13 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Thyromazol tabletin kromatogramı

Tablo 4.20: HPLC-DAD sisteminde Thyromazol tabletin yüzde geri kazanım değerleri

Thyromazol Tablet Derişimi (μgml^{-1})	Eklenen Standart Çözelti Derişimi (μgml^{-1})	Bulunan \pm STD (μgml^{-1})	% R.S.D	% Geri Kazanım
5,000	-	5,061 \pm 0,059	1,16	101,2190
5,000	0,750	5,469 \pm 0,016	0,29	95,1100
5,000	4,000	8,755 \pm 0,125	1,42	97,2700
5,000	8,000	12,614 \pm 0,137	1,08	97,0300

4.4.1.2.6. Stabilité

Üç farklı derişimde Metimazol çözeltisi hazırlandı ve üç gruba ayrıldı. Birinci grup oda sıcaklığında, ikinci grup buzdolabının alt kısmı kısmı 4°C 'de ve üçüncü grupta -20°C derin dondurucuda 24, 48 ve 72 saat bekletildi. Bu süreler sonunda HPLC-DAD ölçümleri alındı. Elde edilen değerler standart çözelti değerleriyle oranlanarak yüzde olarak verildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.21 de verildi.

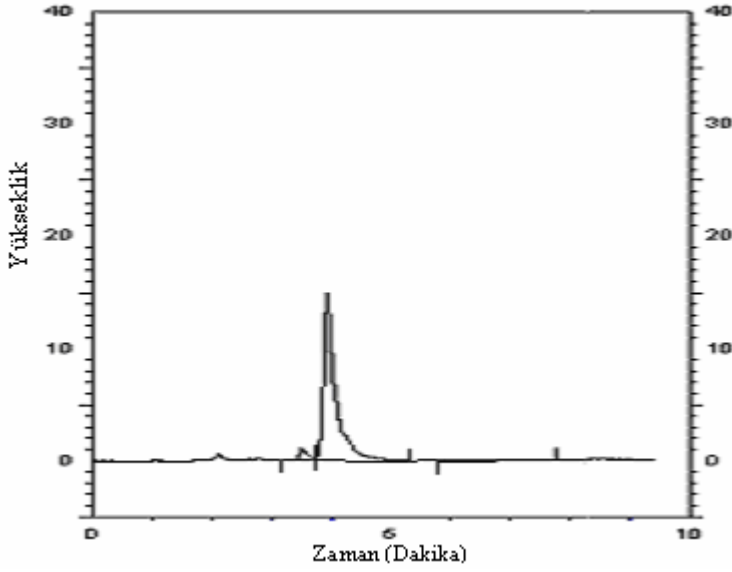
Tablo4.21: Standart Metimazol çözeltilerinin stabilite çalışması

		Derişim ($\mu\text{g ml}^{-1}$)		
Stabilite(% \pm SD) Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	Süre (saat)	0.75($\mu\text{g ml}^{-1}$)	4($\mu\text{g ml}^{-1}$)	8($\mu\text{g ml}^{-1}$)
Stabilite(% \pm SD) Oda Sıc.	24	87,289 \pm 0,003	100,956 \pm 0,021	108,196 \pm 0,028
	48	87,142 \pm 0,001	102,148 \pm 0,012	106,975 \pm 0,092
	72	87,240 \pm 0,000	104,913 \pm 0,080	108,215 \pm 0,028
Stabilite(% \pm SD) Buzdolabında (+4 $^{\circ}\text{C}$)	24	90,027 \pm 0,0132	101,390 \pm 0,0423	103,781 \pm 0,0408
	48	91,164 \pm 0,005	102,543 \pm 0,009	103,269 \pm 0,007
	72	90,173 \pm 0,008	100,770 \pm 0,034	102,175 \pm 0,069
Stabilite(% \pm SD) Derin Dondurucuda (-20 $^{\circ}\text{C}$)	24	94,746 \pm 0,001	102,805 \pm 0,064	103,740 \pm 0,056
	48	91,653 \pm 0,020	100,493 \pm 0,037	101,115 \pm 0,024
	72	90,293 \pm 0,004	101,478 \pm 0,025	103,210 \pm 0,004

4.4.2.Plazma Çalışması

4.4.2.1. Plazma Standart Çözeltilerin Hazırlanması

100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişimde hazırlanmış olan stok çözeltiden kalibrasyon eğrisinin elde edebileceği derişimlerde bir seri Metimazol çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiler Yakutiye Araştırma Hastanesi Kan Merkezi'nden temin edilen plazmaya eklendi, karıştırıldı ve bölüm 3.4'de belirtilen ekstraksiyon işlemi uygulanarak ekstraksiyonu yapıldı. Ekstraktlar HPLC-DAD sistemine enjekte edilerek kromatogramları alındı (Şekil 4.14).

