

ERZİNCAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

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


Elif Nilay KAYA

KİMYA ANABİLİM DALI


ERZİNCAN
2016

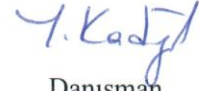
Her Hakkı Saklıdır.


Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Elif Nilay KAYA
İmza : 

“Mirtazapin Etkin Maddesinin Farmasötik Preparatlarda Analitik Yöntemlerle Miktar Tayini” adlı Yüksek Lisans tezi, Erzincan Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi 'ne uygun olarak hazırlanmıştır.



Tezi Hazırlayan
Elif Nilay KAYA


Danışman
Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU


ABD Başkanı
Doç. Dr. Ekrem KÖKSAL

Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU danışmanlığında, Elif Nilay KAYA tarafından hazırlanan bu çalışma 20.06.2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU

İmza: 

Üye : Doç. Dr. Ekrem KÖKSAL

İmza: 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Onur ŞENOL

İmza: 

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

20/06/2016



Prof. Dr. Ali SÜLÜN
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

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

Elif Nilay KAYA

Erzincan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU

Piperazineazpin grubundan antidepresan bir ilaç olan mirtazapin etkin maddesinin farmasötik preparatlarda miktar tayini için literatürdeki mevcut yöntemlere alternatif olarak basit ve hızlı bir UV–Görünür Bölge Spektrofotometri, 1. Türev Spektrofotometri ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemlerinin geliştirilip geçerlilik testlerinin yapılması amaçlanmıştır.

UV–Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminde 319 nm ve 1. Türev Spektrofotometri yönteminde ise 276 nm dalga boylarında (λ) ölçümler alındı. Her iki yöntemde 1–50 $\mu\text{g/mL}$ mirtazapin derişim aralığında doğrusallık elde edildi. HPLC yönteminde, floresans dedektör [FID, 290 nm uyarma ve 370 nm yayınım dalga boyları], metanol–su–asetonitrilden (5:60:35, h/h/h) oluşan hareketli faz, C18 kolon, 1 mL/dk akış hızı ve 10 μL enjeksiyon hacmi çalışma parametreleri ve iç standart olarak sitalopram kullanıldı. Yöntemler geliştirildikten sonra ICH kurallarına göre doğruluk, kesinlik, doğrusallık, gözlenebilme sınırı (LOD), miktar tayin alt sınırı (LOQ) ve geri kazanım parametreleri çalışarak valide edildi. Çalışma sonucunda geliştirilip valide edilen her üç yöntemin kalite kontrol çalışmalarında başarıyla uygulanabileceği sonucuna varıldı.

2016, 89 sayfa**Anahtar Kelimeler:** HPLC, Mirtazapin, Spektroskopi, Validasyon.

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION OF MIRTAZAPINE IN PHARMACEUTICAL
PREPARATIONS BY ANALYTIC METHODS

Elif Nilay KAYA

Erzincan University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU

It is aimed to develop and validate a simple and rapid first-order UV–Vis spectrophotometry and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method, alternative to the present method in literature, for determination of mirtazapin which is a member of piperazine-azepine group, in pharmaceutical formulations.

Measurements were taken for zero order and first order UV–Vis spectrophotometry method at 319 and 276 nm wavelengths (λ), respectively. Both methods were linear between 1–50 $\mu\text{g/mL}$ for standard mirtazapin solutions. In HPLC method, fluorescence detector [FID, 290 nm excitation and 370 nm emission wavelength], methanol–water–acetonitrile (5:60:35, v/v/v) mobile phase, C18 column, 1 mL/min flow rate and 10 μL injection volume was selected as working parameters and citalopram was used for internal standard. After the method development step, proposed method was validated in terms of accuracy, precision, Limit of Detection (LOD), Limit of Quantitation (LOQ) and recovery parameters in accordance with ICH guideline. As a result of the proposed study, it is claimed that developed and validated methods can be successfully used in quality control studies.

2016, 89 pages**Keywords:** HPLC, Mirtazapine, Spectroscopy, Validation.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimi planlayıp yöneten, bilgi ve tecrübesi ile çalışmalarına destek olan ve yol gösteren, karşılaştığım tüm zorlukların çözümlenmesinde yardımcı olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU 'na,

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimim boyunca desteklerini gördüğüm, her ihtiyacım olduğunda yardımına koşan, fikirleri ve tecrübeleriyle benden ilgi ve desteğini esirgemeyen değerli hocalarım Doç. Dr. Ekrem KÖKSAL ve Doç. Dr. Murat ÇANKAYA 'ya,

Tez çalışmalarım süresince fikirlerinden ve bilgi birikimlerinden faydalandığım, bana karşı her zaman içten ve anlayışlı olan ve çalışmalarımın her aşamalarında benden sabırlarını ve anlayışlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Onur ŞENOL ve Arş. Gör. Mehmet Emrah YAMAN 'a,

Sevgi ve anlayışlarıyla hep yanımda olup beni her konuda destekleyen ve koruyan, bu günlere gelmemde en büyük emeğe sahip olan çok değerli canım aileme, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Elif Nilay KAYA

Erzincan, Haziran 2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	vii
TABLolar LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1. Depresyon	3
2.2. Antidepresan İlaçlar	4
2.3. Mirtazapin	4
2.3.1. Mirtazapinin fizikokimyasal özellikleri	5
2.3.2. Farmakolojik özellikleri	6
2.3.3. Farmakokinetik özellikleri	6
2.3.4. Farmakodinamik özellikleri	7
2.3.5. Mirtazapin etkin maddesine sahip farmasötik preparatlar	7
2.4. Miratazpinle İlgili Literatür Özeti	8
2.4.1. Biyolojik ortamlarda yapılan çalışmalar	8
2.4.2. Framasötik preparatlarda yapılan çalışmalar	12
2.5. Spektroskopi.....	12
2.5.1. UV – Görünür bölge spektroskopisi	18
2.5.2. UV – Görünür bölge absorpsiyon spektrofotometreleri.....	19
2.5.3. Işın kaynakları.....	20
2.5.4. Dalga boyu seçiciler.....	20
2.5.5. Örnek kapları.....	21
2.5.6. Dedektörler.....	21
2.5.7. UV – Görünür bölge spektroskopisi yönteminin uygulama alanları	22
2.5.7.1. Nitel analiz	22
2.5.7.2. Nicel analiz.....	22
2.6. Türev Spektrofotometri Yöntemi.....	23
2.6.1. Teorik temelleri.....	23
2.6.2. Türev spektroskopisi yönteminin uygulamaları.....	26

2.7. Kromatografi	26
2.7.1. Kromatografinin sınıflandırılması.....	27
2.7.2. Adsorbsiyon kromatografisi.....	30
2.7.3. Dağılma (paylaşım) kromatografisi	30
2.7.3.1. Normal faz sıvı kromatografisi	31
2.7.3.2. Ters faz sıvı kromatografisi	32
2.7.4. İyon çifti kromatografisi	33
2.7.5. İyon değiştirme kromatografisi	34
2.7.6. Eleme (boyutlandırma) kromatografisi	34
2.7.7. Afinite kromatografisi	35
2.8. Kromatografi Temel Parametreleri	35
2.8.1. Alıkonma zamanı ve kapasite faktörü.....	36
2.8.2. Seçicilik.....	37
2.8.3. Kolon etkinliği	38
2.8.4. Rezolusyon.....	39
2.8.5. Hareketli faz bileşiminin ayırma etkisi	39
2.9. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	40
2.10. HPLC Cihazı Bölümleri.....	40
2.10.1. Çözücü (hareketli faz) hazneleri	41
2.10.2. Pompalar	42
2.10.3. Enjektörler.....	42
2.10.4. Kolonlar	42
2.10.5. Dedektörler.....	43
2.10.6. Kaydedici	45
2.11. Analitik Yöntem Validasyonu (Geçerlilik Testleri).....	45
2.11.1. Tanımlar	45
2.11.2. Validasyon (yöntem geçerlilik) parametreleri	46
2.11.2.1. Seçicilik.....	47
2.11.2.2. Doğruluk	48
2.11.2.3. Kesinlik	48
2.11.2.4. Doğrusallık.....	49
2.11.2.5. Çalışma aralığı	49
2.11.2.6. Gözlenebilme sınırı (LOD).....	50
2.11.2.7. Miktar tayini sınırı (LOQ).....	50
2.11.2.8. Tutarlılık.....	50

2.11.2.9. Stabilite	51
2.11.2.10. Sağlamlık.....	51
2.11.2.11. Geri kazanım	51
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	53
3.1. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler	53
3.2. Kullanılan Cihazlar	53
3.3. Yöntemler.....	55
3.3.1. Spektrofotometri yöntem şartları	55
3.3.1.1. UV–Görünür bölge spektrofotometrisi	55
3.3.1.2. Türev spektrofotometri yöntem şartları	56
3.3.2. Kromatografik yöntem şartları	56
3.3.3. Tablet çözeltilerinin hazırlanması	57
4. BULGULAR	58
4.1. UV–Görünür Bölge Spektrofotometri ve 1. Türev Spektrofotometri Yöntemi	58
4.1.1. Standart çözeltilerin hazırlanması	58
4.1.2. Validasyon (yöntem geçerlilik testleri).....	60
4.1.2.1. Doğrusal aralık ve kalibrasyon eğrisi.....	61
4.1.2.2. Gözlenebilme sınırı (LOD) ve miktar tayin alt sınırı (LOQ).....	63
4.1.2.3. Doğruluk ve kesinlik	63
4.1.2.4. Analitik geri kazanım.....	65
4.1.2.5. Yöntemin farmasötik preparatlara uygulanması	66
4.2. HPLC-FD Yöntemi	68
4.2.1. Standart çözeltilerin hazırlanması	69
4.2.2. Validasyon (yöntem geçerlilik testleri).....	69
4.2.2.1. Belirleyicilik.....	69
4.2.2.2. Doğrusal aralık ve kalibrasyon eğrisi.....	70
4.2.2.3. Doğruluk ve kesinlik	72
4.2.2.4. Gözlenebilme sınırı (LOD) ve miktar tayin alt sınırı (LOQ).....	73
4.2.2.5. Analitik geri kazanım.....	73
4.2.2.6. Yöntemin farmasötik preparatlara uygulanması	74
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	76
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	79
KAYNAKLAR	80
ÖZGEÇMİŞ	89

SİMGELER ve KISALTMALAR

A	Absorbans
BSS	Bağıl Standart Sapma
GK	Geri Kazanım
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
ICH	International Conferance on Harmonisation
k'	Kapasite Faktörü
LOD	Gözlemlenebilme Sınırı
LOQ	Miktar Tayin Sınırı
M	Molarite
mg	Miligram
mL	Mililitre
ng	Nanogram
nm	Nanometre
R	Korelasyon Katsayısı
S/G	Sinyal/Gürültü Oranı
SS	Standart Sapma
α	Seçicilik
λ	Dalga Boyu
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Mirtazapin etkin maddesine sahip ilaç listesi.....	8
Tablo 2.2. Normal faz ve ters faz sıvı kromatografisinde polariteye göre ayrılmalar....	32
Tablo 2.3. İyon-Çifti Kromatografisi tipleri ve uygulama alanları.....	34
Tablo 3.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yöntem şartları	55
Tablo 3.2. 1. Türev Spektrofotometri yöntem şartları.....	56
Tablo 3.3. Mirtazapin için HPLC-FD yöntem şartları.....	56
Tablo 4.1. Mirtazapin standart çalışma çözeltilerinin UV- Görünür Bölge Spektrofotometri ve 1. Türev Spektrofotometri yöntemlerine ait kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri	62
Tablo 4.2. UV-Görünür Bölge ve 1. Türev Spektrofotometri yöntemlerinin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)	64
Tablo 4.3. Farmasötik preparatlarda standart ekleme yöntemine göre analitik geri kazanım değerleri (n=6)	65
Tablo 4.4. Tablet çözeltilerinin analiz sonuçları	66
Tablo 4.5. Mirtazapin standart çalışma çözeltilerinin HPLC-FD yöntemine ait kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri	71
Tablo 4.6. HPLC-FD yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6).....	72
Tablo 4.7. HPLC-FD yönteminin farmasötik preparatlarda standart ekleme yöntemine göre analitik geri kazanım değerleri (n=6).....	74
Tablo 4.8. HPLC-FID yönteminin tablet çözeltilerinin analiz sonuçları.....	74

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Mirtazapinin kimyasal formülü	5
Şekil 2.2. Temel haldeki ve uyarılmış haldeki elektronlar	17
Şekil 2.3. Numune üzerine gönderilen ve çıkan ışın şiddeti ($I = I_0 \cdot e^{-\mu x}$ aldığı yoldur).....	17
Şekil 2.4. Bir spektrofotometrenin temel bileşenleri	19
Şekil 2.5. UV–Görünür alan spektrofotometresi	20
Şekil 2.6. 0, 1, 2 ve 3. Derece türev eğrisi spektrumları.....	24
Şekil 2.7. Çeşitli şekillerdeki Gauss Diyagramlarının türev spektrumları (Akgün, 2001). a. Gauss diyagramının temel, 1, 2, 3, 4. Türevleri; b. Eşit olmayan iki Gauss diyagramının temel spektrumu; c. Üst üste çakışmış ve eşit olmayan iki Gauss diyagramının temel, 1, 2, 3, 4. Türevleri.....	25
Şekil 2.8. Bir kolon kromatografisinde A ve B bileşenlerinin ayrılma diyagramı	29
Şekil 2.9. Kromatografik ayırma sonucu elde edilen bir kromatogram örneği	30
Şekil 2.10. Kapasite faktörünün hesaplanması	37
Şekil 2.11. HPLC cihazının şematik gösterimi.....	41
Şekil 4.1. Farklı çözücü ortamında hazırlanmış mirtazapin çözeltilerine (50 µg/mL) ait spektrumlar.....	58
Şekil 4.2. 50 µg/mL derişimdeki mirtazapin çözeltisinin A- UV–Görünür Bölge Spektrumu ve B- 1. Türev Spektrumu	60
Şekil 4.3. A- UV–Görünür Bölge Spektrofotometri ($\lambda=319$ nm) ve B- 1. Türev Spektrofotometri ($\lambda=302,5$) yöntemlerinin kalibrasyon eğrileri.....	61
Şekil 4.4. Mirtazapin standart çalışma çözeltilerinin (1, 5, 10, 15, 30 ve 50 µg/mL) A- UV–Görünür Bölge ve B- 1. Türev spektrumları	62
Şekil 4.5. Mirtazapin kalite kontrol çözeltilerinin (2, 20 ve 45 µg/mL) A- UV– Görünür Bölge ve B- 1. Türev spektrumları	64
Şekil 4.6. Minelza (30 mg) tabletinin 10 ve 20 µg/mL derişimlerdeki çözeltilerinin A- UV– Görünür Bölge ve B) 1. Türev spektrumları	67

Şekil 4.7. Mirtaron (30 mg) tabletinin 10 ve 20 µg/mL derişimlerdeki çözeltilerinin A- UV- Görünür Bölge ve B- 1. Türev spektrumları	68
Şekil 4.8. HPLC-FD yöntemi ile elde edilen 15 µg/mL mirtazapin ve 20 µg/mL sitalopram içeren çözeltilere ait kromatogram	70
Şekil 4.9. Sitalopram iç standardı içeren farklı derişimlerde standart mirtazapinin HPLC-FD kromatogramları.....	70
Şekil 4.10. HPLC-FD yöntemi ile elde edilen mirtazapin standart çalışma çözeltilerinin ortalama kalibrasyon eğrisi	71
Şekil 4.11. Mirtazapinin doğruluk ve kesinlik çalışmalarında kullanılan kalite kontrol çözeltilerine ait kromatogramlar	73
Şekil 4.12. İç standartlı 15 ve 25 µg/mL derişimlerdeki minelza (30 mg tablet) çözeltilerinin HPLC kromatogramları	75
Şekil 4.13. İç Standartlı 15 ve 25 µg/mL derişimlerdeki mirtaron (30 mg tablet) çözeltilerinin HPLC kromatogramları	75

1. GİRİŞ

İlaç, tıpta hastalıkların tedavisinde kullanılan, biyolojik etkinliği olan aktif maddelere verilen genel bir isimdir. İlaçlar saf kimyasal maddeler olabildiği gibi bitkisel veya hayvansal kaynaklı da olabilmektedir. Başka bir tanımla ilaç canlı hücrelerde meydana getirdiği etki ile hastalıkların iyileşmesi veya belirtilerinin azaltılması amacıyla kullanılan; doğal, yarı sentetik veya sentetik kimyasal maddelerdir. İlaçlar etkin madde ve taşıyıcı olmak üzere iki kısımdan meydana gelir. Etkin madde, canlıda biyolojik ve fizyolojik etki gösteren hastalıkların tedavisinde kullanılan bir veya birkaç kimyasal madde karışımından oluşan kısmı; yani ilacın ana bileşenidir. Taşıyıcı ise etkin maddenin hasta tarafından kolay alınabilmesi veya iyi doze edilebilmesi için katılan fizyolojik etkisi olmayan glikoz, parafin, gliserin gibi kimyasal maddelerdir. İlaçlar yeterli miktarlarda alındığında hastalıkların iyileşmesine sebep olur. Bu miktardan az alındığında herhangi bir etkisi olmazken bu miktardan fazla alındığında toksikolojik etkiye neden olur. Bu sebeple ilaçların üretiminden tüketimine kadar her aşamada ilaç analizlerinin yapılması oldukça önemlidir.

Mirtazapin, optimal düzeyde antidepresan etkinliğe ve kabul edilebilir düzeyde tolerabiliteye sahip yeni geliştirilmiş bir noradrenerjik ve spesifik serotonerjik bir antidepresan (NaSSA) ilaçtır. Mirtazapin güçlü ve seçici bir presinaptik alfa2–adrenoseptör antagonistidir ve noradrenerjik hücre ateşlenmesinin ve norepinefrin salınımını artırarak noradrenerjik iletiyi güçlendirir (Özcankaya ve Acar, 2001; İnal, Büyükşekerci ve Ulusoy, 2016).

Literatürde, mirtazapin etkin maddesinin farmasötik preparatlarda miktar tayinine yönelik çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı farmasötik preparatlarda mirtazapin etkin maddesinin miktar tayinine yönelik UV–Görünür Bölge Spektrofotometrisi, 1. Türev Spektrofotometri ve Floresans Dedektörlü–Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi yöntemleri geliştirip validasyonlarını

gerçekleştirmek ve daha sonra bu etkin maddesini içeren farmasötik preparatlarda uygulamasını gerçekleştirmektir.



2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Depresyon

Majör depresyon, yoğun üzüntü, umutsuzluk, karamsarlık, ilgisizlik, suçluluk duygusu, zihinsel yavaşlama, konsantrasyon kaybı gibi belirtilere uykusuzluk/aşırı uyku, iştahsızlık/aşırı iştah, enerji ve libido azalmasının yanı sıra normal günlük aktivite ritmi, beden ısısı ve pek çok endokrin fonksiyon değişikliklerinin eşlik ettiği ciddi bir hastalıktır (Andrews ve Nemeroff, 1994; Kayaalp, 2002).