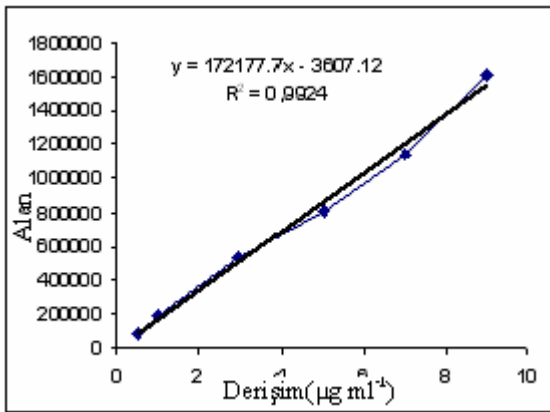


Şekil 4.14: HPLC-DAD sisteminde plazmadan ekstraksiyonla elde edilen $1\mu\text{g ml}^{-1}$ Metimazol çözeltisinin kromatogramı

4.4.2.2.Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu)

4.4.2.2.1.Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi

Kalibrasyon eğrisi plazmadan ekstrakte edilen Metimazol derişimine karşı pik alanları grafiğe geçirilerek elde edildi (Şekil 4.14).



Şekil 4-15: HPLC-DAD plazma çalışmasının kalibrasyon eğrisi

HPLC-DAD sistemi plazma çalışmasında elde edilen regresyon eşitliğinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.22’de verildi.

Tablo 4.22:HPLC-DAD sistemi plazma çalışması regrasyon eşitliğinin istatistiksel analiz sonuçları

Metod	Dalga boyu (nm)	Doğrusal Aralık ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	LR	Sa	Sb	r
HPLC-DAD	254	0,5-9,0	$y = 172177,7x - 3607,12$	7045,677	582,9356	0,9962

LR: Regrasyon Doğ.Denklemi Sa: Regrasyon doğrusundaki kaymanın standart sapması r: Korelasyon katsayısı
Sb:Regrasyon doğrusu eğiminin standart sapması y: Peak-alan oranı x: Derişim ($\mu\text{g ml}^{-1}$)

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

Metimazol'un plazmadan ekstraksiyonuyla elde edilen kalibrasyon eğrisinin en düşük değeri olan $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ den daha küçük derişimlerde bir seri çözelti hazırlanarak karomatogramları alındı. Sinyal/gürültü oranı 3 olduğu derişim LOD ve sinyal/gürültü oranı 10 olduğu derişim değeri de LOQ olarak alındı. Bu çalışmada LOD değeri $0,4 \mu\text{g ml}^{-1}$, LOQ değeri de $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ olarak belirlendi.

4.4.2.2.3.Doğruluk

HPLC yöntemi plazma doğruluk çalışmasında 3 farklı derişimde ($0,75$, 3 ve $8 \mu\text{g ml}^{-1}$) hazırlanan Metimazol çözeltileri plazmaya eklenip ekstrakte edildikten sonra elde edilen HPLC piklerinin alanları, plazma kalibrasyon eğrisinde yerine koyularak derişimleri bulundu. Bu değerlerin standart sapması ve doğruluk değerleri belirlendi (Tablo 4.23).

Tablo 4.23: HPLC-DAD sisteminde plazmadan ekstraksiyonla elde edilen Metimazol'ün gün-içi ve günler-arası bulunan doğruluk değerleri

Derişim (μgml^{-1})	Gün-içi			Günler-arası		
	Bulunan (μgml^{-1})	Standart sapma	Doğruluk	Bulunan (μgml^{-1})	Standart sapma	Doğruluk
0,750	0,699	0,015	-6,813	0,694	0,018	-7,413
3,000	3,132	0,084	+4,396	3,088	0,037	+2,946
8,000	7,667	0,058	-4,160	7,485	0,173	-6,440

Doğruluk : (%bağıl hata): (bulunan-eklenen)/eklenenx100

4.4.2.2.4. Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik

Yöntemin kesinliği ve tekrarlanabilirliği gün-içi ve günler-arası değişkenler ile belirlendi. Gün-içi ve günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik sonuçları, bulunan değerlerin ortalaması, standart sapması ve bağıl standart sapması ile verildi (Tablo 4.24).

Tablo 4.24: HPLC-DAD sisteminde plazmadan ekstraksiyonla elde edilen Metimazol'ün gün-içi günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik sonuçları

Derişim (μgml^{-1})	Gün-İçi				Günler-Arası			
	Alan	X	SD	%RSD	Alan	X	SD	% RSD
0,75	119311 116928 115444 112451 119314 116924	116728,7	2583,76	2,21	119311 119314 116928 115287 112454 112461	115959,2	3111,382	2,68
3,00	521053 519668 528488 543536 548870 552268	535647,2	14372,93	2,68	521053 519668 528488 533536 533870 532268	528147,2	6342,101	1,20
8,00	1317686 1317446 1319205 1320038 1297530 1327217	1316520	9968,435	0,76	1260357 1277440 1292233 1245134 1317686 1317446	1285049	29756,17	2,32

X:ortalama, SD: standart sapma, %RSD: bağıl standart sapma

4.4.2.2.5. Plazmadan Geri Kazanım

Geri kazanım çalışması, belirli derişimlerde hazırlanan Metimazol çözeltileri plazmaya eklenip sonra ekstraksiyonun yapılması sonucunda elde edilen değerler standart metimazol çözeltileri için elde edilen değerler ile ilişkilendirilerek yüzde geri kazanım değerleri elde edildi (Tablo 4.25).

Tablo 4.25: HPLC-DAD sisteminde plazma çalışmasında Metimazol'e ait geri kazanım değerleri (n=6)

Derişim ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Bulunan \pm SD ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Geri Kazanım (%)
9,0	5,157 \pm 0,006	57,2955
7,0	3,626 \pm 0,036	51,7943
5,0	2,533 \pm 0,083	50,6660
3,0	1,672 \pm 0,046	55,7366
1,0	0,561 \pm 0,007	56,0900
0,5	0,216 \pm 0,004	43,2400

SD: standart sapma

5.TARTIŞMA ve SONUÇ

Farmasötik preparatlarda veya biyolojik ortamda ilaç ya da diğer maddelerin miktar analizi, teşhisi ve belirlenmesi günümüzde oldukça önemlidir. Miktar analizi, teşhisi ve belirlenmesi gibi kalitatif ve kantitatif analizlerde çeşitli analitik yöntemler kullanılmaktadır. Analizlerde kullanılacak iyi bir yöntem seçimini yapabilmek için analitik yöntemler hakkında yeterli bir bilgi ve donanıma sahip olmak gerekir. Ayrıca çalışılacak konu hakkında iyi bir literatür bilgisine de sahip olmak gerekmektedir. Tabii ki uygulanacak analitik tekniğin nasıl seçilmesi gerektiği hususunda net bir şey söylemek mümkün değildir, çünkü her türlü koşullar altında en iyi yol sadece bir tane değildir. Analitik yöntem seçimi yapıldıktan sonra da bu yöntemin uygulanabilir olduğunu göstermek için doğruluk, kesinlik, tekrarlanabilirlik, seçicilik, spesifiklik, hassaslık ve analiz süresinin kısa olması gibi parametreleri içeren geçerlilik testlerinin yapılması gerekmektedir. Geçerlilik testleri bileşimi tam olarak bilinen standart maddeler kullanılır. Kullanılan standart maddelerin analizi yapılacak analit ile aynı ya da kimyasal özelliklerinin birbirine yakın olması gerekir. Geçerlilik testleri yapıldıktan sonra belirlenen yöntemin uygulanabilir olduğu, gerçek numunelerde (farmasötik preparat, plazma, serum vb.gibi) analitler analiz yapılarak gösterilir.

İyi bir analitik yöntem seçimi yapabilmek için iyi bir literatür taramasının yapılması gerekir denilmektedir. Bizde çalışacağımız maddeyi belirledikten sonra madde hakkında iyi bir literatür çalışmasını gerçekleştirdik. Literatür çalışması sonucunda hem farmasötik preparatlarda hem de plazmada Birinci Derece Türev Spektroskopisi ve UV-Görünür Bölge Spektroskopisi ile ilgili bir literatüre ulaşılamadı. Ayrıca HPLC yöntemiyle ilgili de çok az sayıda literatüre ulaşıldı. Bu bilgiler ışığı altında, bu çalışmada, hipertiroidizm tedavisinde kullanılan ve antitiroid bir ilaç olan

Metimazol'un UV-Görünür Bölge Spektrofotometrisi, Birinci Türev Spektrofotometrisi ve HPLC-DAD yöntemleriyle hem farmasötik preparatlarda hem de plazmada miktar analizi için yöntem geliştirip geçerlilik testlerinin yapılması amaçlanmış ve daha sonra da bu amaç gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada kullanılan standart Metimazol maddesi Novagenix firmasından metimazol içeren Thyromazol ticari ilaçta eczaneden temin edildi. Metimazol'un saflık kontrolü NMR spektrumu (Ek 1) alınarak yapıldı. Bu inceleme sonucunda Metimazol'un yeterli saflıkta olduğu belirlendi.