Majör depresyon, yetenek bozukluğuna sebep olan ve insan yaşam kalitesini bozan hastalıkların başında gelmektedir. Dünya Sağlık Örgütü, dünya çapında en acil sağlık sorunlarını sıraladığı listesinde depresyonu dördüncü sıraya koymuştur. Yapılan çalışmalarda depresyona bağlı işlev kayıplarının, diyabet, hipertansiyon ve böbrek yetmezliği gibi kronik hastalıklarla karşılaştırılabilecek boyutlarda olduğu gösterilmiştir. Majör depresif bozukluğun kadınlardaki yaşam boyu yaygınlığı % 10–25, erkeklerde ise % 5–12 arasındadır (Laird ve Benefield, 1995; Karabekiroğlu, 2008). Bu fark erken erişkinlik döneminde ortaya çıkar. Kadın–erkek farkı 35–40 yaşları arasında en yüksek seviyededir ve yaşlılıkta da devam etmektedir. Kadınlarda majör depresif bozukluk daha sık görülmektedir. Bu görülme sıklığı biyolojik ve psikososyal olaylarla (örn. hormonal ve biyolojik farklılıklar, birden fazla sosyal rolün getirdiği yük vb.) açıklanmaya çalışılmıştır. Ancak neden daha sık görüldüğü açıklaması deneysel verilerle yapılmamıştır. Yaşam kalitesi bireyin yaşamdan bekledikleri ile elde ettikleri veya gerçekleştirdikleri arasındaki farklılık düzeyi olarak tanımlanabilir. Majör depresyon hastalarında yaşam kalitesinin bozulduğu ile ilgili çok sayıda çalışma mevcuttur (Katon ve Sullivan, 1990; Andrews ve Nemeroff, 1994; Laird ve Benefield, 1995; Karabekiroğlu, 2008; Aydemir vd., 2009).

2.2. Antidepresan İlaçlar

Depresyon oluşma sebebi veya sebeplerine, uzun yıllar boyunca yapılan çalışmalara rağmen tam bir açıklık getirilememiştir. En çok kabul gören hipotez depresyonun beynin monoaminlerinin işlevsel yetersizliğinden kaynaklandığını kabul etmektedir. Ayrıca depresyon tedavisinde kullanılan ilaçların bir biçimde monoaminlerin etkinliğini artırmaları bu hipotezi desteklemektedir. Depresyonda eksikliği söz konusu olan monoaminler, 5–hidroksitritamin (5HT, serotonin) ve noradrenalindir. Dopamin eksikliğinin depresyon oluşumunda çok fazla bir etkisinin olduğu düşünülmemektedir. Yapılan çalışmalarda antidepresan etkinlik için serotonerjik aktivite artışının gerekli olduğu, noradrenerjik aktivitenin antidepresan etkinin sürekliliğini sağladığı, dopaminin ise stimulan etkiden sorumlu olduğu bildirilmiştir (Preskorn, 1994; Kayaalp, 2002; Masana *et al.*,2012).

Günümüzde depresyon tedavisinde kullanılan ilaçlar etki mekanizmalarına göre, trisiklik antidepresanlar, tetra/bi/mono/heterosiklik antidepresanlar, seçici serotonin "re–uptake" inhibitörleri (SSRI), seçici serotonin-noradrenalin "re–uptake" inhibitörleri (SSNI) ve monoamin oksidaz inhibitörleri olarak 5 grupta sınıflandırılabilir (Kayaalp, 2002; Kirsch, 2010).

Tetrasiklik antidepresanlar, trisiklik antidepresanların ortak yan etkileri olan konvülsiyon eşiğini düşürme, antikolinerjik etkiler gösterme, yüksek dozda daha belirgin kardiyotoksikite ve hipotansiyon gibi sakıncalarını ortadan kaldırmak üzere geliştirilen ikinci kuşak antidepresan ilaçlardır (Gillman, 2007; Kirsch, 2010).

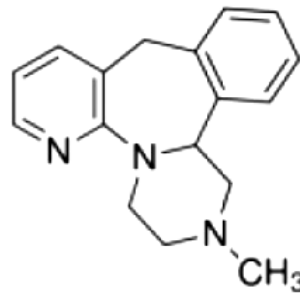
2.3. Mirtazapin

Tetrasiklik antidepresanlar grubundan olan mirtazapin majör depresyon tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Mirtazapinin etki mekanizması iki şekilde açıklanmaktadır. Bunların: 1– alfa–2 otoreseptörleri bloke ederek noradrenalin salıverilmesini ve noradrenerjik iletiyi artırmak suretiyle 5–HT salınımı artırarak, 2– 5–HT sinir

uçlarındaki alfa-2 heteroreseptörleri bloke ederek ve noradrenalin tarafından bu reseptörlerin uyarılmasını engelleyerek 5-HT salımını artırması şeklinde olduğu düşünülmektedir. Mirtazapinin 5-HT₂ ve 5-HT₃ reseptörlerini bloke etmesi ve 5-HT_{1A} agonisti gibi etki göstermesi, antidepresan ve anksiyolitik etkisiyle birlikte SSRI'ların oluşturduğu bazı yan etkilerin daha az ortaya çıkışını açıklayabilir. Mirtazapinin anksiyolitik etkisinin antidepresan etkisinden bağımsız olarak ortaya çıktığı bildirilmektedir (Hartmann, 1999; Anderson, 2001; Gillman, 2007). Trisiklik antidepresanlar kardiyotoksik, hipotansif, antikolinerjik ve epilepsi eşiğini düşürme gibi ciddi yan etkileri mevcuttur. Mirtazapinin alfa-1 adrenerjik, kolinerjik ve dopaminerjik reseptörlere; trisiklik antidepresanlara göre daha düşük derecede ilgisi olduğu gösterilmiştir. Bu özelliği mirtazapininin ortostatik hipotansiyon ve taşikardi gibi adrenerjik; ağız kuruluğu, bulanık görme, konstipasyon gibi antikolinerjik veya dopaminerjik yan etkilere düşük derecede neden olmasını sağlar (Hartmann, 1999; Anderson, 2001; Özcankaya ve Acar, 2001; Gillman, 2007).

2.3.1. Mirtazapinin fizikokimyasal özellikleri

Mirtazapin, (±)-1,2,3,4,10,14b-heksahidro-2- [11C]metilpirazino(2,1 a)pirido(2,3-c)(2)benzazepin şeklinde kimyasal isimlendirilmesi yapılmaktadır ve C₇H₁₉N₃ kapalı formülüne sahiptir (Şekil 2.1). Mirtazapin, beyaz veya beyaza yakın higroskopik toz olup, 265,35 g/mol molekül kütlesine, 114–116 °C erime noktasına ve 7,1 pKa değerine sahiptir. Mirtazapin suda az çözünür, metanol ve kloroformda ise çözünürdür (Anon., 2004; Foye *et al.*, 2008).



Şekil 2.1. Mirtazapinin kimyasal formülü

2.3.2. Farmakolojik özellikleri

Majör depresyon tedavisinde kullanılan mirtazapin piperazinoazepinler grubundan bir antidepresan ilaçtır. Mirtazapin ile anhedoni, psikomotor inhibisyon, uyku düzeninde bozulma (erken uyanma) ve kilo kaybı gibi semptomlar tedavi edilebilmektedir. Ayrıca, ilgi kaybı, intihar düşüncesi ve (akşamları sabaha oranla daha iyi) duygudurum değişikliği gibi semptomların giderilmesinde de etkilidir. 1– 2 hafta içerisinde mirtazapin etkisini göstermeye başlar. Noradrenerjik α 2–oto ve heteroreseptörlerini yüksek afiniteyle bloke eder. Ayrıca 5–HT₂ ve 5–HT₃ serotonin reseptörlerini de bloke etmektedir. α 2–oto reseptörlerin noradrenalin tarafından uyarılması, noradrenalin salımının inhibisyonuna yol açar. Mirtazapin bu reseptörleri bloke ederek noradrenerjik nörotransmisyonu artırır. Ayrıca noradrenalinin serotonerjik hücreler üzerine etkileri ile de serotonerjik nörotransmisyon da uyarılır. Mirtazapinin α 1–adrenerjik, kolinerjik ve dopaminerjik reseptörlere karşı afinitesi çok düşüktür. Bu nedenle adrenerjik (ortostatik hipotansiyon, taşikardi), antikolinerjik (ağız kuruluğu, bulanık görme, kabızlık) ve dopaminerjik yan etki insidansı çok düşüktür. Ancak H₁ histamin reseptörlerine karşı yüksek afinitesi olmasından dolayı sedasyon, uyku hali ve vücut ağırlığında artış gibi yan etkilere sebep olmaktadır. Ancak bu etkiler kısa sürede ortadan kalkabilmekte yani geçici özelliğe sahiptir. Bu etkilerin geçici olması, büyük bir ihtimalle noradrenerjik sistemin aracılık ettiği merkezi uyanıklık durumunun, antihistaminik etkiyle bağlantılı sedasyonu dengelemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Anttila and Leinonen, 2001; Kaya, 2006).

2.3.3. Farmakokinetik özellikleri

Mirtazapin içeren tabletler oral yoldan alındığında mirtazapin hızlı bir şekilde emilir ve biyoyararlanımı yaklaşık % 50 'dir. İki saatte doruk plazma düzeyine ulaşır. 15 ile 80 mg düzeyinde bir dozlama yapıldığında mirtazapin doğrusal bir farmakokinetik özellik gösterir. Gıda alımı bu dağılıma minör düzeyde etki eder. Fakat absorpsiyonda büyük bir etkiye sahip değildir. Mirtazapinin farmakokinetiği yaşa ve

cinsiyete bağılı olarak değişmektedir. Mirtazapinin yarılanma ömrü yaklaşık olarak 20 ile 40 saat aralığında değişirken 4 ile 6 günde sabit plazma düzeyine ulaşılır ve sonrasında birikim gözlenmez. Mirtazapinin farmakokinetiği yüksek plazma derişimleriyle sonuçlanan enantiyoselektif olduğu gözlenmektedir. Eliminasyon yarılanma ömrü günde tek doz uygulanmasını mümkün kılar. Oral alımlarda alınan dozun yaklaşık % 100 'ü dört gün içerisinde idrar (% 75) ve dışkı (% 15) ile atılır. Biyotransformasyon demetilasyon ve ksidasyonudur; konjugasyonla da metabolize olmaktadır. 8–hidroksi metabolitinin oluşumunda sitokrom P450 (CYP) 2D6 ve 1A2; N–demetil ve n–oksid metabolitlerinin oluşumunda ise CYP3A4 'ün rolü bulunmaktadır. Dimetil metaboliti farmakolojik olarak etkindir ve ana madde ile benzer bir farmakokinetik profile sahip olduğu düşünölmektedir. Böbrek veya karaciğer yetmezliği mirtazapin klerensini azaltabilir (Ağargün vd., 1998; Timmer and Sitsen, 2000).

2.3.4. Farmakodinamik özellikleri

Mirtazapin bir presinaptik alfa–2 antagonisti olup asıl olarak noradrenerjik ve serotonerjik nörotransmisyonu artırır. Serotonerjik norotransmisyonun artması özellikle 5–HT₁ reseptörü aracılığıyladır. Çünkü mirtazapin postsinaptik serotonerjik 5–HT₂ ve 5–HT₃ antagonistidir. Buna ilaveten, mirtazapin 5–HT₁ reseptörüne zayıf bir afiniteye sahiptir ve çok zayıf muskarinik antikolinerjik olup histamin (H₁) antagonist özellikleri gösterir. Mirtazapin genelde iyi tolere edilen etkili ve güvenilir bir ilaçtır. Pratik olarak antikolinerjik aktivitesi yoktur ve terapötik dozlarda kardiyovasküler sistem üzerine herhangi bir etki görülmez (Fawcett and Barkin, 1998; Çelikel *et al.*, 2006; Danilevičiūtė *et al.*, 2009).

2.3.5. Mirtazapin etkin maddesine sahip farmasötik preparatlar

Tablo 2.1 'de Türkiye ilaç piyasasında mirtazapin etkin maddesine sahip ilaç listesi verilmiştir.

Tablo 2. 1. Mirtazapin etkin maddesine sahip ilaç listesi

İlaç İsmi	Dozaj Şekli	Doz
Remeron	Oral Solüsyon	15mg/mL
Zestat	Oral Çözelti	15 mg/mL
Minelza	Film Tablet	30 mg
Mirtaron	Film Tablet	30 mg
Redepra	Film Tablet	30 mg
Remeron	Film Tablet	30 mg
Remeron	Film Tablet	45 mg
Velorin	Film Tablet	30 mg
Zapix	Film Tablet	30 mg
Zestat	Ağızda Eriyen Tablet	15 mg
Zestat	Ağızda Eriyen Tablet	30 mg
Zestat	Ağızda Eriyen Tablet	45 mg

2.4. Mirtazapinle İlgili Literatür Özeti

2.4.1. Biyolojik ortamlarda yapılan çalışmalar

Maris *et al.*, (1999) antidepresan ilaç olan mirtazapin ve dimetil metabolitini insan plazmasında miktar tayini için HPLC yöntemini geliştirip valide etmişlerdir. İç standart ile birlikte etkin madde ve metabolitini hekzan ile plazmadan ekstrakte ettikten sonra fenil ters faz kolon kullanarak ayırımları gerçekleştirilmiştir. Yöntemin LOQ değeri 0,5 ng/mL, günüçi ve günler arası doğruluk değeri mirtazapin için % 104,6–117,7; metaboliti için % 89,9–103,7; kesinlik değerinin ise % 6,8 'in altında olduğu belirlenmiştir.

Dodd *et al.*, (2000) insan kan plazmasında mirtazapinin iki enantiyomerinin analizi için HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. İşlemler boş plazmaya mirtazapinin spayk edilmesi şeklinde gerçekleştirilmiştir. Mirtazapin plazma ortamından CERTIFY kolon kullanarak katı-faz ekstraksiyon ile ekstrakte edilmiştir. Kromatografik ayırımlar Chiralpak Ad kolonunda ve ölçümlerde 290 nm dalga boyunda

gerçekleştirmişlerdir. Yöntemin 10 ng/mL ile 100 ng/mL derişim aralığında doğrusal, varyans katsayısının (+)mirtazapin için % 16 ve % 5,5–(–)mirtazapin içinse % 15 ile % 7,3 olduğu tespit edilmiştir. Elde ettikleri sonuçlara göre yöntemin klinik çalışmalara uygun olduğu sonucuna varmışlardır.

Romiguières *et al.*, (2002) toksikolojik bir çalışma amacıyla plazmada mirtazapin miktar tayini için RP–HPLC yöntemini geliştirip valide etmişlerdir. Yöntemin 50–500 ng/mL derişim aralığında doğrusal olduğu, doğruluk değerinin yüksek olduğu, günüçi ve günler arası varyans katsayısının % 8,3 'den küçük olduğu, LOD değerini 20 ng/mL olarak belirlemişlerdir. Hastalarda toksik olmayan değerlerinin belirlenmesi işleminde gerçekleştirilmiştir.

Morgan *et al.*, (2003) insan plazması ve serumunda mirtazapin ve onun N–dimetil metaboliti ile normirtazapin miktar tayini için floresans dedektörlü HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırım Spherisorb S5 SCX kolonda pH 'ı 6,7 'ye ayarlanmış amonyum perkloratlı (50 mmol/L) metanol / su (95 + 5, h/h) oluşan hareketli faz ile gerçekleştirilmiştir. Mirtazapin ve normirtazapinin geri kazanım değerleri sırasıyla % 79±2 ve % 64±3 olarak tespit edilmiştir. Her iki analit için yöntemin 4 µg/mL ile 1000 µg/mL derişim aralığında doğrusal, LOD değerinin 0,5 µg/mL ve LOQ değerinin ise 1 µg/mL olduğu belirlenmiştir. Analitlerin serum ortamında 10 ay stabil kadığı tespit edilmiştir.

Duverneuil *et al.*, (2003) insan plazmasında 11 en yaygın olan trisiklik olmayan antidepresanlar ve iki metaboliti (floksetin, norfloksetin, sertralin, paroksetin, sitalopram, fluvoksamin, moklobemid, mirtazapin, milnasipran, toloksaton, venlafaksin, desmetil venlafaksin, ve viloksazin) insan plazmasında miktar tayini ve taraması için UV dedektörlü HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Plazmadan ilaçlar sıvı–sıvı ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edilmiştir. Kromatografik ayırım C18 kolonda, 1,0 mL/dk 'lık bir akış hızında, pH 3,8 'de asetonitril fosfat tampon hareketli fazın gradient elüsyonla gerçekleştirilmiştir. Toplam analiz süresi 18 dakikadır. Geri kazanım değerleri 11 bileşik için % 74–109 aralığında olup sadece moklobemid % 59 ve toloksaton ise % 10 'dan azdır. Yöntem tüm bileşikler için 25–

1000 ng/mL derişim aralığında doğrusallığa sahiptir. LOD değeri toloksaton (10 ng/mL) hariğ 2,5 ile 5 ng/mL arasında değişmiştir. Günüçi ve gúnlerarası analizlerde kesinlik ve doğruluk iki derişim seviyelerinde incelenmiştir (50 ve 500 ng/mL) ve % 87,2 – % 100,5 ve % 88,4 – % 100,5 olarak belirlenmiştir.

Pistos *et al.*, (2004) insan plazmasında mirtazapin ve dimetilmirtazapin miktar tayini için tandem kütle spektroskopi dedektörlü HPLC yöntemini geliştirip valide ettikten sonra her iki madde için farmakokinetik parametreleri belirlemişlerdir. İnsan plazmasından mirtazapin sıvı–sıvı ekstraksiyon yöntemiyle ekstrakte edilmiştir. Kromatografik ayırım ters faz C8 kolonda 0,80 mL/dk akış hızında 0,01 M amonyum format (pH=7,8) ve asetonitrilden (35:63, h/h) hareketli faz ile geręekleřtirilmiřtir. Yöntemin her iki madde için 0,10 ng/mL ile 200 ng/mL derişim aralığında doğrusal olduğu, günüçi ve gúnler arası % BSS değerinin mirtazapin ve dimetilmirtazapin için sırasıyla % 14,8 ve % 16,6 'dan küçük olduğu belirlenmiştir.

Mandrioli *et al.*, (2006) insan plazmasında spesifik serotonerjik antidepresan ilaçlardan olan mirtazapin ve onun iki metabolitinin (*N*-desmetilmirtazapin ve 8–hidroksimirtazapin) miktar tayini için floresans dedektörlü HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Çalışmada C8 kolon, % 75 sulu fosfat tamponu içeren pH 'ı 3,0 olan trietilamin ve % 25 metanolden oluşan hareketli faz, melatonin i standardı ve 370 nm emisyon dalga boyu ve 290 nm absorbans dalga boyu parametreleri kullanılmıştır. Kalibrasyon eğrisi mirtazapin için 15–150 ng/mL, *N*-desmetilmirtazapin ve 8–hidroksimirtazapin için 2,5–75,0 ng/mL derişim aralıklarında doğrusal olduğu, yöntemin gözlenebilme sınırı (LOD) 1,25 ng/mL ve miktar tayin sınırı (LOQ) 2,5 ng/mL olarak tespit edilmiştir.