Ultraviyole-Görünür Bölge Spektrofotometresi, kromatografik yöntemlere göre numunenin analize hazırlanma işlemlerinin az olması ve ucuz bir yöntem olmasından dolayı saflık derecesi bilinen maddelerin kantitatif analizlerinde çok fazla tercih edilen tekniklerden birisidir. Bu teknikte, UV-Görünür bölge spektrumu, madde üzerine gönderilen ışığın dalga boylarına karşı absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile elde edilir. Yani $A = f(\lambda)$ fonksiyonudur. Türev spektrumu, $A = f(\lambda)$ fonksiyonunun her bir noktasındaki absorbans değerlerinin türevi alınarak elde edilen değerlerin dalga boyuna karşı grafiğe geçirilmesi ile elde edilir. Türev spektrumları, absorbansın birinci dereceden n'inci dereceye kadar türevleri alınarak elde edilebilir. Türev eğrilerinin hazırlanması oldukça güç bir işlem olduğundan hesapların yapılmasında bilgisayarlardan yararlanılır²².

UV-Görünür Bölge Spektrofotometrisi çalışmasında, Metimazol'un 259 nm dalga boyunda maksimum absorbans verdiği belirlendikten sonra yöntemin standart çözeltileri için uygulanma koşulları optimize edildi. Yöntemin doğrusal olduğu 0,5-10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişim aralığında bir seri standart (0,5, 1, 2, 3, 5, 7, 9, 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$) Metimazol çözeltilisinin derişimine karşı okunan absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon

eğrisi elde edildi. Kalibrasyon eğrisinin regrasyon analizinden, regrasyon doğrusunun denklemi UV-Görünür Bölge için $A=0,1357x+0,0212$ ve korelasyon katsayısı (r) 0,9977, Gözlenebilme alt sınırı (LOD) değeri $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ve tayin alt sınırı (LOQ) $0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$ olarak belirlendi. Gün içi ve günler arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik değerlerinin bağıl standart sapması (RSD) %4'den küçük ve doğruluk değerinin standart sapması da 0,1'den küçük olduğu tespit edildi. Yöntem aynı zamanda Metimazol etken maddesine sahip Thyromazol tablet analizine başarıyla uygulandı ve yöntemin farmasötik preparattan geri kazanım değeri % 99-105 arasında belirlendi.

UV-Görünür Bölge Spektrofotometri plazma çalışmasında, $1-10 \mu\text{g ml}^{-1}$ derişim aralığında hazırlanan bir seri Metimazol çözeltisinden uygun miktarlarda 1 ml plazma üzerine eklenip (spike edilip) karıştırıldı ve bölüm 3.4. de belirtildiği şekilde sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi uygulandı. Ekstraksiyon işlemi sonucunda elde edilen çözeltilerin UV-Görünür Bölge Spektrofotometre spektrumları alındı. Her bir çözeltinin derişimine karşı okunan absorbands değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edildi. Kalibrasyon eğrisinin regrasyon analizinden, regrasyon doğrusunun denklemi $A = 0,1185x - 0,0240$ (A: Absorbans, x: derişim) ve korelasyon katsayısı (r) 0,9958, gözlenebilme alt sınırı (LOD) değeri $0,9 \mu\text{g ml}^{-1}$ ve tayin alt sınırı (LOQ) değeri $1,0 \mu\text{g ml}^{-1}$ olarak belirlendi. Gün içi ve günler arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik değerlerinin bağıl standart sapması (RSD) %5'den küçük ve doğruluk değerinin standart sapması da 0,4'den küçük olduğu tespit edildi. Plazmadan yöntemin geri kazanım değeri %61- 87 arasında değiştiği belirlendi.

Birinci Türev Spektrofotometrik çalışmada, optimum koşullar belirlendikten sonra standart Metimazol 252 nm'de bir maksimum 275 nm'de bir de minimum olmak üzere iki pik verdiği tespit edildi. Kalibrasyon eğrisinin çizimi ve diğer ölçümler 252 nm

dalga boyunda yapıldı. 0,5-10,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişim aralığında yöntemin doğrusal olduğu belirlendikten sonra, bu derişim aralığında bir seri standart (0,5 , 1, 2, 3, 5, 7, 9, 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$) Metimazol çözeltileri derişimine karşı okunan minimum ve maksimum absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edildi. Kalibrasyon eğrilerinin yapılan regresyon analizinden, regresyon doğrusunun denklemi $y=0,2971x+0,0211$ ve korelasyon katsayısı (r) 0,999, gözlenebilme alt sınırı (LOD) değeri 0,1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ve tayin alt sınırı (LOQ) değeri 0,2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ olarak belirlendi. Gün içi ve günler arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik değerlerinin bağıl standart sapması (RSD) %1,3'den küçük ve doğruluk değerinin standart sapması da 0,15'den küçük olduğu tespit edildi. Yöntem aynı zamanda Metimazol etken maddesine sahip Thyromazol tablet analizine başarıyla uygulandı ve yöntemin farmasötik preparattan geri kazanım değeri % 99-102 arasında değiştiği belirlendi.

Birinci Derece Türev Spektrofotometri plazma çalışmasında, 1-10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişim aralığında hazırlanan bir seri Metimazol çözeltilerinden uygun miktarlarda 1 ml plazma üzerine eklenip (spike edilip) karıştırıldı ve bölüm 3.4. de belirtildiği şekilde sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi uygulandı. Ekstraksiyon işlemi sonucunda elde edilen çözeltilerin Birinci Derece Türev Spektrofotometri spektrumları alındı. Her bir çözeltilerin derişimine karşı 252 nm dalga boyunda verdiği maksimum pik absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edildi. Kalibrasyon eğrisinin regresyon analizinden, regresyon doğrusunun denklemi $y =0,257x-0,1074$ (y: Absorbans, x: derişim) ve korelasyon katsayısı (r) 0,9963, gözlenebilme alt sınırı (LOD) değeri 0,9 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ve tayin alt sınırı (LOQ) değeri 1,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ olarak belirlendi. Gün içi ve günler arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik değerlerinin bağıl standart sapması (RSD) %0,9'dan

küçük ve doğruluk değerinin standart sapması da 0,4'den küçük olduğu tespit edildi. Plazmadan yöntemin geri kazanım değeri %57- 85 arasında değiştiği belirlendi.

Kromatografi, karmaşık karışımlardaki kimyasal bileşimlerin ayrılması, tanınması ve tayininde çok yaygın olarak kullanılan bir yöntemler topluluğudur. Bu yöntemler topluluğundan Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) doğruluk, kesinlik, tekrarlanabilirlik, seçicilik, duyarlılık ve sonuçların hızlı elde edilebilmesi gibi diğer yöntemlere göre birçok üstün yanlara sahiptir. Ayrıca, HPLC ile nanogram seviyesinde bile miktar analizi yapılabilmektedir. Biyolojik sıvılarda farmakokinetik çalışmalarda düşük derişimlere inebilmek oldukça önemlidir. Bundan dolayı da ilaç endüstrisinde hem farmasötik preparatlarda hem de biyolojik sıvılarda ilaç analizlerinde HPLC oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

HPLC çalışmalarında, sabit fazın özellikleri ve hareketli fazın bileşimi, ayrılan maddenin kromatografik davranışına etki etmektedir. Bundan dolayı ayırımın iyileştirilmesi ve kabul edilebilir sonuçların alınabilmesi için kromatografik koşulların optimizasyonuna gerek duyulmaktadır. Çalışmalarda, ters faz C₁₈ kolonu (5µm, 250x4.6 mm), mobil faz olarak metanol-su (40:60 V/V), kolon sıcaklığı değişken, hareketli faz akış hızı 1 ml dk⁻¹, dalga boyu 254 nm ve enjeksiyon hacmi 10 µl olarak çalışma parametreleri olarak belirlendi. Bu parametreler altında HPLC çalışmasında kapasite faktörü 0,90, kolon teorik tabaka sayısı 1071, taban yüksekliği 0,2334mm olarak tespit edildi.

HPLC-DAD çalışmalarında, Metimazol'un 254 nm dalga boyunda maksimum absorban verdiği belirlendikten sonra yöntemin standart çözeltileri için uygulanma koşulları optimize edildi. Yöntemin doğrusal olduğu 0,25-9,00 µg ml⁻¹ derişim aralığında bir seri standart (0,25, 0.5, 1, 3, 5, 7 ve 9 µg ml⁻¹) Metimazol çözeltisinin