Kirchherr and Kühn–Velten, (2006) mirtazapin etkin maddesinin de içinde bulunduğu kırk sekiz adet antidepresan ilacın tekli numune/üçlü enjeksiyon yöntemiyle insan serumunda HPLC–MS/MS yöntemiyle miktar tayinlerini geręekleřtirmiřlerdir. Çalışmada, 400 tandem kütle spektrometri dedektörü, C8 kolon, izobarik kütle fragmentleri, metanol–5 mM asetat tamponu (pH=3,9) 'den oluşan hareketli faz ve gradient elüsyon parametreleri kullanılmıştır. İşlem süresi 8

dakika olarak verilmektedir. Geri kazanım değerlerinin % 92 ile % 111 arasında olduğu tespit edilmiştir.

Ptacek *et al.*, (2008) insan plazmasında mirtazapin miktar tayini için floresans dedektörlü ters faz HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Plazmadan sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemiyle mirtazapin ekstrakte etmişlerdir. Kromatografik ayırma izokratik elüsyonlu C18 kolonda gerçekleştirilmiştir. Zolpidem iç standardı kullanılmıştır. Güniçi kesinlik (% BBS) değeri % 5 'den daha küçük ve LOQ değeri 1,5 ng/mL olarak bulunmuştur.

Borges *et al.*, (2012) iç standart olarak ketiapin kullanarak insan plazmasında mirtazapin miktar tayini için HPLC-ESI-MS/MS yöntemini geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırım toplam 1,8 dakikalık işlem süresinde C18 kolonda gerçekleştirmişlerdir. Yöntemin 0,5 ng/mL ile 150 ng/mL deşişim aralığında doğrusal ve miktar tayin sınırının 0,5 ng/mL olduğu tespit edilmiştir. Daha sonra 30 mg tek doz mirtazapin verilmiş 31 gönüllüde biyoyararlanım çalışmasını gerçekleştirerek farmakokinetik parametreleri belirlemişlerdir.

Lavasani *et al.*, (2014) insan plazmasında antidepresant ilaç olan mirtazapin ve iki metaboliti olan N-desmetilmirtazapin ve 8-hidroksimirtazapinin miktar tayini için HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Çalışmada, C18 kolon, asetonitril-fosfat tamponu (pH=3, 20:80, h/h) oluşan hareketli faz, izokratik elüsyon, 2 mL/dk akış hızı ve floresans dedektör ($\lambda_{eks}= 290 \text{ nm}$, $\lambda_{em}= 350 \text{ nm}$) 'den oluşan çalışma parametreleri ve iç standart olarak zolpidem, ayrıca plazmadan analitlerin ekstraksiyonu için sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemini kullanmışlardır. Mirtazapin için LOQ değeri 1 ng/mL, N-desmetilmirtazapin ve 8-hidroksimirtazapin içinse 2 ng/mL olarak tespit edilmiştir. Geliştirdikleri yöntem ile sağlıklı gönüllülerde mirtazapin ve metabolitlerinin miktar tayinini gerçekleştirmişlerdir.

2.4.2. Framasötik preparatlarda yapılan çalışmalar

Karaşen ve Altınöz, (2000) UV–spektrofotometri, 1.- ve 2.- derece türev spektrofotometri yöntemlerini kullanarak mirtazapin miktar tayinini gerçekleştirmişlerdir. Dalga boyu aralığı, çözücünün tipi, türevlendirme derecesi ve tekrar sayısı gibi parametreleri optimize etmişlerdir. UV, birinci–derece türev ve ikinci–derece türev spektrofotometrik yöntemlerinin çalışmasında, onun metanol çözeltilerinde mirtazapin derişimi 225–360 nm dalga boyu aralığında sırasıyla yöntemler 1–100, 2–100 ve 1–120 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu tespit edilmiştir. Geliştirilen yöntemler ile tabletlerde mirtazapin miktar analizleri gerçekleştirilmiştir.

Labat *et al.*, (2002) tabletlerde mirtazapin miktar tayini için spektrofotometri, spektroflorimetri, HPLC ve kapiler elektroforez (CZE) 'den oluşan dört analitik yöntem geliştirmişlerdir. Tüm yöntemlerde mirtazapin analizinden önce tabletlerden mirtazapin basit bir ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edilmiştir. Spektrofotometri yöntemi için 315 nm dalga boyunda, HPLC ve CZE yöntemleri için ise 220 nm dalga boylarında yapılan ölçümlerde 5–25 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu belirlenmiştir. Spektroflorimetri yönteminde ise ölçümler 328 nm dalga boyunda eksitasyon ve 415 nm dalga boyunda emisyon ölçümleri gerçekleştirilmiştir ve yöntemin 2–25 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu tespit edilmiştir. Validasyon çalışmalarında dört yöntemin benzer sonuçlar verdiği görülmüştür. Tabletlerde mirtazapin miktar tayini dört yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Dallet *et al.*, (2002) beş adet SSRI (fluvoksamin, floksetin, sertralin, paroksetin ve sitalopram), iki adet SNaRIS (venlafaksin ve milnasipran), bir adet NaSSA (mirtazapin) ve dört aktif metabolitler (norfloksetin, desmetilsitalopram, desmetilvenlafaksin ve desmetilmirtazapin) birbirlerinden ayrılması için UV dedektörlü (225 nm) RP–LC yöntemini geliştirmişlerdir. İki yeni nesil ters faz (RP) kolon (Satisfaction RP 18 AB ve Satisfaction C8+) kullanılarak izokratik elüsyon ile

asetonitril–sulu tampondan oluşan hareketli faz ile ayırımlar gerçekleştirilmiştir. Değişik sıcaklıklar kullanılmıştır.

Malfara *et al.*, (2007) 10 adet trisiklik ve trisiklik olmayan (imipramin, amitriptilin, klomipramin, floksetin, sertralin, paroksetin, sitalopram, mirtazapin, moklobemid ve duloksetin) antidepresanların belirlenmesi için HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Yöntemin geri kazanım değerleri % 72 ile % 86 arasında değiştiği sadece moklobemidin düşük geri kazanım değerine (% 59) sahip olduğu gözlenmiştir. Kromatografik ayırma UV dedektör (230 nm) ile izokratik koşullar altında bir ters faz select B kolonu kullanılarak 0,25 mol/L sodyum asetat tamponunun % 65 'inden (pH=4,5 'de) ve asetonitril / metanol (92:8, h/h) 'ünde % 35 'inden elde edilmiş hareketli faz kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Herbir madde için yöntem full valide edilmiştir.

Rao and Raju, (2009) farmasötik preparatlarda ve standart çözeltilerde mirtazapin ile ilişkili maddelerin miktar tayini ve ayırımları için fotodiyot dedektörlü HPLC yöntemini geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Mirtazapin parçalanma ürününü de içeren altı adet safsızlığı C8 kolonda % 0,3 trietilamin (pH=3,0)–asetonitril (78:22, h/h) 'den oluşan hareketli faz kullanılarak izokratik elüsyonla ayırmını sağlamışlardır. Tüm çalışılan analitlerin kromatografik davranışlarını farklı bileşimlerde, farklı sıcaklıklarda, farklı çözücü sistemlerinde, tampon derişimlerinde ve pH değerlerinde incelemişlerdir. Yöntemin günüçi ve günler arası kesinlik değerini (%BSS) % 0,98 değerinden küçük ve geri kazanım değerinin % 95,54 ile % 102,22 arasında olduğunu belirlemişlerdir.

Gondov and Petrkov, (2010) spesifik serotonergik antidepresan olan mirtazapin ve mainserinenin farmasötik preparatlarda miktar tayini için TLC–dansitometri yöntemini geliştirilip valide etmişlerdir. Silikajelden oluşan ince tabaka plakları ve hekzanizopropanol25amonyum (70+25+5, h/h/h) hareketli fazı kullanılmıştır. Yöntem ICH kılavuzlarına göre valide edilmiştir.

Youssef, (2010) mirtazapin analizi için birinci türev spektrofotometrik yöntemini geliştirmiştir. 0,1 M sülfürik asit ortamında 375–435 nm dalga boylarında pikten pike ölçümler gerçekleştirmiştir. Yöntemin 1 ile 400 ng/mL derişim aralığında ($r=0,9999$) doğrusal, LOQ değerini 1,0 ng/mL ve LOD değerini de 0,2 ng/mL olarak tespit etmiştir. Mevcut yöntemi ICH kılavuzuna göre valide etmiştir.

Bhusari *et al.*, (2011) antidepresan bir ilaç olan mirtazapinin zorlanmış degradasyon çalışmasında RP–HPLC yöntemini geliştirip valide etmişlerdir. ICH kılavuzlarında verilen zorlanmış degradasyon parametreleri uygulanmıştır. HPLC çalışma parametreleri, C18 kolon, su–asetonitril (80:20, h/h) hareketli faz, 225 nm dalga boyu ve 1 mL/dk akış hızıdır. Optimize edilen HPLC şartlarında alıkonma zamanı 8,43 dk ve geri kazanım değeri de % 101,37 olarak belirlenmiştir.

Anand and Bansal, (2011) mirtazapin etkin maddesinin hidroliz, oksidasyon, kuru ısı ve fotoliz şartlarında zorlanmış parçalanma çalışmasını gerçekleştirmişlerdir. Bozunma ürünleri ile ilacı LC–MS ve LC–UV yöntemleri ile analiz etmişlerdir. İlacın peroksit oksitleyici ortamda 37 °C 'de, hidrolitik ortamda 80 °C 'de ve termal bozunma ortamında 50 °C 'de ayrıca kuru ve alkali ortamında stabil olduğu belirlenmiştir. Fotolitik koşullarda % 5 'ten küçük bir oranda bozulmanın olduğu gözlenmiştir.

Özdemir vd., (2012) miratazpinin farmasötik preparatlarda miktar tayini için spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntem mirtazapinin metiloranj indikatörü arasında sarı renkli iyon çifti kompleksi oluşturması esasına dayanmaktadır. İyon çifti kompleksi diklormetan ile ekstre edilmiştir. Optimize edilmiş şartlar altında oluşan kompleksin 427 nm dalga boyunda maksimum absorbans verdiği tespit edilmiştir. Mirtazapinin doğrusallık aralığı 2,5–12,5 µg/mL olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntemin tabletlerde mirtazapin miktar tayininde güvenle uygulanabilir olduğu bildirilmektedir.

Benajeer *et al.*, (2012) farmasötik preparatlarda ve standart çözeltilerde mirtazapın miktar tayini için spektroskopik yöntem geliştirmişlerdir. Fosfat tampon çözücü sisteminde 232 nm dalga boyunda mirtazapının maksimum absorbans verdiği, 0,999 korelasyon sabitine sahip 5–30 µg/mL derişim aralığında Beer yasasına uyduğu belirlenmiştir. Farmasötik preparatlarda mirtazapının geri kazanım değeri %99,57–%100,26 değerine sahip olduğu bulunmuştur.

Bir başka çalışmada ise antidepresan bir ilaç olan mirtazapın analizi için voltametri ve HPLC yöntemi geliştirilip valide edilmiştir. Siklik voltametri yönteminde, asidik ortamda ilave bir dalga ve keskin bir oksidasyon piki gözlenmiştir. Cam karbon elektrot ile analizde 0,212 ve 26,54 µg/mL boron-doped diamond elektrot ile analizde de 1,06 ve 26,54 µg/mL derişim aralıklarında doğrusallık gözlenmiştir. Çalışma sonuçlarını test etmek için de HPLC ile analizler gerçekleştirilmiştir. HPLC şartları, C18 kolon, metanol–su (30:70, h/h; 15 mM o–fosforik asit içeren pH=3,0) hareketli faz ve 25 °C sıcaklık. HPLC çalışma aralığı 1,0 ile 18,0 µg/mL olarak tespit edilmiştir (Ağın *et al.*, 2013).

Murthy *et al.*, (2013) farmasötik formülasyonlar ve standart çözeltilerde mirtazapın miktar tayini için iki basit ve duyarlı ekstraktif görünür spektrofotometrik yöntem geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Tropaeoline ooo (TPooo, A method) ve Azokarmine–G (ACG, B method) isimlendirilen iki yöntem uygulanmış ve sırasıyla oluşan kompleksler 480 nm ve 540 nm dalga boylarında maksimum absorbans göstermiştir. Geliştirilen yöntemler ticari ilaçlara uygulanmıştır. Sonuçların tekrarlanabilir olduğu belirlenmiştir.

Ravi *et al.*, (2014) farmasötik preparatlarda ve standart çözeltilerde mirtazapın miktar tayini için dört ekstraktif spektroskopi yöntemini geliştirip valide etmişlerdir. Asidik ortamda bromkrezol mor (BCP), bromtimol mavisi (BTB), bromfenol mavisi (BPB) ve bromkrezol yeşili (BCG) ile mirtazapının kloroform ile ekstrakte edilebilen iyon–çifti kompleksleri oluşturularak spektroskopi ile analizleri gerçekleştirmişlerdir. Oluşturulan kompleksler belirteçlerin verildiği sıraya göre 405 nm, 412 nm, 405 nm ve 417 nm dalga boylarında maksimum absorbans

göstermişlerdir. BCG, BPB ve BTB ile oluşturulan kompleksler 2,0 ile 25 µg/mL derişim aralığında BCP ile oluşturulan kompleks de 2,5 ile 25 µg/mL derişim aralığında doğrusallık göstermiştir.

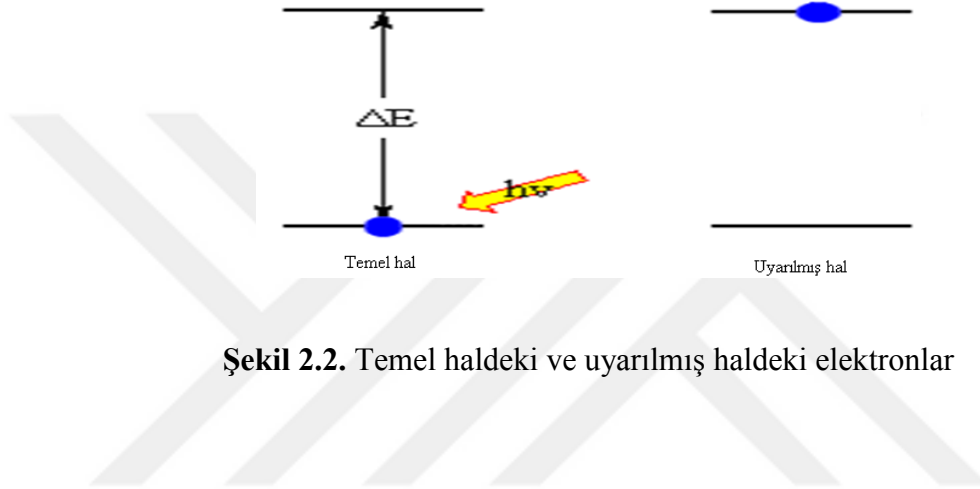
Gurke *et al.*, (2015) Mirtazapin etkin maddesinin de içinde bulunduğu ilaçların bitkilerde analizi için SPE–HPLC–MS/MS yöntemini geliştirip valide etmişlerdir.

2.5. Spektroskopi

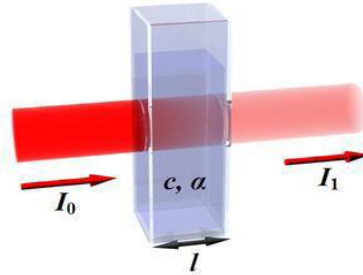
Elektromanyetik ışının madde ile etkileşmesi sonucu atom, molekül veya iyon elektronlarının buldukları enerji düzeyinden bir üst enerji düzeyine geçişleri sırasında absorplanan veya uyarıldıktan sonra geri dönerken yayılan elektromanyetik ışın şiddetinin ölçülmesinde ve yorumlanmasında kullanılan yöntem spektroskopi denir. Madde tarafından ışının absorplanma esasına göre çalışan sistemlere soğurma (absorpsiyon) spektroskopisi denir. Madde üzerine gönderilen belirli dalga boyundaki ışın absorplandıktan sonra daha büyük dalga boyunda ışın olarak yayınlanma esasına göre çalışan sistemlere ise yayınma (emisyon) spektroskopisi denir. Elektromanyetik ışının atomlar tarafından soğrulması veya soğrulan ışınların yayınmasını inceleyen spektroskopi tekniklerine Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi veya Atomik Emisyon Spektroskopisi denir. Elektromanyetik ışınların moleküller tarafından soğrulması ve yayınmasını inceleyen tekniklere de Moleküler Spektroskopi denir. Işınların moleküller tarafından soğrulması ve yayınması moleküldeki atomların türüne, düzenlenmesine, moleküllerin şekline, büyüklüğüne vb. bağlı olduğundan dolayı spektroskopik yöntemler maddelerin yapılarının ve stereokimyasal özelliklerinin bulunması, tanınması ve saflık kontrolü gibi çok geniş alanda kullanılmaktadır. Elektromanyetik ışının hem dalga hem de tanecik özelliği bulunmaktadır. Bu özelliklerden yararlanarak çeşitli teknikler türetilmiştir (Skoog *et al.*, 1998; Hollas, J.M., 2004). Gama ışınlarından Radyo dalgalarına kadar geniş bir dalga boyu aralığına sahip ışınlar madde üzerine gönderildiğinde bu ışınlardan sadece belli dalga boylarında bulunan ışınlar madde tarafından absorplanır. Bu

özelliğinden yararlanarak maddenin yapısı ve derişimi belirlenebilmektedir (Skoog *et. al.*, 1998) .

Elektromanyetik ışınmayı absorbe ederek en düşük enerji düzeyinden (temel düzey) uyarılmış düzeylere geçişleri Şekil 2.2 'de gösterilmiştir.



Spektrofotometrik ölçümler, madde üzerine gönderilen ışın şiddeti (I_0) madde tarafından ışın absorplandıktan sonra maddeden çıkan ışın şiddeti (I) ölçülüp bunlardan geçirgenlik (transmittans) ve absorbans değerlerinin belirlenmesi üzerine oluşturulmuştur (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Numune üzerine gönderilen ve çıkan ışın şiddeti (l = ışının numune içinde aldığı yoldur)

Bir çözelti içinden geçen ışın şiddetindeki değişim, ışının çözelti içinde aldığı yol ve çözeltinin derişimiyle logaritmik olarak ters orantılıdır ve absorplanan ışın miktarı ise doğru orantılıdır. Bu özellik Lambert-Beer yasası ile incelenmektedir. Lambert-Beer yasasının matematiksel olarak ifadesi Eş. 2.1 ile verilmektedir.

$$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon l C} \quad (2.1)$$

Burada;

I = Numuneyi terk eden ışın şiddeti

I_0 = Numune üzerine gönderilen ışın şiddeti

ϵ = Molar absorplama katsayısı

C = Absorpsiyon yapan türlerin derişimi

l = Işın aldığı yol

Eşitlikten geçirgenlik $T = \frac{I}{I_0}$ denklemi ile absorbans ise geçirgenliğin ters işaretlisi olarak $A = \frac{I_0}{I}$ 'dır. Buradan absorbans $A = \frac{I_0}{I} = \epsilon l C$ 'dir. Bu durumda bu eşitlik kısaca;

$$A = \epsilon l C \quad (2.2)$$

şeklinde verilir ve bu eşitlikten derişim kolaylıkla hesaplanabilir (Skoog *et. al.*, 1998; Viggiano, 2006).