derişimine karşı HPLC-DAD’da elde edilen piklerin alan değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edildi. Kalibrasyon eğrisinin regrasyon analizinden, regrasyon doğrusunun denklemi $y = 309495,2x + 18133,87$ (y: pik alanı, x: derişim) ve korelasyon katsayısı (r) 0.9989, sinyal/gürültü (S/G) oranı 3 olduğunda saptanabilen en küçük Metimazol derişimi olarak alınan gözlenebilme alt sınırı (LOD) değeri $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ve sinyal/gürültü (S/G) oranı 10 olduğunda saptanabilen en küçük Metimazol derişimi olarak alınan tayin alt sınırı (LOQ) değeri $0,25 \mu\text{g ml}^{-1}$ olarak belirlendi. . Gün içi ve günler arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik değerlerinin bağıl standart sapması (RSD) %2,5’den küçük ve doğruluk değerinin standart sapması da 0,2’den küçük olduğu tespit edildi. Thyromazol tablette Metimazol analizi geliştirilip valide edilmiş HPLC-DAD yöntemiyle başarılı bir şekilde yapıldı. Tabletten Metimazol’un geri kazanım değeri %95-101 arasında belirlendi. Ayrıca HPLC alışmasında Metimazol özeltilerinin üç farklı ortamdaki stabilite çalışmasında bölüm 4.3.1.2.6’da anlatıldığı şekilde yapıldı. Çalışma sonucunda Metimazol’un 4°C (buzdolabı) and -20°C (derindondurucu)’da polipropilen tüpler içinde saklandığı zaman en az 3 gün süreyle ve oda şartlarında ağzı sıkıca kapatıldığı zaman en az 72 saat süreyle da stabil olduğu belirlendi $0,75 \mu\text{g ml}^{-1}$ gibi düşük derişimdeki numunenin oda sıcaklığında biraz daha fazla olmak üzere her üç ortamda bozunduğu belirlendi.

Plazma çalışmasında, analitik grade etanolde farklı derişimlerde bir seri hazırlanmış standart Metimazol çözeltilerinden belirli miktarlarda 1 ml plazmaya eklendi (spike edildi), karıştırıldı ve bölüm 3.4. de belirtildiği şekilde ekstrakte edildi. Elde edilen ekstrakt çözeltileri HPLC’ye enjekte edildi ve kromatogramları alındı. Plazma alışmalarında HPLC-DAD yönteminin $0,5-9,0 \mu\text{g ml}^{-1}$ derişim aralığında doğrusal olduğu belirlendi. Her bir derişime karşı elde edilen piklerin alanı grafiğe

geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edildi. Kalibrasyon eğrisinin regresyon analizinden, regresyon doğrusunun denklemi $y = 172177,7x - 3607,12$ (y: pik alanı, x: derişim) olarak ve korelasyon katsayısı (r) 0,9962, gözlenebilme alt sınırı (LOD) değeri $0,4 \mu\text{g ml}^{-1}$ ve tayin alt sınırı (LOQ) değeri $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ olarak belirlendi. Gün içi ve günler arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik değerlerinin bağıl standart sapması (RSD) % 3'den küçük ve doğruluk değerinin standart sapması da 0,18'den küçük olduğu ve plazmadan yöntemin geri kazanım değeri % 43-57 arasında olduğu belirlendi.

Sonuç olarak, bu çalışmada hem farmasötik preparatlarda hem de plazmada Metimazol miktar analizi için UV-Görünür Bölge Spektrofotometrisi, Birinci Türev Spektrofotometrisi ve HPLC-DAD yöntemleri geliştirilip geçerlilik testleri yapılmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen değerlerden, farmasötik preparatlarda Metimazol miktar analizi için uygulanan her üç yöntemin hassas, duyarlı, seçici, doğru, kesin ve tekrarlanabilir olduğu tespit edildi. Plazmada Metimazol miktar analizi için uygulanan yöntemlerden UV-Görünür bölge spektrofotometrisi ve Birinci derece türev spektrofotometrisi yöntemlerinin uygulanabilirliği, kesinliği ve tekrarlanabilirliği oldukça yüksek olup HPLC yönteminin ise uygulanabilirliği ve geri kazanım değerlerinin daha düşük olduğu belirlendi. Elde edilen geri kazanım değerleri literatür verileriyle uyuşturmaktadır. Geri kazanım değerinin düşük olmasının nedeni, uygulanan ekstraksiyon yöntemi ve kullanılan ters faz kolonu olarak düşünülebilir. UV-Görünür bölge spektrofotometrisi ve Birinci derece türev spektrofotometrisi yöntemlerinin Metimazol'un klinik çalışmalarında rutin miktar analizlerinde ve kalite kontrol çalışmalarında uygulanabileceği düşüncesindeyiz..

6. KAYNAKLAR

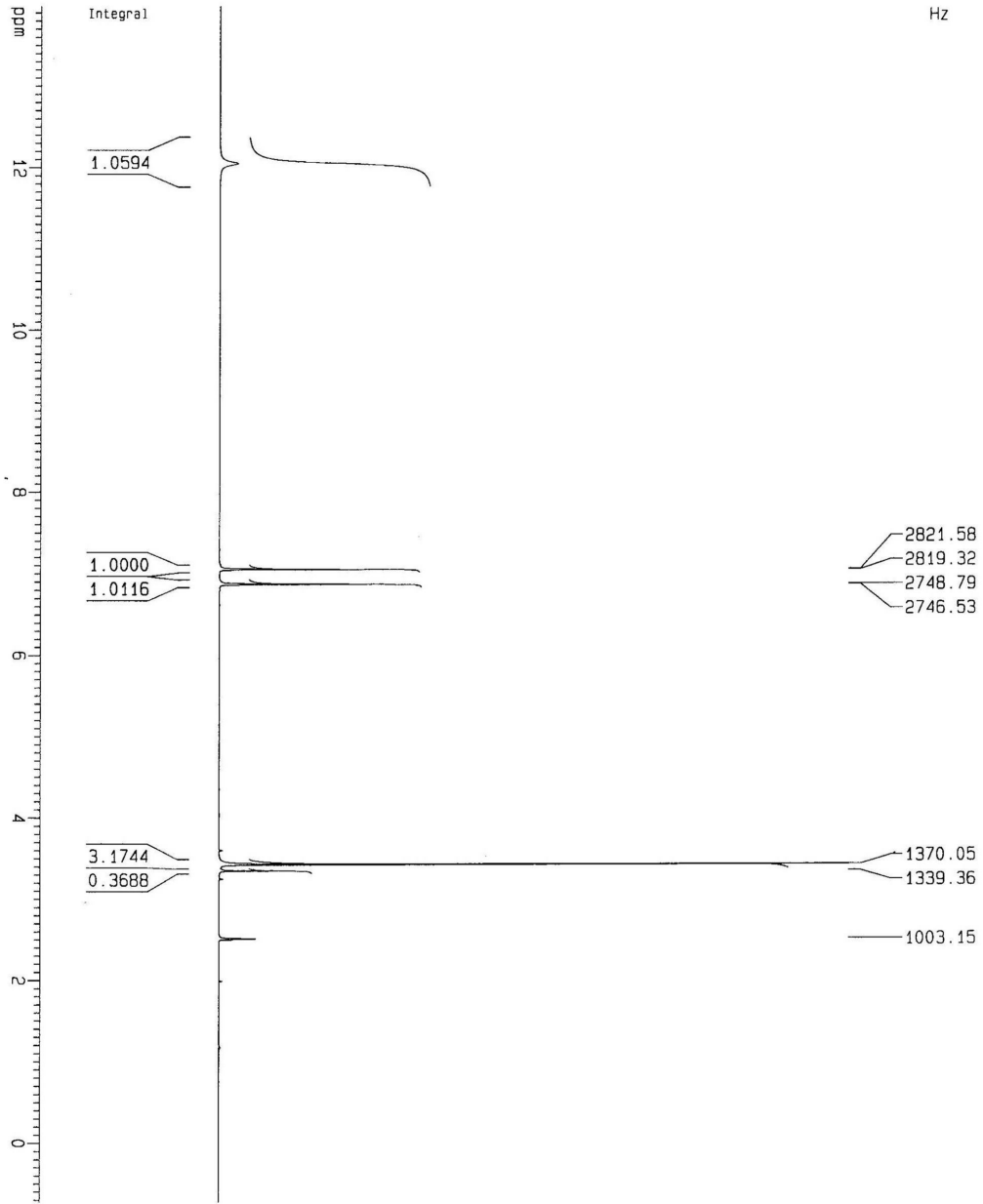
1. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 2. cilt, Sekizinci baskı, Ankara, Hacettepe TAŞ, 1998: 2542.
2. Türkiye İlaç Kılavuzu 2001 Formülleri. İstanbul, Turgut Yayıncılık ve Ticaret A.Ş, 2001: 320-321.
3. Aslanoğlu M, Peker N. Potentiometric and voltammetric determination of methimazole. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2003; 33: 1143-1147
4. Aletrari M, Kanari P, Partassides D, Loizou E. Study of British pharmacopeia method on methimazole(thiamazole) content in carbimazole tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1998; 16: 785-792.
5. Hollosi L, Kettrup A, Schramm KV. MMSPE-RP-HPLC method for simultaneous determination of methimazole and selected metabolites in fish homogenates. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2004; 36: 921-924.
6. Skellern GG, Knight BI and Stenlake JB. Improved method for determination of methimazole in plasma by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 1976; 124: 405-410.
7. Bending MR and Stevenson D. Measurement of methimazole in human plasma using gas-liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 1978; 154: 267-271
8. Floberg S, Lanbeck K and Lindström B. Determination of methimazole in plasma using gas chromatography-mass spectrometry after extractive alkylation. *Journal of Chromatography* 1980;182: 63-70.
9. Moretti G, Betto P, Cammarata P, Fracassi F and Giambenedetti M. Determination of thyreostatic residues in cattla plasma by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography* 1993; 616: 291-296.