2.5.1. UV – Görünür bölge spektroskopisi

Madde üzerine gönderilen ışınlardaki bazı dalga boylarında olanlar madde tarafından absorplanır. Maddenin hangi dalga boylarındaki ışınları absorplayacağı kendine özgüdür. Bir maddenin absorplayacağı ışın şiddeti ise madde miktarı ile orantılıdır. Bu özellikten yararlanarak nitel ve nicel analizler yapılabilmektedir. Bu amaçla madde üzerine çok çeşitli enerjilere sahip ışınlar gönderilebilir. Madde ile etkileşen

ışının enerjisi değiştiğinde madde ile etkileşim mekanizması da değişir. Buna bağlı olarak ölçüm tekniğinin de değişmesi gerekir. Bu nedenle elektromanyetik spektrumun tümü için ölçüm yapılabilecek tek bir cihazın bulunması mümkün değildir. Elektromanyetik spektrumun farklı bölgeleri için farklı cihazlar kullanılır. Dalga boyu 110 nm–1000 nm arasındaki UV ve görünür bölge ışınları ile çalışılabilen cihazlara UV–Görünür Bölge Spektrofotometreleri denir. Hem organik, hem de anorganik moleküller UV ve görünür bölge ışınlarını absorplarlar. Her iki grup molekülde de ışın absorpsiyonu elektron geçişi ile gerçekleşmesine rağmen etkileşim mekanizmaları farklıdır. Organik moleküllerdeki absorpsiyon molekül orbital teorisine göre, anorganik moleküllerdeki absorpsiyon ise kristal alan teorisine göre açıklanır (Skoog *et. al.*, 1998; Viggiano, 2006; Gündüz, 2007).

2.5.2. UV–Görünür bölge absorpsiyon spektrofotometreleri

Bir madde üzerine gönderilen ışının madde tarafından absorplanması ve yayınmasını incelemek üzere kullanılan cihazlara absorpsiyon spektrometresi veya emisyon spektrometresi adı verilir. Şekil 2.4 'de verilen spektrofotometre düzeneğinde ışın kaynağı, dalga boyu seçicisi ve dedektörden oluşan kısımlar bulunmaktadır. Dedektör maddeden çıkan ışınların elektrik sinyaline çevrilmesini sağlayan optik sinyal bir kaydedicidir (Skoog *et. al.*, 1998; Viggiano, 2006; Gündüz, 2007; USP 37, 2014).



Şekil 2.4. Bir spektrofotometrenin temel bileşenleri

Bu dört ana bileşenlere ek olarak spektrofotometrelerde ışın kaynağından gelen ışınları toplamak, odaklamak, yansıtmak, iki demete bölmek ve örnek üzerine belli bir şiddette göndermek amacıyla mercekler, aynalar, ışın bölücüleri, giriş ve çıkış aralıkları (slit aralığı) vardır. Cihazda örnekler kullanılan dalga boyu bölgesindeki ışınları geçiren maddeden yapılmış kuvarz küvetlere konulup ışın yoluna yerleştirilirler (Skoog *et. al.*, 1998; Viggiano, 2006; USP 37, 2014).



Şekil 2.5. UV–Görünür alan spektrofotometresi

2.5.3. Işın kaynakları

Spektroskopik çalışmalarda, ölçümlerde kolayca belirlenebilecek ve ölçülebilecek yeterli güçte ışın demetleri oluşturan kısımlar ışın kaynaklarıdır. Işın kaynaklarının ürettiği ışınların şiddeti, belirli bir süre içinde sabit kalmalıdır. Bu yüzden kaynaktan sabit bir ışın gücü sağlamak için, potansiyelinin istenilen kararlılıkta tutulması gereklidir. Kaynaktan gelen ışın şiddetini çok iyi kontrol etmek yerine, çift-ışınlı cihazları kullanmak tavsiye edilir. Bu cihazlarda, numuneden geçen ışının şiddeti, kör numuneden geçen ışın şiddeti ile mukayese edilir (Skoog *et. al.*, 1998; Viggiano, 2006; Gündüz, 2007; USP 37, 2014).

Soğurma cihazlarında kullanılacak ışın kaynakları, tayin ve ölçüm için yeterli güçte olmalı ve sürekli, yani kullanılan bölgedeki bütün dalga boylarında ışın vermelidir. UV bölge ışınlarını elde etmek için düşük basınçlı hidrojen veya döteryum lamba (D₂) kullanılırken, görünür bölge ışınlarını elde etmek için de Tungsten lamba (Wolfram, W) kullanılır. Tungsten lambalar 320–2500 nm aralığında sürekli bir

spektrum verirler. Döteryum lambalar 180–375 nm aralığında sürekli spektrum verirler. D₂ lambalarının kullanım aralığı H₂–lambaların ki ile aynıdır, fakat ışın şiddeti daha yüksek olup yaklaşık üç katı kadardır (Skoog *et. al.*, 1998; Viggiano, 2006; Gündüz, 2007).

2.5.4. Dalga boyu seçiciler

UV–Görünür Bölge Spektrofotometrik çalışmalarda belli bir dalga boyunda oluşturulan ışınlar madde üzerine gönderilerek analizler gerçekleştirilir. Seçilen dalga boyu maksimum absorbansın olduğu aralıkta ise duyarlılık artmış olur ve diğer dalga boylarında soğurma yapan maddelerin girişimi engellenmiş ve seçimlilik artırılmış olur. Bu nedenle istenilen dalga boyulu ışınları elde etmek için filtreler ve monokromatörlerden yararlanılır. Filtreler; renkli çözeltiler, renkli camlar, cut off (dalga boyu sınırlayıcı filtreler), interferans (girişim) filtreleri olup, monokromatörler; optik ağlar ve prizmalar şeklinde sınıflandırılabilir (Skoog *et al.*, 1998; Viggiano, 2006).

2.5.5. Örnek kapları

Spektrofotometrelerde çalışılan bölgede ışınları absorplamayan ve geçirgen özelliğe sahip maddelerden yapılmış numune kapları kullanılır. Bunlara sel veya küvet denir. UV bölgesinde kuartzdan yapılmış küvetler kullanılır. Bunlar 20 nm–300 nm dalga boyu aralığında kullanılırlar. Silikatten yapılmış cam küvetler ise 350 nm–2000 nm bölgesinde kullanılabilirler. Öğrenci laboratuvarlarında görünür bölge çalışmalarında plastikten yapılmış küvetler kullanılabilir. Küvetler dikdörtgenler prizması şeklinde olup en çok kullanılanların genişliği 1 cm 'dir. Küvetlerin ışın doğrultusundaki yüzeyleri temiz olmalıdır. Parmak izi gibi diğer kirlilikler sonuçlarda hataların oluşumuna sebebiyet verir ve tekrarlanabilir ölçümler alınamaz (Skoog *et. al.*, 1998; Viggiano, 2006; Gündüz, 2007).

2.5.6. Dedektörler

Spektrofotometrelerde genellikle foton ve termal dedektörler kullanılmaktadır. UV ve görünür bölgede en çok ışın enerjisini elektrik enerjisine çevirerek ölçüm yapan foton dedektörler kullanılmaktadır. Bu dedektörler tüm ışınları soğuran aktif bir yüzeye sahiptirler ve ışınlar soğurulduktan sonra ya fotoelektronlar oluşur ve yayımlanır ya da elektronlar iletkenlik bantlarına geçirilerek fotoiletim oluşur. Foton dedektörleri; fotovoltaiik piller, fototüpler, fotoiletken piller ve silisyum diyotlar şeklinde gruplanıp incelenebilir. İdeal bir dedektör aşağıda verilen özelliklere sahip olması gerekir (Skoog *et. al.*, 1998; Gündüz, 2007) :

- ✓ Duyarlılığı yüksek olmalı,
- ✓ Sinyal/gürültü oranı yüksek olmalı,
- ✓ Geniş bir dalga boyu aralığında spektral yanıtı sabit olmalı,
- ✓ Aydınlatma yokken çıkış sinyali en az olmalı, yani dark akım küçük olmalı,
- ✓ Yanıtlama süresi kısa olmalı,
- ✓ Alınan sinyal, ışın gücü ile doğru orantılı olmalıdır.

2.5.7. UV–Görünür bölge spektroskopi yönteminin uygulama alanları

UV–Görünür Bölge Spektroskopi yöntemi çeşitli analizlerde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu alanlardan ikisi aşağıda verilmiştir.

2.5.7.1. Nitel analiz

Bilinmeyen bir maddenin analizinde ilk önce madde saflaştırıldıktan sonra uygun bir çözücüde çözülerek spektrumu alınır. Alınan bu spektrum bilinen bileşiklerin aynı şartlarda alınmış spektrumları ile karşılaştırılır. Bu karşılaştırmada birbiri ile uyum gösteren spektrumdaki madde ile benzer madde olduğu söylenebilir. Ayrıca maddede bulunan kromofor grupların vermiş olduğu spektrumlardan yararlanarak maddenin

yapısı hakkında yaklaşık bir bilgi verilebilir. Bilinmeyen maddelerin yapısı hakkında kesin bir bilgi bu yöntem ile elde edilemez. Çünkü moleküllerin absorpsiyon bantları oldukça geniştir ve bazı kromoforların absorpsiyon bantları birbiri ile çakışabilir. Ayrıca moleküllerin UV–Görünür Bölge absorpsiyon spektrumlarında çok az sayıda bant bulunur. Bu az sayıda bandın birbiri ile karşılaştırılarak karar verilmesi bazen hatalı sonuçlara yol açabilir (Skoog *et. al.*, 1998; Gündüz, 2007).

2.5.7.2. Nicel analiz

Spektroskopik yöntemler nicel analiz için daha çok kullanılan yöntemlerdir ve oldukça yararlı ve güçlü yöntemlerdir. Spektroskopi yöntemlerin klasik yöntemlere göre avantajlı ve dezavantajlı yanları vardır. Bunlar (Skoog *et. al.*, 1998; Gündüz, 2007) :

- Sonuçlar çabuk alındığından dolayı analiz süresi kısadır.
- Doğruluk derecesi yüksektir. Çoğunlukla analizlerdeki hata binde bir veya iki civarındadır.
- Oldukça duyarlı bir yöntemdir. 10^{-8} M 'a kadar seyreltik çözeltilerin analizleri yapılabilir.
- Her maddenin kendine özgü bir absorpsiyon spektrumu olduğu için seçiciliği yüksektir. Çoğunlukla bir karışımdaki maddeler bir ön ayırma işlemine gerek kalmaksızın analizleri yapılabilir.
- Hem organik hem de anorganik pek çok molekül UV–Görünür Bölge ışınlarını absorpladığından uygulama alanı geniştir.

2.6. Türev Spektrofotometri Yöntemi

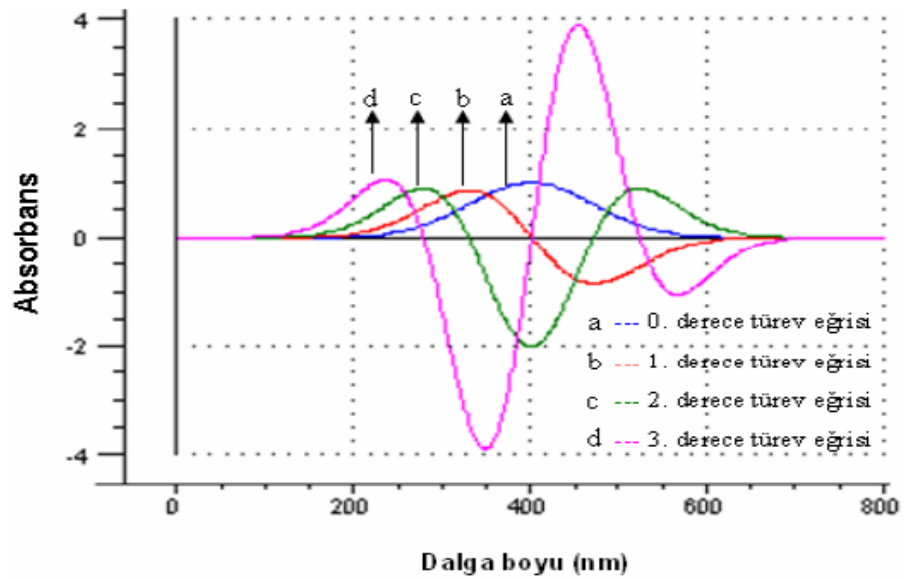
Türev spektrofotometri, UV–Görünür Bölge spektrumlarının türevlerinin alınması esasına dayalı bir analiz yöntemidir. Bu yöntem geniş bir uygulama alanı bulmuştur. Bunun nedeni, türev spektrofotometri tekniği ile orijinal spektrumun eğimleri hakkında bilgi vererek spektrumun omuz noktaları ile dönüm noktalarının daha

belirgin hale gelmesinden dolayıdır. Böylece bir bileşik daha kolay ve daha kesin olarak tanımlanabilir. Yöntemin dezavantajı ise, yüksek türev derecelerinde S/G oranının bozulması, pik şekillerinde bozulma ve dönüm noktası kaymasıdır. Bu nedenle uygulanacak türevin derecesi iyi seçilmelidir (Anonim, 2005; Gündüz, 2007; Uddin, 2012).

2.6.1. Teorik temelleri

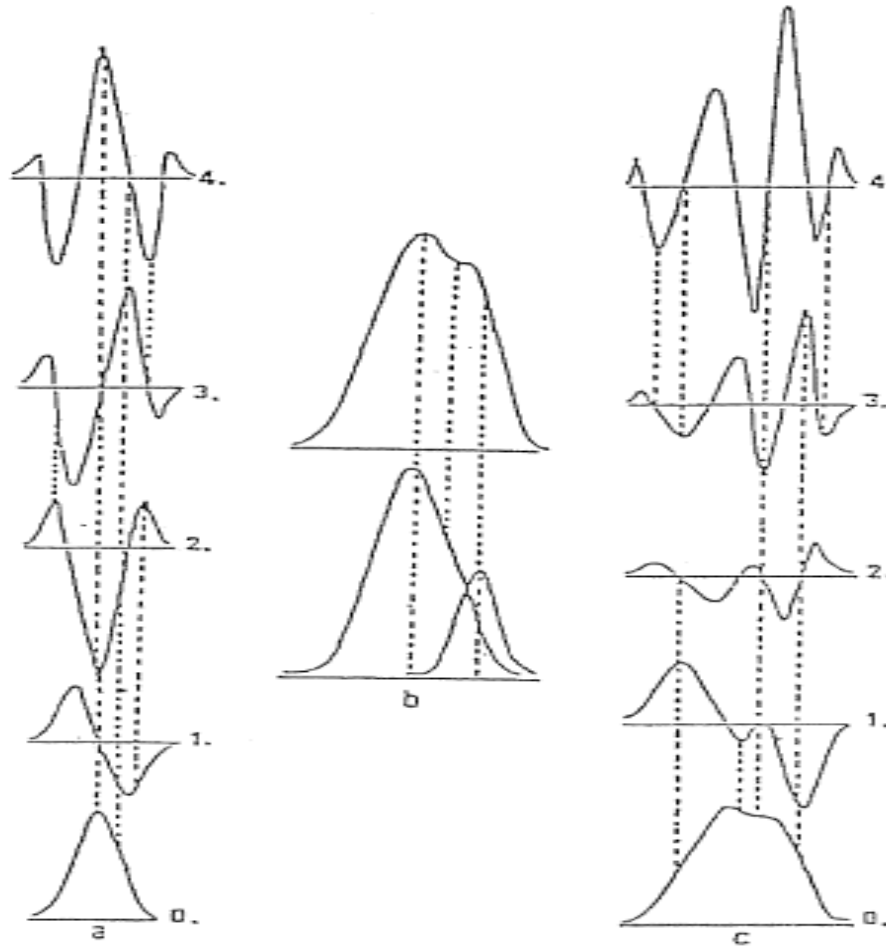
UV spektrumu, madde üzerine gönderilen ışığın dalga boylarına karşı absorbands değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilir. UV spektrum veya sıfırıncı derece spektrum, $A=f(\lambda)$ fonksiyonudur. Bir fonksiyonu gösteren eğrinin herhangi bir noktasındaki teğetin eğimi, fonksiyonun bu noktadaki türevidir ($dA/d\lambda$). Bu fonksiyonun her noktasındaki türevi hesaplanabilir. Eğer bu türev değerleri grafiğe geçirilecek olursa "türev spektrumu" elde edilir ve 1'den n'e kadar derecede türevi alınabilir.

Şekil 2.6. 'da 0, 1, 2 ve 3. derece türev eğrileri görülmektedir. Türevlendirme işlemi ile spektrum daha ayrıntılı ve net bir görünüm kazanır (Anonim, 2005; Gündüz, 2007; Uddin, 2012).



Şekil 2.6. 0, 1, 2 ve 3. Derece türev eğrisi spektrumları

Orijinal Gauss eğrisi tipindeki bir pike karşılık n . türevde $n+1$ tane maksimum ve minimum abasorbans piklerine rastlanmaktadır. Yani birinci derece türev eğrisinde iki, ikinci derece türev eğrisinde üç, üçüncü derece türev eğrisinde ise dört tane maksimum ve minimum absorbanans noktaları görülmektedir (Şekil 2.7) (Akgün, 2001). Teorik olarak türev absorbanans değerleri ile bileşiğin derişimi arasında aşağıdaki bağıntılar mevcuttur (Anonim, 2005; Gündüz, 2007; Uddin, 2012).



Şekil 2.7. Çeşitli şekillerdeki Gauss Diyagramlarının türev spektrumları (Akgün, 2001). a. Gauss diyagramının temel, 1, 2, 3, 4. Türevleri; b. Eşit olmayan iki Gauss diyagramının temel spektrumu; c. Üst üste çakışmış ve eşit olmayan iki Gauss diyagramının temel, 1, 2, 3, 4. Türevleri

2.6.2. Türev spektroskopisi yönteminin uygulamaları

Türev spektroskopisi genellikle, a- ilaç analizlerinde, b- aynı spektral bölgede absorpsiyon yapan ilaç karışımlarının tayininde, c- etkin maddenin bozunma ürünü varlığındaki tayininde, d-bozucu etki yapan matriks bileşenlerinin varlığında etkin maddenin tayininde uygulanmaktadır.