10. Sánchez-Pedreño C, Albero MI, García MS and Ródenas V. Flow-injection spectrophotometric determination of carbimazole and methimazole. *Analytica Chimica Acta*. 1995; 308: 457-461.
11. Martindale The Extra Pharmacopoeia. 1982: 356-357.
12. The United States Pharmacopeia, USP 24. Official from January 1, 2000: 1066.
13. Abraham P, Avenell A, Park CM, Watson WA and Bevan JS. A systematic review of drug therapy for Graves' hyperthyroidism. *European Journal of Endocrinology* 2005; 153: 489-498.
14. Hoffman SB, Yoder AR, Trepanier LA. Bioavailability of transdermal methimazole in a pluronik lecithin organogel(PLO) in healthy cats. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 2002; 25: 189-193.
15. Economou A, Tzanavaras PD, Notou M, Themelis DG. Determination of methimazole and carbimazole by flow-injection with chemiluminescence detection based on the inhibition of the Cu(II)-catalysed luminol-hydrogen peroxide reaction. *Analytica Chimica Acta*. 2004; 505: 129-133.
16. Sun J, Zheng C, Xiao X, Niu L, You T, Wang E. Electrochemical detection of methimazole by capillary electrophoresis at a carbon fiber microdisk electrode. *Electroanalysis* 2005; 17: 1675-1680.
17. Mortimer RH, Cannell GR, Addison RS, Johnson LP, Roberts MS and Bernus I. Methimazole and propiltiourasil equally cross the perfused human term placental lobule. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997; 82: 3099-3102.
18. Skoog DA, Leary JJ. *Principles of Instrumental Analysis*, 4th Edition, New York, Harcourt Brace College Publishers, 1992: 150, 629.

19. Gündüz T. *İnstrümental Analiz*, Altıncı Baskı, Gazi Kitabevi, 2002: 229, 1116, 1225.
20. Erdiñ E. *Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler*, Ankara, Gazi Kitabevi, 1998: 1, 81.
21. Skoog, Holler, Nieman. *Enstrümental Analiz İlkeleri*, Birinci Baskı, Bilim Yayıncılık, 1998: 299-347, 674-766.
22. Holler JF, Skoog DA, West DM. *Spektrokimyasal yöntemlere giriş*. Kılıç E, Köseoğlu F eds. *Analitik Kimya*. Özkan matbaa, 1999: 497-724.
23. Odabaşı S. *Genel Kromatografi Bilgiler*, Laboratuar Eğitim Notları, 1997: 1-17.
24. Grinter HC, Threlfall TL. *UV-VIS Spectroscopy and its applications*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany, 1992: 81-88.
25. Demirkaya F. *Karbamazepinin UV-Visible spektrofotometri ve HPLC yöntemleriyle miktar analizi*. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans tezi Erzurum. 2003.
26. Decosterd LA, Cottin E, Chen X. Simultaneous determination of deoxyribonucleoside in the presence of ribonucleoside triphosphates in human carcinoma cells by high performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* 1999; 270: 59-68.
27. Holler JF, Skoog DA, West DM. *Analytical Chemistry Introduction*, sixth edition, Saunders Collage Publishing. America, 1994: 491-563.
28. *Validation of Analytical Procedures*. Proceedings of the International Conference on Harmonisation (ICH). Commission of the European Communities (1996).

7.EKLER

Ek 1. Metimazol'ün NMR Spektrumu



Peak-Nr	Frequency [Hz]	Frequency [ppm]	Intensity [cm]	Integral
Int-Reg: 1	12.3730	11.7599		1.05938
1	2821.581	7.0517	2.02	
2	2819.324	7.0460	1.97	
Int-Reg: 2	7.1067	7.0095		1
3	2748.787	6.8697	2.06	
4	2746.535	6.8641	1.82	
Int-Reg: 3	6.9268	6.8321		1.01159
5	1370.052	3.4240	12.36	
Int-Reg: 4	3.4915	3.3741		3.17443
6	1339.359	3.3473	0.95	
Int-Reg: 5	3.3741	3.3116		0.368839

8.ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında İzmitte doğdum.İlk öğrenimimi Körfez Anadolu İlkokulu'nda, orta öğrenimimi Atatürk Orta Okulu'nda ve lise öğrenimimi Tüpraş 50. Yıl Lisesi'nde tamamladım. 1995 yılında Erzurum Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'ne girdim ve 1999 yılında mezun oldum. Aynı yıl öğretmen olarak Erzurum'a atandım.2002 yılında Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisansa başladım.