2.7. Kromatografi

Bir karışımdaki bileşenlerin ayrılması, tanınması ve miktar tayininin yapılması için yaygın olarak kullanılan analitik tekniğe kromatografi denir. Kromatografik ayırılarda sabit bir faz üzerinden hareketli bir faz yardımıyla geçirilen bileşenlerin farklı yürüme hızlarından yararlanılarak ayırımları sağlanır. Sabit faz bir kolon içine doldurulmuş veya düz bir yüzeye kaplanmış maddelerdir. Hareketli fazda numuneyi sabit faz üzerinde yürütmesini sağlayan herhangi bir çözücü veya çözücü karışımları olabildiği gibi gaz da olabilmektedir. Hareketli faz sıvı olan kromatografi tekniğine sıvı kromatografisi, gaz olan kromatografi tekniğine de gaz kromatografisi denilmektedir. Kromatografi hem kalitatif amaçlı hem de kantitatif amaçlı analizlerde kullanılmaktadır (Skoog *et al.*, 1998; Gündüz, 2007).

Kromatografi 1906 yılında Tswett isimli bilim adamının yapmış olduğu çalışmayla bilim alanına ve bilimsel çalışmalara dâhil edilmiştir. Yapılan bu çalışmada bilim adamı bitki yapraklarını petrol eterinde beklettikten sonra kalsiyum karbonat doldurduğu bir kolon içerisinden bu çözelti karışımını petrol eteri ile yürütmüştür. Bu yürütme sonucunda kolonda renkli bantlar oluştuğu görülmüştür. Bundan dolayı da renkli yazılım anlamına gelen kromatografi terimi kullanılmıştır. *Kroma* renk *grafi* yazılım yani renkli yazılım denilmektedir. 1938 yılında ince tabaka kromatografisi Türk asıllı Rus araştırmacı Izmailov tarafından keşfedilmiş olup 1950 yılında Stahl tarafından pratikte kullanılış şekli ile tanıtılmıştır. 1941 yılında Martin–Synge kolon dağılma kromatografisi esaslarından bahsetmiş ve sıvı–sıvı kromatografisi ortaya çıkmıştır. Martin–James gaz–sıvı kromatografisini geliştirmiş

ve diğer yöntemlerden farklı olarak hareketli fazda gaz kullanılmış ve bu çalışma 1952 yılında Nobel ödülüne layık görülmüştür. 1967 yılında Huber ve Hulsman adlı araştırmacılar kolon teknolojisini geliştirerek yüksek performanslı pompa sistemleri ve duyarlı dedektörlerin kullanılması ile yüksek performanslı sıvı kromatografisinin temellerini ortaya atmışlardır (Dola and Jupille, 2012).

2.7.1. Kromatografinin sınıflandırılması

Kromatografik yöntemler, teorik (ayırma temel prensiplerine göre) sınıflandırma ile hareketli ve sıvı faza göre sınıflandırma olmak üzere iki şekilde sınıflandırılabilir (Hamilton and Sewell, 1982; Skoog *et al.*, 1998; Gündüz, 2007).

A- Teorik Sınıflandırma

- a- Adsorpsiyon Kromatografisi
- b- Dağılıma (Paylaşım) Kromatografisi
- c- İyon-Çifti Oluşum Kromatografisi
- d- İyon Değişirme Kromatografisi
- e- Eleme (Boyutlandırma) Kromatografisi
- f- Afinite Kromatografisi

B- Hareketli ve Sabit Faza Göre Sınıflandırma

1. Hareketli Faz Gaz (Gaz Kromatografisi)

- a- Sabit Faz Katı (Gaz-Katı Kromatografisi)
- b- Sabit Faz Sıvı (Gaz-Sıvı Kromatografisi)

2. Hareketli Faz Sıvı (Sıvı Kromatografisi)

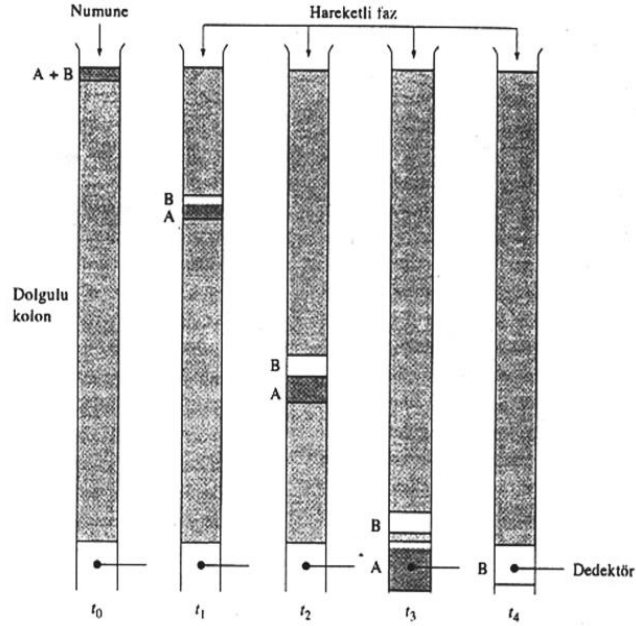
- a- Sabit Faz Düzlemsel
 - Kâğıt Kromatografisi
 - İnce Tabaka Kromatografisi
- b- Sabit Faz Kolon İçerisinde
 - Katı-Sıvı Kromatografisi
 - Sıvı-Sıvı Kromatografisi
 - İyon Değişim Kromatografisi

- Boyutlandırma (Jel Filtrasyon ve Jel Geçirgenlik) Kromatografisi
- Bağlı Faz Kromatografisi
- Afinite Kromatografisi

3. Hareketli Faz Süper Kritik Akışkan (Süper Kritik Akışkan Kromatografisi)

Kolon kromatografisinde, sabit faz bir kolonda (cam veya demir, çelik bir boru) tutulur ve hareketli faz basınç altında bu sabit fazın arasından geçmeye zorlanır. Düzlemsel kromatografide, sabit faz bir kâğıt veya düz bir plaka üzerine tutturulmuş silikajel veya alüminadan oluşmuştur ve hareketli faz sabit faz üzerinden kapiler etkisiyle veya yer çekimi etkisiyle hareket eder. Her iki kromatografinin de dayandığı ilkeler aynıdır. Bu türlerde kullanılan hareketli fazlar sırasıyla sıvı, gaz ve süperkritik akışkandır. Sadece sıvı kromatografi, hem kolonlarla hem de düz yüzeyler üzerinde gerçekleştirilebilir, gaz kromatografi ve süperkritik akışkan kromatografisi yalnız kolonlarda gerçekleştirilebilir.

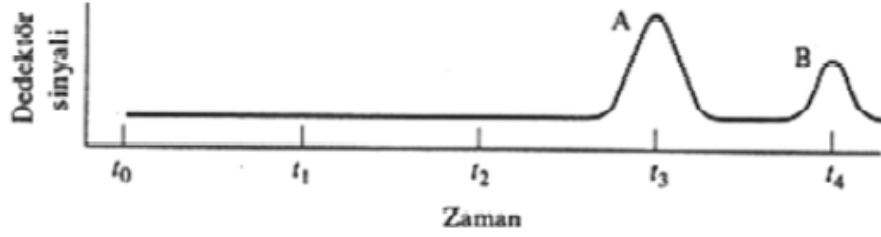
Elüsyon işlemi bir kolondan sürekli taze çözücü geçirerek çözülmüş bileşenin sabit faz boyunca hareket ettirilerek ayrılması ve kolon sonunda toplanmasıdır. Kolondan geçirilen hareketli faz, numuneyi kolonda hareket etmeye zorlar ve bu arada numunenin hareketli faz ve sabit faz arasındaki farklı dağılıma ve farklı yürüme hızlarından yararlanarak ayırma gerçekleştirilir. Fakat çözünen madde hareketi sadece hareketli fazda olduğu için, çözünen maddelerin kolonda göç ettiği ortalama hızı, onun hareketli fazda geçirdiği zaman ile orantılıdır. Sabit fazın kuvvetle tuttuğu maddeler kolonu daha geç terk ederler. Yürüme hızlarında meydana gelen farklılıklar bir karışımdaki bileşenlerin kolonu farklı zamanlarda terk etmesine sebep olur (Hamilton and Sewell, 1982; Skoog *et al.*, 1998; Gündüz, 2007).



Şekil 2.8. Bir kolon kromatografisinde A ve B bileşenlerinin ayrılma diyagramı

Şekil 2.8.'den görüleceği gibi B, sabit faz tarafından A'ya göre daha kuvvetli tutulduğu için kolonda daha yavaş yürümektedir. Kolonda aşağıya doğru ilerleme oldukça her iki madde arasındaki mesafe artacaktır. Şekilden görüldüğü gibi kolonu ilk önce A bileşeni daha sonra da B bileşeni terk edecektir.

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ve Gaz Kromatografisi (GC) gibi kromatografi türlerinde kolonun çıkış kısmına bir dedektör yerleştirildiğinde gelen maddenin ve dedektörün özelliğine göre pikler elde edilir (Şekil 2.9). Çalışma sonucunda elde edilen grafiğe kromatogram adı verilir. Kromatogramlardan hem nitel hem de nicel bilgiler elde edilir (Hamilton and Sewell, 1982; Skoog *et al.*, 1998; Gündüz, 2007).



Şekil 2.9. Kromatografik ayırma sonucu elde edilen bir kromatogram örneği

2.7.2. Adsorbsiyon kromatografisi

Adsorpsiyon kromatografisinde düz bir yüzey veya kolon içerisindeki katı destek maddesi (sabit faz) yüzeyine karışımdaki bileşenlerin farklı tutunma (adsorpsiyon) hızlarından yararlanarak ayrılması sağlanan kromatografi türüdür. Sabit fazdaki mevcut gözeneklerde maddenin farklı tutunma hızları ile hareketli fazda ki farklı çözünme hızları birbirleriyle yarışma halindedir. Bu yarışmada sabit fazda daha az tutunan ve hareketli fazda daha fazla tutunan maddeler kolonu erken terk ederler. Sabit fazda daha fazla tutunan hareketli fazda daha az çözünen maddeler ise kolonu daha geç terk ederler. Adsorban madde olarak silika ve alümina kullanılır. Bu maddeler polar olduğundan dolayı polar bileşenler bu yüzeylere ilgi gösterir ve dipol–dipol, dipol–indirgenmiş dipol ve hidrojen bağı gibi etkileşmelerle geri dönüşümlü olarak yüzeyde tutulurlar. Polar maddeleri ayırmak için polar sabit faz, apolar maddeleri ayırmak için apolar sabit faz kullanılır. Bir maddenin tutunma gücü, moleküldeki fonksiyonel grup türüne ve sayısına bağlıdır (Hamilton and Sewell, 1982; Skoog *et al.*, 1998; Gündüz, 2007).

2.7.3. Dağılma (paylaşım) kromatografisi

Dağılma kromatografisi, katı bir destek yüzeyine tutturulmuş sıvı bir sabit faz ile sıvı hareketli faz arasında karışımdaki maddelerin farklı çözünme hızlarından yararlanarak maddelerin ayrılmasında kullanılan kromatografi tekniğidir. Ayrılacak maddeler her iki sıvı fazda çözünme oranları farklı olduğundan dolayı dağılma

katsayıları da farklıdır. Dağılma katsayı farklılıklarına göre karışımdaki maddeler kolon içerisinde farklı hızlarda yürürler ve bu şekilde ayırma gerçekleşir. Çözünen madde kolonda sadece hareketli fazla taşındığından, ortalama göç hızı, çözünen maddelerin hareketli fazda geçirdiği zamanın sabit fazda geçirdiği zamana oranına bağlıdır. Sabit faz tarafından kuvvetli tutulan türler için bu oran küçük, hareketli fazda tutulma büyük ise aynı oran büyüktür (Hamilton and Sewell, 1982; Skoog *et al.*, 1998; Gündüz, 2007).

Dağılma kromatografisinde katı destek yüzeyine tutturulan sıvı fazın farklı tekniklerde tutturulmasından dolayı sıvı-sıvı ve sıvı-bağlı faz kromatografisi olmak üzere iki sınıfa ayrılabilir. Sıvı-sıvı tekniğinde sabit faz katı yüzeyine fiziksel adsorpsiyonla ve bağlı faz tekniğinde ise kovalent kimyasal bağlarla katı destek üzerine tutturulur. Bağlı faz dolgu maddeleri, fiziksel olarak yüzeye tutturulmuş dolgulara göre daha kararlı olma gibi bir üstünlüğe sahiptir. Yüzeye fiziksel olarak tutturulan fonksiyonel gruplar zamanla hareketli fazda çözünerek sürüklenebilir ve etkisizleştirilebilir (Hamilton and Sewell, 1982; Skoog *et al.*, 1998; Gündüz, 2007).

Dağılma kromatografisi sabit faz ile hareketli fazın polaritelerine göre normal faz ve ters faz sıvı kromatografisi olmak üzere ikiye ayrılır.

2.7.3.1. Normal faz sıvı kromatografisi

Sabit faz polar hareketli faz ise apolar ise normal faz kromatografisi olarak adlandırılır. Normal faz kolonlarda, kolon dolgu maddesi olarak silika veya alümina kullanılır. Hareketli faz olarak da hekzan, izo-propil, metilen klorür, metil bütül eter, kloroform ve bunların karışımları gibi apolar çözücülerdir. Silika üzerine farklı polaritelerdeki $-CN$, $-NO_2$ ve $-NH_2$ gibi gruplar bağlanarak farklı sabit fazlar elde edilebilmektedir. Normal faz sıvı kromatografisinde apolar bileşikler kolonu erken terk ederken polar bileşikler kolonu daha geç terk ederler (Hamilton and Sewell, 1982; Meyer, 1988; Skoog *et al.*, 1998; Gündüz, 2007).

2.7.3.2. Ters faz sıvı kromatografisi

Ters faz kromatografisinde ise sabit faz apolar hareketli faz polardır. Sabit faz alkil zincirlerinin katı destek yüzeyine bağlanması ile üretilmektedir. Bu tür dolgu maddelerinde uzun zincirli hidrokarbon grupları parçacık yüzeyine dik ve birbirine paralel şekilde yerleştirilerek apolar bir yüzey elde edilmiş olur. C8 veya daha kısa zincirli hidrokarbonlar, sikloheksil ve fenil bağlı sabit fazlar da kullanılmaktadır. Fenil grupları alkil gruplarına göre daha polardır. En sık kullanılan kolonlar ise oktil (C18) veya oktadesil silan bağlı dolgu maddeli olanlardır. Bu kromatografi türünde hareketli faz olarak su, metanol, asetonitril gibi polar çözücüler kullanılır. Ayırma esnasında polar maddeler kolonu ilk olarak terk ederken apolar maddeler sabit fazla daha fazla etkileştikleri için kolonu daha geç terk ederler (Hamilton and Sewell, 1982; Meyer, 1988; Skoog *et al.*, 1998; Gündüz, 2007).

Ters-faz sıvı ve normal-faz sıvı kromatografisinde maddenin polaritesine göre ayrılma dereceleri Tablo 2.2 'de verilmiştir.

Tablo 2. 2. Normal faz ve ters faz sıvı kromatografisinde polariteye göre ayrılmalar

	Normal-faz	Ters-faz
Sabit Faz Polaritesi	Yüksek	Düşük
Hareketli Faz Polaritesi	Düşük	Yüksek
Elüsyon sırası	Az polar önce	Polar önce

2.7.4. İyon çifti kromatografisi

İyonik bileşiklerin ayrılması ve analizinde kullanılan iyon çifti (veya eşleşmiş iyon) kromatografi tekniği bir tür ters faz dağılma kromatografisidir. Sabit faz tayini yapılacak iyonik bileşikle zıt yüklü karşıt iyondan oluşan iyonik bir bileşiktir. Hareketli faz ise metanol ve asetonitril gibi bir organik çözücü içeren sulu tampon çözeltisidir. Sabit fazdaki karşıt iyon analitle (iyonik bileşik) birleşerek sabit faz yüzeyinde alıkonulabilen nötral iyon çifti oluşturur. İyon çifti güçlerine göre maddeler kolonu erken veya geç terk ederler (Krstulovic and Brown, 1982; Basci vd., 1998).

Dağılma kromatografisi yöntemiyle iyonlaşabilen maddelerin ayrılmasında sorunlar yaşanabilmektedir. Bundan dolayı hareketli fazın pH 'sının değiştirilmesi ve denetlenmesiyle sulu ortamda iyonlaşabilen bu maddelerin ters faz kolonla ayrımları sağlanabilir. Bu işleme de iyon bastırma denir ve hareketli faz pH 'sı analitin pKa değerine yakın olduğunda pH 'da yapılan küçük değişiklikler alıkonma süresinde büyük değişikliklere yol açabilir. İyon bastırma tekniği, analitin kuvvetli asidik ($pK_a \leq 3$) ve kuvvetli bazik ($pK_a \geq 8$) olduğu koşullarda uygulanır. Ayrıca, hareketli faza, karşı iyon adı verilen maddeler eklenerek kromatografik ayırım daha da iyileştirebilmektedir. Hareketli faza eklenen iyon; ya iyon çifti oluşturarak ya da ayrılan madde ile kromatografik etkileşme içinde yarışarak veya dolgu maddesindeki silanol uçlarını dinamik olarak kapatarak kromatografik ayırımı gerçekleştirebilirler. Bazı durumlarda, hareketli faza iyon çifti oluşturucu madde eklemek kromatografik ayırımı sağlayacak tek yoldur (Krstulovic and Brown, 1982; Basci vd., 1998; Skoog *et al.*, 1998; Gündüz, 2007).

Tablo 2. 3. İyon-Çifti Kromatografisi tipleri ve uygulama alanları

Karşı iyon tipi	Uygulaması
Kuaterner aminler (tetraetil, tetrametil, trimetilamonyum)	Kuvvetli asitler, sülfolanmış boyalar, karboksilik asitler, hidrokortizon ve tuzlar
Bis-(2-etilhegzil) fosfat	Fenoller
Tersiyer aminler (triethylamin)	Sülfonatlar, karboksilik asitler
Alkil sülfonik asitler (metan, pentan, hegzan, heptan veya hegzan sülfonik asit)	Kuvvetli ve zayıf bazlar, benzalkonyum tuzları, katekolaminler, peptidler, opium alkaloidleri
Perklorik asit	Geniş bir pH aralığında aminler, peptidlerle güçlü iyon çifti oluşumu
Alkil sülfonatlar (oktil, desil, dodesil)	Sülfonik asit benzeri etki

2.7.5. İyon değiştirme kromatografisi

Sabit faz üzerinde bulunan değiştirilebilir katyon veya anyon gruplarıyla numunedeki katyon veya anyonların eşdeğer miktarlarda karşılıklı yer değiştirmesi esasına göre yapılan ayırma tekniğine iyon değiştirme kromatografisi denir. İyon değiştirme kromatografisi, kullanılan iyon değiştiricilerin anyon veya katyon değiştirmesine göre sırasıyla anyon değiştirme kromatografisi ve katyon değiştirme kromatografisi olarak adlandırılır. Anyon değiştirme kromatografisinde, sabit faz üzerine kovalent bağlı iyonlar pozitif yüklüdür ve kendisine hareketli bir anyon bağlıdır. Kolon içerisinden numune geçerken negatif yüklü iyonları sabit faz kendine doğru çeker ve çözeltideki anyonlar ayrılır, sadece katyonlar kolondan ayrılır. Sabit faz üzerine bağlanan anyonlar OH^- ve Cl^- gibi iyonik gücü ayarlanmış anyonik çözeltiler geçirilerek ayrılması sağlanır. Katyon değiştirme kromatografisinde ise benzer şekilde katyonların ayrılması sağlanır. İyon değiştirici dolgu maddeleri silika üzerine iyonik fonksiyonel grupların bağlanmasıyla elde edilir. İyon değiştirme

mekanizmasında hareketli fazın pH 'sı ve iyonik gücü alıkonma süresi üzerinde, hareketli fazın organik çözücü içeriğine oranla daha fazla etkilidir. Ayrılacak madde ile sabit faz arasında ne kadar kuvvetli bağ ve elektrostatik çekim oluşursa alıkonma o kadar güçlü olur (Skoog *et al.*, 1999; Snyder *et al.*, 1988; Gündüz, 2007).

2.7.6. Eleme (boyutlandırma) kromatografisi

Jel Geçirgenlik veya Jel Filtrasyon adı verilen boyutlandırma (eleme) kromatografisi özellikle yüksek mol kütleli maddelerin ayrılmasında kullanılan bir tekniktir. Boyutlandırma kromatografisinde dolgu maddeleri, çözünen madde ve çözücü moleküllerinin içine difüzlenebileceği düzgün bir gözenek ağı içeren küçük boyutlu partiküllerden oluşmuştur. Küçük boyutlu moleküller gözenekler içine girerken büyük moleküller gözenekler içerisine giremezler ve kolonu hızla terk ederler. Bu şekilde karışım içerisindeki maddeler molekül büyüklüğüne göre ayrılmış olurlar. Küçük moleküller porları dolduran hareketli faza difüze olurlar. Bunların ortalama hızları porlarda geçirdikleri zamana bağlıdır. Orta büyüklükteki moleküller ise sadece bazı porlara difüze olurlar, bu nedenle ortalama bir hızla hareket ederler. Dolgu maddesinin gözenek büyüklüğü ve numunede bulunan moleküllerin boyutu alıkonma süresini etkiler. Eleme kromatografisi genellikle polimerleri ayırmak için kullanılır. Alıkonma zamanı ile molekül ağırlığı arasında çizilen grafikten bir polimerin molekül ağırlık dağılımı bulunabilir (Skoog *et al.*, 1999; Snyder *et al.*, 1988; Gündüz, 2007).

2.7.7. Afinite kromatografisi

Afinite kromatografisi, enzim ve hormon gibi spesifik proteinlerin saflaştırılmasında kullanılan bir tekniktir. Bu teknikte kolon dolgu maddesine dekstran, poliakrilamid ve selüloz gibi spesifik bir protein ile kompleks yapabilen bir ligand bağlanmıştır. Kolon içerisinden spesifik protein geçerken ligand ile kompleks yaparak tutunur. Kompleks yapanlar kolonda kalırken kompleks yapmayan proteinler kolonu terk

ederler. Bağlı protein daha sonra pH 'ı değişen tuz çözeltileri veya ligand ilavesi ile kolondan ayrılırlar. (Skoog *et al.*, 1998; Gündüz, 2007).

2.8. Kromatografi Temel Parametreleri

2.8.1. Alıkonma zamanı ve kapasite faktörü

Numunenin enjeksiyonundan sonra dedektöre ulaşması için geçen zamana alıkonma zamanı denir (t_R). Alıkonma zamanı terimi yerine alıkonma hacmi de kullanılır. Bir maddenin alıkonma hacmi (V_R) bir bileşenin sabit fazdan elüe olması için gerekli olan hareketli faz hacmi olup alıkonma zamanı ve hacimsel akış hızından (F) hesaplanabilir.

$$V_R = t_R F \quad (2.3)$$

Alıkonma hacmi temel kromatografik parametre olan dağılım katsayısı K ile aşağıdaki eşitlik gereği doğrudan ilişkilidir.

$$V_R = V_m + K V_s \quad (2.4)$$

V_m : Kolondaki hareketli faz hacmi

V_s : Kolondaki sabit faz hacmidir.

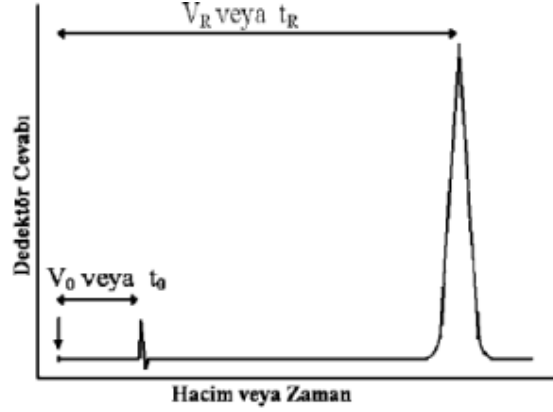
Dağılım katsayısı (K) ise; analitin sabit fazdaki molar derişiminin (C_S) hareketli fazdaki derişimine (C_M) oranıdır.

$$K = C_S / C_M \quad (2.5)$$

Bir maddenin alıkonma hacmi, ölü hacim (V_0) terimini içerecek biçimde de tanımlanabilir. Kapasite faktörü (k') olarak bilinen bu kavram Eş. 2.6 'de verilmiştir:

$$k' = (t_R - t_0) / t_0 \quad (2.6)$$

biçiminde yazılabilir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Kapasite faktörünün hesaplanması

Kapasite faktörü her maddenin kendine özgüdür ve uygun bir hareketli faz–sabit faz çifti seçildiğinde belirli bir karışımdaki her bir bileşen için farklı kapasite faktörü değerleri elde edilir. İyi bir ayırım için kapasite faktörünün 1–10 arasında olması istenir. Hesaplanan $k' < 1$ ise maddenin kolonda çok az tutunduğu, $k' > 10$ ise maddenin kolonda çok fazla tutunarak analiz süresini aşırı uzattığı düşünülür (Skoog *et al.*, 1999; Snyder *et al.*, 1988; Gündüz, 2007).

2.8.2. Seçicilik

İki maddeye ait kapasite faktörü oranı seçicilik (α) veya ayırım faktörü olarak adlandırılır ve aşağıdaki eşitlikle verilir.

$$\alpha = k'_2 / k'_1 = (t_{r2} - t_0) / (t_{r1} - t_0) \quad (2.7)$$

Bu eşitlikte, k'_1 kısa alıkonma zamanlı maddenin, k'_2 ise daha uzun alıkonma zamanlı maddenin kapasite faktörü olarak tanımlanmıştır. Seçicilik, esas olarak sabit faz

özelliklerine bağlıdır ancak hareketli faz bileşimi de seçiciliği etkiler. Deneysel çalışmada iki pikin seçiciliğinin 1'den büyük olması beklenir (Skoog *et al.*, 1999; Snyder *et al.*, 1988; Gündüz, 2007).

2.8.3. Kolon etkinliği

Kolon etkinliği, pik genişliği ile ilgilidir. Etkinliği yüksek olan kolonlar, dar pikler verirler ve bu kolonlarla maddeleri ayırmak daha kolaydır. Başarılı bir kromatografinin asıl amacı dar bir kromatografik bant dolayısıyla yüksek bir ayırıcılık elde etmektir. Kromatografik kolon etkinliğinin nicel bir ölçüsü olarak, birbiriyle ilgili iki terim kullanılmaktadır. Bunlar, teorik tabaka yüksekliği H ve teorik tabaka sayısı N'dir. Bu iki terim arasında Eş. 2.8'deki bağıntı vardır.

$$N = L / H \quad (2.8)$$

L: Kolon dolgu uzunluğu

Kromatografik kolonun etkinliği teorik tabaka sayısı arttıkça ve teorik tabaka yüksekliği azaldıkça artar. Kolon tipi ve boyutu, hareketli faz bileşimi ve akış hızına bağlı olarak kolon etkinliği değişmektedir.

Teorik tabaka sayısını elde edebilmek için aşağıdaki formül kullanılabilir:

$$N = 16 (t_R / w)^2 \quad (2.9)$$

t_R : Alıkonma zamanı

w: Pik zemin genişliği (Pik yüksekliğinin % 10'undaki genişliğidir).

Pik genişliğinin ölçülmesinde karşılaşılabilecek hatalardan kaçınmak için N değeri hesaplamada başka bir seçenek, $w_{1/2}$, yani yarı yükseklikteki pik genişliği değeri kullanılmaktadır.

$$N = 5.54 (t_R / w_{1/2})^2 \quad (2.10)$$

2.8.4. Rezolusyon

Kromatografik işlemlerde kolon etkinliği ve çözücü etkinliğinin ortak etkisi rezolusyon kavramıyla ifade edilir. Rezolusyon (R), genel olarak aşağıdaki eşitlikle verilmektedir:

$$R = 2 (t_{R2} - t_{R1}) / (w_1 + w_2) \quad (2.11)$$

Kromatografik analizler için iki pikin birbirinden tamamen ayrıldığı $R \geq 1,5$ değeri en uygun ayırıcılıktır.

Genel olarak seçicilik arttıkça ayırıcılığın da artması beklenir. Fakat belli bir seçicilik değerinden sonra toplam ayırıcılıkta gerçek bir iyileşme olmadan farklı alıkonma sürelerine sahip madde pikleri elde edilebilir. Kromatografik ayırımın başarı ile gerçekleşmesi için $\alpha > 1$ olmalıdır, $\alpha = 1$ olduğunda iki bileşik ayrılamaz. Seçicilik, hareketli ve sabit fazın bileşimi ile değişir. Birbirine yakın piklerde seçicilik 1'e yakındır.

2.8.5. Hareketli faz bileşiminin ayırma etkisi

Sıvı kromatografisinde iyi bir ayırım elde edebilmek için uygun bir çözücü çifti seçmek gerekmektedir. Çözücü veya çözücü karışımı ayrılan maddenin kapasite faktörünü değiştirmektedir. İki veya daha fazla sayıda madde aynı kapasite faktörü ile ayrılırsa hareketli fazın seçiciliği iyi değildir ve birbirinden farklı olacak şekilde çözücü veya çözücü oranları değiştirilmelidir. Hareketli faz çözeltilerine ayırım kalitesini arttırmak amacıyla ilave edilen maddelere düzenleyici denilmektedir. Ters faz sıvı kromatografisi hareketli fazları genellikle su ve organik çözücü karışımlarından oluşmaktadır. Organik düzenleyici olarak kısmen düşük polariteli metanol, asetonitril ve tetrahidrofuran gibi çözücüler kullanılır. Seçiciliğin iyileştirilmesi için kullanılacak çözücü sayısı sınırlı olmasına rağmen bazı koşullarda organik düzenleyici tipi değiştirilerek yeterli seçicilik elde edilebilir. Ters

faz tekniğinde düzenleyici olarak tamponlar da kullanılır. Hareketli fazın pH'sı dikkatlice ayarlanarak zayıf asit ve bazların seçiciliği optimize edilebilir. Bazik numunelerde piklerdeki kuyruklanmayı azaltmak amacıyla hareketli faza iyon çifti reaktifi trietilamin, sülfonik asit türevleri asit ilave edilerek ikincil mekanizmalar yardımıyla düzenleyici olarak kullanılabilirler (Skoog *et al.*, 1999; Snyder *et al.*, 1988; Gündüz, 2007).

2.9. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ayırma, teşhis ve tayin işlemlerinde en çok kullanılan bir kromatografi tekniğidir. Kromatografik ayırımın etkinliği, sabit fazdaki tanecik çapının ve kolon çapının küçültülmesi ile artmaktadır. Sabit fazın tanecik yapısının ve kolon boyutlarının küçülmesi ile üretilen kolonlar içerisinden sıvı fazın hareket etmesi için yüksek basınç uygulamak gerekmektedir. Bu tür kolonlarda yüksek basınç altında (100–400 atm) gerçekleştirilen kromatografi türüne yüksek basınçlı kromatografi denilmektedir. İlk zamanlar yüksek basınç sıvı kromatografisi denilmiştir. Günümüzde ayırmada ve kullanılan tekniklerde büyük ilerleme olduğundan dolayı yüksek performanslı sıvı kromatografisi olarak adlandırılmaktadır. Yüksek performans, yüksek hız ve yüksek ayırıcılığı ifade eder. Yöntemin bu kadar yaygın olmasının sebepleri; duyarlılığı, doğruluğu, nicel analizlere kolaylıkla uygulanabilir olması, uçucu olmayan türlerin veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen türlerin ayrılmasına uygun olması ve hepsinden de önemlisi sanayinin, birçok bilim dalının ve halkın ilgilendiği maddelere geniş bir şekilde uygulanabilir olmasıdır. Bu gibi maddelere örnek olarak; amino asitler, proteinler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbohidratlar, ilaçlar, metal–organik türler ve çeşitli inorganik bileşikler sayılabilir (Hamilton and Sewell, 1982; Meyer, 1988; Bidlingmeyer, 1992; Lindsay, 1992; Adamovics, 1997; Gündüz, 2007).

denir. Gradient elüsyon da hareketli faz sisteme verilmeye başladıktan sonra çözücü oranları belli bir programa göre, bazen sürekli olarak, bazen de bir seri basamaklar şeklinde değiştirilir (Snyder *et al.*, 1988; Gündüz, 2007).

2.10.2. Pompalar

Bir HPLC sisteminde pompanın görevi hareketli fazın kolon boyunca akışını sağlamaktır. Bir HPLC pompasında bulunması gerekli şartlar şunlardır:

- ✓ 400 atm 'e kadar basınç üretmeli,
- ✓ Puls içermeyen basınç çıkışı olmalı,
- ✓ 0,1–10 mL/dk aralığında akış hızı sağlayabilmeli,
- ✓ % 0,5 veya daha iyi bir tekrarlanabilirlikle akış kontrolü yapılabilmesi,
- ✓ Korozyona dayanıklı parçalardan üretilmiş olmalıdır.

Akışın sabit ve deneylerin tekrarlanabilir olması için hareketli fazın pompalanma hızı sabit olmalıdır (Snyder *et al.*, 1988; Gündüz, 2007).

2.10.3. Enjektörler

Numunenin sisteme verildiği bölme numune enjeksiyon kısmı diye adlandırılır. Analizlerinde, numunenin kolon dolgu maddesine gönderilmesinin tekrarlanabilirliği ölçümlerin kesinliğini belirleyen faktördür. Aşırı numune yüklemesi yapıldığında kolonlarda bant genişlemesi görülür. Bu da kesinliği etkiler. Bundan dolayı kullanılan numune hacminin çok küçük olması ve sistemin basıncını düşürmeden numunenin sisteme girişinin sağlanması gereklidir. HPLC enjektörleri ikiye ayrılır (Hamilton and Sewell, 1982; Snyder *et al.*, 1988; Gündüz, 2007).

1. Manuel enjektörler: Bu sistemlerde bir enjektör vasıtasıyla çalışanın sisteme numuneyi enjekte etme şeklidir. Bu tür sistemlerde tekrarlanabilirlik düşüktür. Çünkü kişi sürekli aynı hızda numuneyi sisteme yüklemesi gereklidir. Bu da kişinin anlık durumlarına göre zor olmaktadır.

2. *Otomatik enjektörler:* Bu sistemlerde ise numune ortama otomatik olarak verilmektedir. Programlanabilen otomatik enjeksiyon sistemleri ile numune “loop”unu doldurmak için hassas bir motor ile hareket ettirilen şırıngalar kullanılır. Enjektörle çekilen hacim kontrol edilerek istenilen miktarda numune sisteme enjekte edilir. Küçük miktarlardaki numune enjeksiyonları gerçekleştirilebilmekte ve numune kayıpları en düşük miktarda olmaktadır. İstenilen sayıda enjeksiyonu peş peşe yapmakta mümkündür.

2.10.4. Kolonlar

Sabit fazın içine doldurulduğu 2–5 mm iç çaplı, 5–30 cm boylarında paslanmaz çelikten yapılmış borular HPLC kolonu olarak adlanmaktadır. Sabit faz tanecik çapları ise 3–10 µm arasında değişmektedir. Film dolgular ve gözenekli dolgular olmak üzere kolon dolgu maddeleri ikiye ayrılmaktadır. Film dolgular, gözenekli olmayan cam veya polimer tanelerinden oluşur. Yüzeylerine de gözenekli yapıda silika, alümina veya iyon değiştirici reçineden oluşan ince bir gözenekli film kaplanmaktadır. Gözenekli dolgulu kolonlar ise silika, alümina ve iyon değiştirici reçineden üretilirler. En çok kullanılan dolgu maddesi de silikadır. Dağılma prensibine göre ayırımlarda kullanılan kolonların üretiminde ise silika yüzeyine kimyasal veya fiziksel olarak ince organik bir film kaplanır. En çok kullanılan, klorodimetilsilanların yüzey silanol grupları ile reaksiyonudur. Ters faz sıvı kromatografisi için kullanılan çeşitli alkil ve substitüe alkil silikalarda bu yolla elde edilir.

Guard (Ön) Kolon: Analitik kolonun kullanım ömrünü arttırmak amacıyla, analitik kolondan önce genellikle kısa bir kolon yerleştirilir. Bu kolonlara Guard (ön) kolon denilmektedir. Bu kolonları kullanmanın amacı çözücü içerisindeki partikül haldeki maddeleri ve yabancı maddeleri tutmak, ayrıca numune içinde bulunan ve sabit faza tersinmez olarak bağlanabilecek bileşenleri de tutarak ortamdan uzaklaştırmaktır. Bu ön kolonlar ek olarak hareketli fazı sabit fazla doyurarak analitik kolonda hareketli fazın sabit fazı sürüklemesini en aza indirmektir.

Sıvı kromatografisinde kolon sıcaklığının kontrolü de önemli konular arasındadır. Özellikle ters faz ve iyon değiştirme kromatografisinde sıcaklığın alıkonma zamanına ve tekrarlanabilirliğe etkisi mevcuttur. Birçok HPLC cihazında kolon sıcaklığını oda sıcaklığından 60 °C 'ye kadar değişen sıcaklıklarda kontrol etmek için kolon fırını mevcuttur (Horvath *et al.*, 1977; Snyder *et al.*, 1988; Gündüz, 2007).

2.10.5. Dedektörler

HPLC sisteminin en önemli parçalarından birisi dedektörlerdir. Dedektörler iki grup altında toplanırlar (Horvath *et al.*, 1977; Krstulovic and Brown, 1982; Snyder *et al.*, 1988; Gündüz, 2007):

a. Maddeye Yönelik Dedektörler: Hareketli faz içindeki maddenin özelliklerine göre cevap veren dedektörlerdir. Bunlar aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- ✓ Ultraviöle (UV) dedektörler
- ✓ Floresans dedektörler
- ✓ Elektrokimyasal dedektörler
- ✓ Kütle spektrometresi

b. Çözeltiye Yönelik Dedektörler: Çözeltinin içindeki maddeye değil, maddenin çözeltisine özgü dedektörlerdir ve aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir:

- ✓ Refraktif indeks dedektörleri
- ✓ Dielektrik sabiti dedektörleri
- ✓ Kondüktivite dedektörleri
- ✓ Yoğunluk dedektörleri

Bir numunedeki maddelerin kimyasal özelliklerine ve analiz gereksinimlerine göre dedektör seçimi yapılır. Numunede UV ve Görünür Bölge ışınlarını absorplayacak kromofor grupları mevcut ise analizde UV dedektör tercih edilir. Eğer madde floresans özellik gösteriyorsa çalışmada floresans dedektör kullanılır. HPLC çalışmalarında, yüksek duyarlılığı, geniş bir doğrusal aralığa sahip olması, sıcaklık

dalgalanmalarından çok az etkilenmesi ve ucuz olmasından dolayı UV dedektörler daha çok kullanılmaktadır. Bu dedektörler, maddenin ultraviyole veya görünür bölge ışığı absorpsiyonu temeline dayanmakta ve ayrıca bir veya daha fazla dalga boyunda ölçüm yapabilme imkânına sahiptir (Horvath *et al.*, 1977; Krstulovic and Brown, 1982; Snyder *et al.*, 1988; Gündüz, 2007).

2.10.6. Kaydedici

HPLC sisteminde, hareketli faz akış hızını, enjeksiyonu, kolon fırını, örnek alma sistemini, dedektörü ve veri kaydını software ile kontrol edilen kısma kaydediciler denir. Kaydediciler de mikro işlemciler ve bilgisayarlar kullanılmakta ve bunların kullanılması kromatografik sistemde tekrarlanabilirliği arttırmakta, sistem validasyon parametrelerinde daha doğru değerler elde edilmesine olanak sağlamaktadır (Snyder *et al.*, 1988; Yıldız vd., 1997; Gündüz, 2007).

2.11. Analitik Yöntem Validasyonu (Geçerlilik Testleri)

Bir analiz işleminde ilk önce çalışma ile ilgili olarak iyi bir literatür taraması yapmak gerekir. Literatür taraması sonrasında elde edilen bilgiler ışığında çalışmada kullanılacak yöntem geliştirme işlemleri yapılır. Yeni veya ileri bir yöntemin geliştirilmesinde genellikle uygulanan yaklaşım; ekipmana, çalışacak analite, hedeflere ve yöntemin gerekliliklerine göre uyarlanır. Spektroskopik çalışmalarda çözücü ortamı, maddenin maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu ve slit aralığı gibi parametreler yönünde optimize edilir. HPLC çalışmasında ise kolon, hareketli faz, dedektör, enjeksiyon hacmi ve hareketli faz akış hızı gibi parametreler yönünde en iyi ayrımı elde edecek şekilde optimize edilir. Analitik yöntem geliştirilirken; analitin sentez yöntemi, saflaştırma yöntemi, çeşitli pH değerlerindeki davranışı, ekstraksiyon çözeltileri ile geçimsizliği, stabilitesi, fonksiyonel grupların reaksiyonları, çözünürlüğü, molekül ağırlığı ve yapısı, spektrumu, benzer yapıda ve özelliklerdeki diğer maddeler, safsızlıkları, parçalanma ürünleri, metabolitleri,

depolama şartları gibi kimyasal ve fiziksel özelliklerinin ve farmakokinetiğinin iyi bilinmesi gerekir (Shawartz and Krull, 1997; Sonawane *et al.*, 2014).

Literatürden elde edilen bilgiler ışığında benzer çalışma parametrelerini kullanmak istediğimizde her zaman beklenen sonuçlar elde edilemeyebilir. Beklenmeyen sonuçların, kullanılan cihazlar, malzemeler ve kişiler gibi değişik sebepleri olabilir. Analitik bir çalışmanın amacı; doğruluğu ve kesinliği yüksek ayrıca daha duyarlı, hassas, kesin, tekrarlanabilirliği yüksek, ekonomik ve kısa süren, uygulanabilirliği kolay ve sorunsuz yeni yöntem geliştirmektir (Shawartz and Krull, 1997).

2.11.1. Tanımlar

Yöntem geliştirme ve validasyon çalışmaları için uluslararası yayınlanan kılavuzlara göre aşağıda verilen tanımlar yapılmaktadır (Riley and Rosanske, 1996; Shawartz and Krull, 1997; Anonymous, 1997; Sonawane *et al.*, 2014).

Analit: Bir numune ortamında yani bir biyolojik matrikte analizi yapılan maddedir.

Analiz Serisi: Çalışma esnasında yöntem geliştirme, validasyon işlemleri ve gerçek numunelerin analizi sıralamasına göre yapılan işlemlerin tümüne denir. İşlem serileri birkaç günde tamamlanır.

Biyolojik Matriks: Kan, idrar, serum, plazma ve dokular gibi insan veya hayvanlardan elde edilen numuneler biyolojik materyaller olarak adlandırılır.

İç Standart: Analiz işlemlerinde analitin tespitini kolaylaştırmak ve analiz esnasında meydana gelen hataları daha aza indirmek için numune ortamında olmayan analitin yapısına benzeyen dışardan numune ortamına eklenen test bileşikleridir (yapısı benzer analoglar, işaretli stabil bileşikler).

Kalibrasyon Standardı: Analitik çalışmalarda bilinmeyen numune ortamındaki analitin miktar tayini için saflık derecesi tam olarak bilinen ve uluslararası kabullere göre üretilmiş standart maddelerden elde edilen çalışma çözeltileridir.

Kalibrasyon Eğrisi: Derişimi kesin belli olarak hazırlanmış standart çalışma çözeltilerinin derişimine karşılık deneysel cevap değerlerinden elde edilen grafiklere kalibrasyon eğrisi denilmektedir.

Kalite Kontrol Numunesi: Biyoanalitik yöntemin performansını değerlendirmek ve yöntem validasyon çalışmalarını yapmak için kullanılan standart çözeltilere denir.

Kör: Biyolojik matriksin analitler eklenmemiş numunesidir, biyoanalitik yöntemin özgünlüğünü belirlemek için kullanılır.

Yöntem: Numune analizinde kullanılan tüm işlemlerin detaylı anlatımıdır.

Numune: Analiz esnasında kullanılan madde ortamına denilir.

Sistem Uygunluğu: Analize başlamadan önce referans standardın analiziyle enstrümental performansın tespiti için yapılan işlemler (alikonma zamanı, kuyruklanma faktörü) sistem uygunluk testleri olarak adlandırılır.

2.11.2. Validasyon (yöntem geçerlilik) parametreleri

Bir numune ortamında bir analitin veya analit serisinin miktar tayini için geliştirilen yöntemin performans ve güvenilirliğini göstermek için yapılan işlemlerin tümüne validasyon denilir. İlaç çalışmalarında uygulanacak yöntemin mutlaka validasyonunun yapılması gereklidir (Shawartz and Krull, 1997; Anonymous, 1997; Shah and Midha, 2000; Sonawane *et al.*, 2014).

Yöntem validasyonu analitik yöntem gelişimi ve dökümantasyonu içerir. Biyolojik matrikste ölçülecek her analit için yöntem validasyonu yapılmalıdır. Yöntem validasyon parametreleri doğruluk, kesinlik, tekrarlanabilirlik, seçicilik, doğrusallık, stabilite, kararlılık, geri kazanım, gözlenebilme sınırı (LOD), miktar tayin sınırı (LOQ), tutarlılık ve çalışma aralığı olarak sıralanabilir (Haelfinger, 1981; Riley and Rosanske, 1996; Shawartz and Krull, 1997; Anonymous, 1997; Shah and Midha, 2000; Sonawane *et al.*, 2014).

2.11.2.1. Seçicilik

Safsızlıklar ve bozunma ürünleri gibi girişim yapabilecek maddelerin bulunduğu ortamda analizi yapılacak analitin geliştirilen yöntemle tam olarak analiz edilebilmesi işleme seçicilik denir. Yöntem geliştirme çalışmalarında ilk yapılması gereken parametredir (Shah and Midha, 2000; Sonawane *et al.*, 2014).

2.11.2.2. Doğruluk

Doğruluk, analitik yöntem sonucunda elde edilen verilerin gerçek değere yakınlığı ile tanımlanır. Doğruluk çalışmalarında, derişimi kesin belli olan kalite kontrol çözeltileri hazırlanır ve yöntem ile en az altı kez analizleri yapılır. Bu analiz sonuçlarının ortalaması ve standart sapmalarından mutlak hata belirlenir. Ortalama değer gerçek değerinin \pm % 15 sınırı içinde olmalıdır. Ölçülebilen en düşük limit için %20 'den fazla sapma göstermemelidir. Ortalama değer gerçek değerden sapma oranı doğruluk ölçütüdür (Riley and Rosanske, 1996; Shah and Midha, 2000; Sonawane *et al.*, 2014).

2.11.2.3. Kesinlik

Aynı şartlar altında, aynı homojenlikte hazırlanmış olan kalite kontrol çözeltilerinin mevcut yöntem ile altı kez analizlerinin yapılması sonucunda elde edilen değerlerin yakınlığı yöntemin kesinliğini verir. Kesinlik; standart sapma (SS), bağıl standart sapma (BSS), varyans veya varyans katsayısı ile verilmektedir. Kesinlik üç kısma ayrılır. Bunlar (Riley and Rosanske, 1996; Shah and Midha, 2000; Sonawane *et al.*, 2014) :

a. Tekrarlanabilirlik : Aynı çalışma şartlarında kısa bir zaman aralığında tekrarlanan analiz sonuçlarının birbirine yakınlığıdır. Güniçi ve günler arası kesinlik olarak da adlandırılır.

b. Ara kesinlik : Değişik gün, operatör ve cihazda yapılan deney sonuçlarının kesinliğini göstermektedir. Günler arası kesinlik, gün değişkenliği kullanılarak yapılan ara kesinlik çalışmasıdır ve aynı çalışma şartlarında numunelerin farklı günler (en az üç gün) içerisinde tekrarlayan analiz (en az n=6) sonuçlarının birbirlerine olan yakınlık ölçüsü olarak tanımlanır.

c. Yenilenebilirlik : Laboratuvarlar arasındaki kesinliği ifade eder.

2.11.2.4. Doğrusallık

En düşük derişimden en yüksek derişime doğru bir seri çözelti hazırlanarak yöntemin doğrusal olduğu aralığın belirlenmesi işlemine doğrusallık denir. Bu aralık belirlendikten sonra çözeltinin derişimine karşı elde edilen yöntem cevaplarının grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi türetilir. Ağırlıklı ve ağırlıksız en küçük kareler yöntemi uygulanarak kalibrasyon eğrisinin regresyon analizi yapılarak standart eğrinin doğru denklemi ve korelasyon katsayısı elde edilir. Kalibrasyon doğrusunun eğimi, doğrusallığın matematiksel bir ölçüsüdür (Riley and Rosanske, 1996; Shah and Midha, 2000; Sonawane *et al.*, 2014).

2.11.2.5. Çalışma aralığı

Yöntemin istenilen doğruluk ve kesinlik sınırları içerisinde doğrusal olduğu derişim aralığıdır. Bu doğrusallık çalışmaları ile yöntemin çalışma sınırları belirlenmiş olur. Bu çalışma sınırları yöntemlerin kullanılış özelliklerine göre değişmektedir. İlaç analizlerinde, etkin madde veya bitmiş ürün yöntem validasyonunda % 80 – % 120 derişim aralığı olarak kabul edilir. Etkin madde ve safsızlık tayini tek bir yöntem ile yalnızca % 100 standart kullanılarak yapılıyor ise derişim aralığı safsızlığın tayin edilebildiği en küçük değer ile % 120 derişim arası olarak kabul edilir (Riley and Rosanske, 1996; Shah and Midha, 2000; Sonawane *et al.*, 2014).

2.11.2.6. Gözlenebilme sınırı (LOD)

Analitik yöntemin çözelti ortamında maddenin bulunduğunu gösteren yani cihazın cevap verdiği en küçük analit derişimine gözlenebilme sınırı denir. Bu derişimde istenilen doğruluk ve kesinlikte analiz etmek zordur. Yöntem özelliklerine bağı olarak değışik şekillerde gözlenebilme sınırı belirlenmektedir. Kromatografik ölçümlerde sinyal/gürültü oranının 3 olduğu değıer LOD değıeri olarak tespit edilir. Spektroskopik çalışmalarda kalibrasyon eğrisinin en küçük değıerinden daha düşük derişimlerde bir seri çözelti hazırlanır ve yöntem ile en az üç kez analizleri gerçekleştirilir. Elde edilen verilerin Bağıl Standart Sapma değıerleri tespit edilir ve % BSS değıeri % 20 'den küçük olan değıer gözlenebilme standardı olarak belirlenir. Ayrıca, kalibrasyon eğrisinin cevabın standart sapmasının (SD), kalibrasyon eğrisinin (S) oranının 3,3 katı LOD değıeridir (Riley and Rosanske, 1996; Shah and Midha, 2000; Sonawane *et al.*, 2014).

2.11.2.7. Miktar tayini sınırı (LOQ)

Uygun doğruluk ve kesinlik sınırları içerisinde kantitatif olarak tespit edilebilen numunedeki en düşük analit miktarı Miktar Tayini Sınırı (LOQ) değıeri olarak tanımlanır. LOQ değıeri de uygulanan yöntemlere göre değışik şekillerde belirlenir. Kromatografik analizlerde Sinyal/Gürültü oranı 10 olduğu değıer LOQ değıeridir. Spektroskopik analizlerde alınan cevabın standart sapmasının (SD), kalibrasyon eğrisinin eğimine (S) oranının 10 katı LOQ değıeridir. Ayrıca analitin cevap faktörü tekrarlanabilir, % 20 kesinlik ve % 80–120 doğruluk limitleri ile uygun olmalıdır (Riley and Rosanske, 1996; Shah and Midha, 2000; Sonawane *et al.*, 2014).

2.11.2.8. Tutarlılık

Farklı deney koşullarında, farklı alet, farklı analizci, farklı laboratuvar, farklı koşullarda hazırlanan reaktiflerle ve farklı günlerde aynı yöntemle analiz sonucunda elde edilen bulguların birbiriyle uygunluk derecesi tutarlık değerlerini verir. Analiz sonuçları birbiriyle uyumlu ise analitik yöntemin uygulanabilirliğini ve tekrarlanabilirliğini de gösterir (Riley and Rosanske, 1996; Shah and Midha, 2000; Sonawane *et al.*, 2014).

2.11.2.9. Stabilité

Stabilite, belirli bir matriks içindeki bir analitin çalışma süresi boyunca saklama koşullarında çevresel faktörlerin etkisinde bozulmadan kalma süresi olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca saf analitin ve çözeltisinin de normal laboratuvar şartlarında nem, sıcaklık, ışık ve hava gibi etkilere maruz bırakıldığında ne kadar sürede bozunmadan kaldığının incelenme testlerini de içermektedir (Riley and Rosanske, 1996; Shah and Midha, 2000; Sonawane *et al.*, 2014).

2.11.2.10. Sağlamlık

Çalışmada kullanılan prosedüre bağlı olarak sağlamlık değerlendirilmesi daha çok yöntem geliştirme safhasında göz önünde bulundurulur. Yöntem parametrelerinde yapılan küçük değişimlerle analizin güvenilirliği belirlenmiş olur. Bu değişimlere yöntem duyarlı ise analitik şartlar uygun şekilde kontrol edilmelidir. Sağlamlığın değerlendirilmesinin tek amacı sistem uygunluk parametrelerinin incelenerek analitik yöntem her uygulandığında valide olduğunun ispatlanmasıdır. HPLC çalışmalarında mobil faz bileşimi, pH, farklı kolonlar, ısı ve akış hızı gibi parametrelerde küçük değişiklikler yapılarak sağlamlık çalışması yapılır (Riley and Rosanske, 1996; Shah and Midha, 2000; Sonawane *et al.*, 2014).

2.11.2.11. Geri kazanım

Biyolojik ortamlarda yapılan çalışmalarda, biyolojik ortamdan ekstrakte edilen analitin analiz sonucunda elde edilen değerin gerçek değere oranı olarak ifade edilir. Farmasötik preparatlar gibi ortamlarda yapılan çalışmalarda standart ekleme yöntemi kullanılarak analitik geri kazanım değerleri belirlenir. Bu yöntemde ilk önce numune ortamında analit analizleri yapılır. Sonra bu ortama kalibrasyon eğrisinin içerisine düşen düşük, orta ve yüksek derişimlerde hazırlanan kalite kontrol çözeltileri numune çözeltilisine ilave edilir ve analizleri gerçekleştirilir. Daha sonra { % Geri Kazanım: [(Toplam Çözeltiden Bulunan Değer – Numune Çözeltilisinden Bulunan Değer) / Kalite Kontrol Çözeltilisinden Bulunan Değer] x 100 } formülü kullanılarak % analitik geri kazanım değeri elde edilir (Riley and Rosanske, 1996; Shah and Midha, 2000; Sonawane *et al.*, 2014).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

Çalışmada aşağıda özellikleri de verilmiş kimyasal maddeler kullanıldı.

✓ Mirtazapin	Novagenix Bio–Analitik İlaç AR-GE Merkezi (Ankara)
✓ Hidroklorik asit	Sigma Aldrich (Almanya)
✓ Metanol	Sigma Aldrich (Almanya)
✓ Etanol	Sigma Aldrich (Almanya)
✓ Asetonitril	Sigma Aldrich (Almanya)
✓ Bütanol	Sigma Aldrich (Almanya)
✓ Minelza, 30 mg	Bilim İlaç
✓ Mirtaron, 30 mg	Zentiva İlaç
✓ Deiyonize su	

Bu kimyasal maddelerin yanı sıra otomatik pipetler (10–100 µL, 100–1000 µL ve 1000–5000 µL), kuvarz küvet, oto örnekleyici vial kitleri, beher, erlen, mezür, deney tüpü, balon joje gibi malzemeler de kullanıldı.

3.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışmamızda kullanılan cihazlar liste halinde aşağıda verildi:

• Etüv	Memmert
• Ultrasonik banyo	Elma LC 30
• Hassas Terazî	Metler Toledo
• Karıştırıcı, Vorteks	IKA

- pH Metre Metter Toledo – Seven Compact
- UV–Görünür Bölge Spektrofotometre Thermo-Spectronic

- HPLC Sistemi:
 - ✓ FD–Dedektör Agilent
 - ✓ Degazer Agilent Technologies
 - ✓ Pompa Agilent Technologies
 - ✓ Kolon ACE 5 C18 150 x 4,6 mm (USA)
 - ✓ Oto Örnekleyici Agilent Technologies
 - ✓ Oto Örnekleyici Vial Kiti Agilent; 1,8 mL Screw cap

Yukarıda verilen malzemelerin tümü Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Laboratuvarından temin edildi ve deneyler bu laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Spektrofotometri yöntem şartları

3.3.1.1. UV–Görünür bölge spektrofotometrisi

Mirtazapin analizi için uygulanan UV–Görünür Bölge Spektrofotometri yöntem şartları Tablo 3.1 'de verildi.

Tablo 3. 1. UV–Görünür Bölge Spektrofotometri yöntem şartları

Yöntem Şartları	Mirtazapin
Veri modu	Absorbans
Start Lamba (nm)	250,0
Stop Lamba (nm)	370,0
Lamba Değişimi (nm)	325,0
Maksimum Absorbans Verdiği Dalga Boyu (nm)	319,0
Bant Genişliği (nm)	2,0
Scan Hızı (nm/dk)	600
Veri Aralığı	Normal

3.3.1.2. Türev spektrofotometri yöntem şartları

1. Türev (1D-) Spektrofotometri yöntem şartları Tablo 3.2 'de verildi.

Tablo 3. 2. 1. Türev Spektrofotometri yöntem şartları

Yöntem Şartları	Mirtazapin
Veri Modu	1. Türev (1D-)
Start Lamba (nm)	250,0
Stop Lamba (nm)	370,0
Lamba Değişimi (nm)	325,0
Scan Hızı (nm/dk)	600
Bant Genişliği (nm)	2,0
Türetim aralığı ($\Delta\lambda$)	21,0

3.3.2. Kromatografik yöntem şartları

HPLC–FD çalışmasında mirtazapin analizinde uygulanan kromatografik yöntem şartları Tablo 3.3 'de verildi.

Tablo 3. 3. Mirtazapin için HPLC-FD yöntem şartları

Yöntem Şartları	Mirtazapin
Kolon	C ₁₈ kolon (150 x 4,6 mm, 5 µm)
Dedektör	Floresans Dedektör
Hareketli Faz	Metanol-Su-ACN (5:60:35, h/h/h)
Akış hızı (mL/dk)	1,0
Dalga boyu (nm)	290 (uyarma) ve 370 (emisyon)
Elüsyon	İzokratik
Kolon sıcaklığı (°C)	Değişken
Mirtazapinin Alıkonma zamanı (dk)	2,64
Enjeksiyon hacmi (µL)	10
İç Standart	Sitalopram
İç Standardın Alıkonma Zamanı (dk)	5,80

3.3.3. Tablet çözeltilerinin hazırlanması

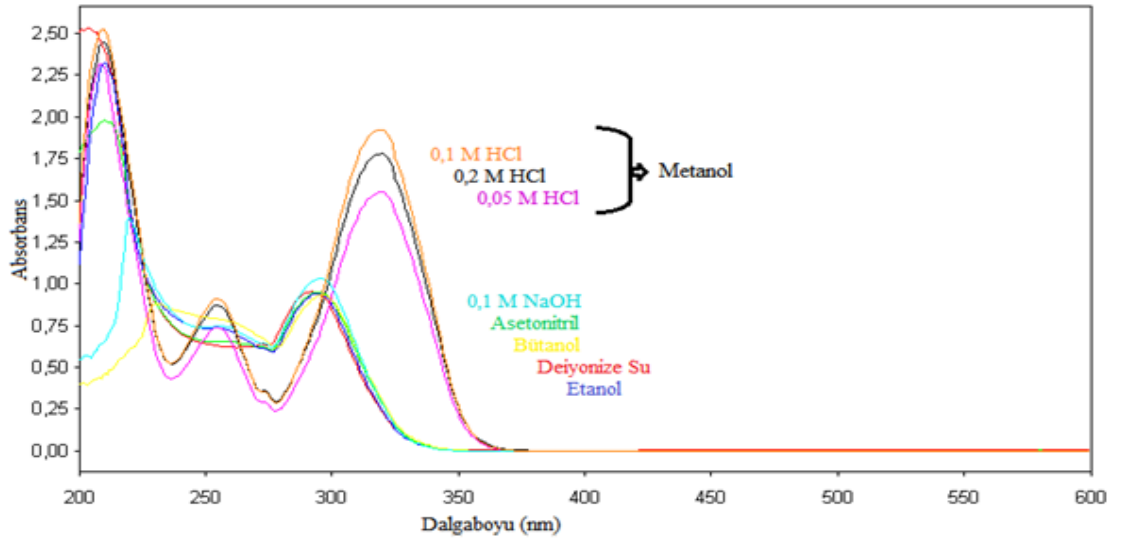
Mirtazapin etkin maddesini içeren iki farklı farmasötik preparat (Mirtaron ve Minelza tablet) Eczaneden temin edildi. Herbir ilaçtan beş tablet alınıp tartılarak ortalama tek bir tablet kütlesi belirlendi. Beş tablet havanda öğütülerek iyice toz haline getirildi, iyice karıştırılarak homojenize edildi. Bu homojen karışımdan örnekleme yöntemine göre ortalama bir tabletin kütlesinde tartılıp alınarak balon jöjeye konuldu, metanol eklendi, 15 dk boyunca sonike edildi ve iyice çözülmesi sağlandı. Hacmi 100 mL 'ye tamamlanarak tablet stok çözeltisi hazırlandı. Elde edilen çözelti süzöldü ve 0,1 M HCl/metanol ile seyreltilerek istenilen derişimdeki tablet çözeltileri elde edildi.

4. BULGULAR

4.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri ve 1. Türev Spektrofotometri Yöntemi

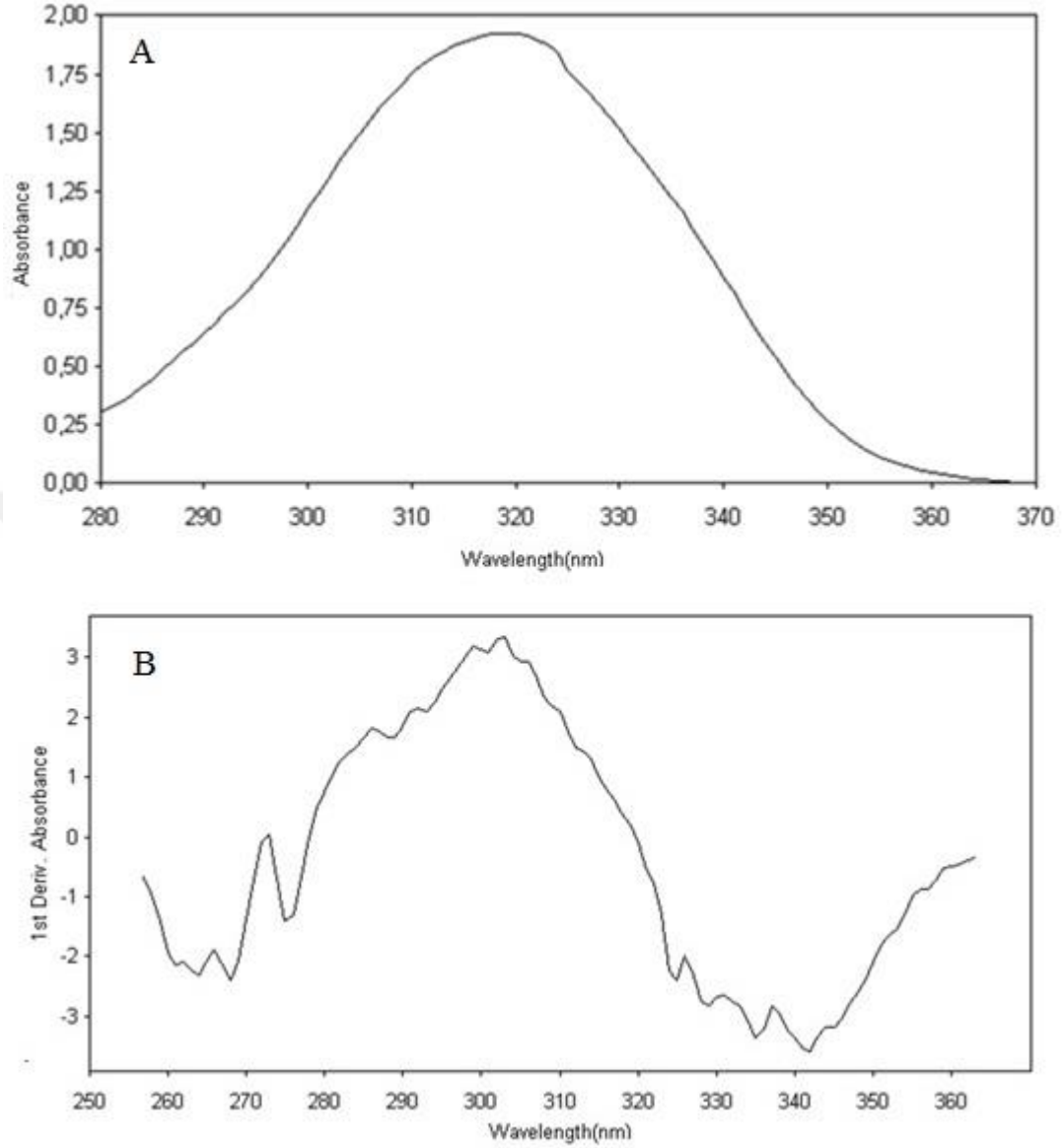
4.1.1. Standart çözeltilerin hazırlanması

Standart çözelti hazırlamak için ilk önce UV-Görünür Bölge Spektrofotometri ve 1. Türev Spektrofotometri Yöntemlerinde maksimum absorbansı elde edebilmek için farklı çözücü serileri kullanıldı. Etkin madde metanol, asetonitril, bütanol, deiyonize su ve etanol de çözümlenerek spektrumları alındı. En yüksek absorbans değerine sahip çözücünün metanol olduğu görüldü. Metanol çözücü ortamının pH belirlenmesinde değişik derişimlerde HCl ve NaOH kullanıldı. En yüksek hassasiyetin 0,1 M HCl ile elde edildiği görüldü. Deney sonuçlarını gösteren spektrumlar Şekil 4.1 'de verildi.



Şekil 4.1. Farklı çözücü ortamında hazırlanmış mirtazapin çözeltilerine (50 µg/mL) ait spektrumlar

Çözücü ortamı belirlendikten sonra 50 mg mirtazapin tartıldıktan sonra 50 mL 0,1 M HCl/Metanol 'de çözülerek 1 mg/mL 'lik stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 1, 5, 10, 15, 30 ve 50 µg/mL derişimlerinde standart çalışma çözeltileri ve 2, 20 ve 45 µg/mL derişimlerde kalite kontrol çözeltileri hazırlandı. Standart çalışma çözeltilerinin UV-Görünür Bölge Spektrofotometrede 319 nm dalga boyunda absorbansları alındı. Daha sonra bu çözeltilerin 1. Türev Spektrumları alındı. 50 µg/mL derişimdeki mirtazapin çözeltilerinin UV-Görünür Bölge ve 1. Türev spektrumları Şekil 4.2 'de verildi. 1. Türev spektrumlarında 302,5 nm dalga boyunda bir maksimum ve 265, 277 ve 342 nm dalga boylarında üç minimum pik elde edildi. 1. Türev çalışmasında 302,5 nm dalga boyunda absorbans değerleri kullanıldı.



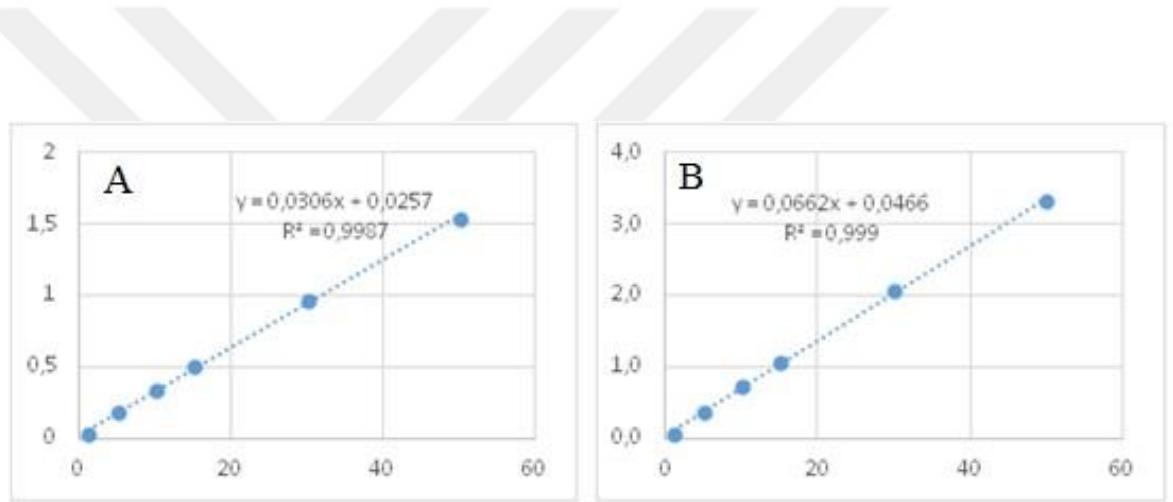
Şekil 4.2. 50 µg/mL derişimdeki mirtazapin çözeltisinin A- UV-Görünür Bölge Spektrumu ve B- 1. Türev Spektrumu

4.1.2. Validasyon (yöntem geçerlilik testleri)

UV-Görünür Bölge Spektrofotometri ve 1. Türev Spektrofotometri yöntemleri geliştirildikten sonra ICH (International Conference on Harmonisation) kılavuzlarına göre valide edildi.

4.1.2.1. Doğrusal aralık ve kalibrasyon eğrisi

1–50 µg/mL derişim aralığında (1, 5, 10, 15, 30 ve 50 µg/mL) hazırlanan mirtazapın standart çalışma çözeltilerinin UV–Görünür Bölge ve 1. Türev spektrumları alındı. UV–Görünür Bölge Spektrofotometri yöntemi için 319 nm dalga boyunda ve 1. Türev Spektrofotometri yöntemi için 302,5 nm dalga boyunda absorbansları okundu. Mirtazapın standart çalışma çözeltilerinin derişimlerine karşı okunan absorbans değerleri grafiğe geçirilerek her iki yöntem için kalibrasyon eğrileri elde edildi ve Şekil 4.3 'de verildi.



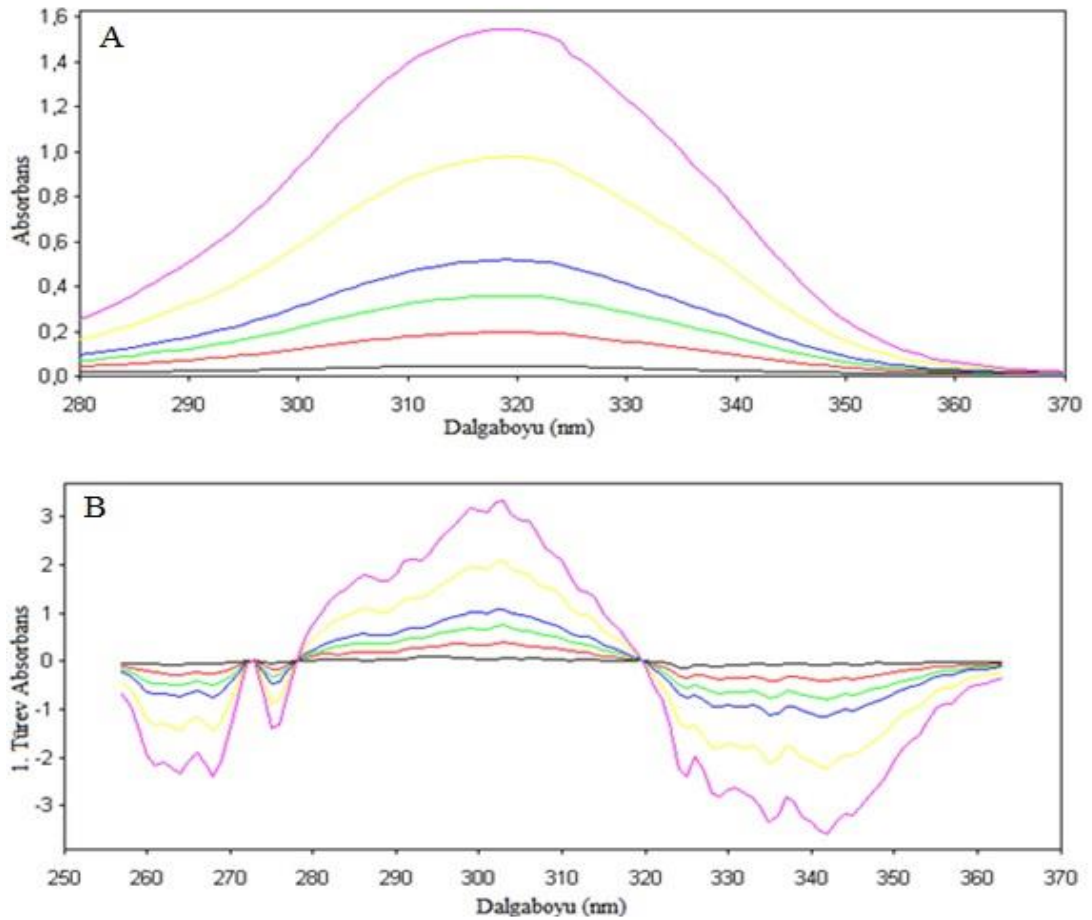
Şekil 4.3. A- UV–Görünür Bölge Spektrofotometri ($\lambda=319$ nm) ve B- 1. Türev Spektrofotometri ($\lambda=302,5$) yöntemlerinin kalibrasyon eğrileri

UV–Görünür Bölge ve 1. Türev Spektrofotometrik yöntemlerle elde edilen kalibrasyon eğrilerinin regrasyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları ve kalibrasyon eğrilerine ait spektrumlar sırasıyla Tablo 4.1 ve Şekil 4.4 'de verildi.

Tablo 4. 1. Mirtazapin standart çalışma çözeltilerinin UV–Görünür Bölge Spektrofotometri ve 1. Türev Spektrofotometri yöntemlerine ait kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri

Yöntem	Dalgaboyu (nm)	ÇA (µg/mL)	LR ^a	Sa	Sb	R
UV- Görünür Bölge	319	1-50	$A = 0,0306x + 0,0257$	0,0125	0,0021	0,9987
1. Türev	302,5	1-50	${}^1D = 0,0662x + 0,0466$	0,0168	0,0009	0,999

ÇA: çalışma aralığı, a:6 kalibrasyon eğrisi, LR: lineer regresyon, Sa: regresyon eğrisindeki kaymanın standart sapması Sb: regresyon eğrisindeki eğimin standart sapması, R: korelasyon katsayısı



Şekil 4.4. Mirtazapin standart çalışma çözeltilerinin (1, 5, 10, 15, 30 ve 50 µg/mL) A- UV–Görünür Bölge ve B- 1. Türev spektrumları

4.1.2.2. Gözlenebilme sınırı (LOD) ve miktar tayin alt sınırı (LOQ)

Her iki yöntem için kalibrasyon eğrisinin en düşük derişiminden daha düşük derişimlerde mirtazapın çözeltileri hazırlandı ve spektrumları alınarak altı kez ölçümleri gerçekleştirildi. Okunan değerlerin bağıl standart sapmaları (% BSS) belirlendi. Bağıl standart sapma değeri % 20 'den küçük olan derişim gözlenebilme sınırı (LOD) ve % 10 'dan küçük olan derişim de miktar tayin sınırı (LOQ) değeri olarak belirlendi. Her iki yöntem için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,1 µg/mL ve 0,5 µg/mL olarak tespit edildi.

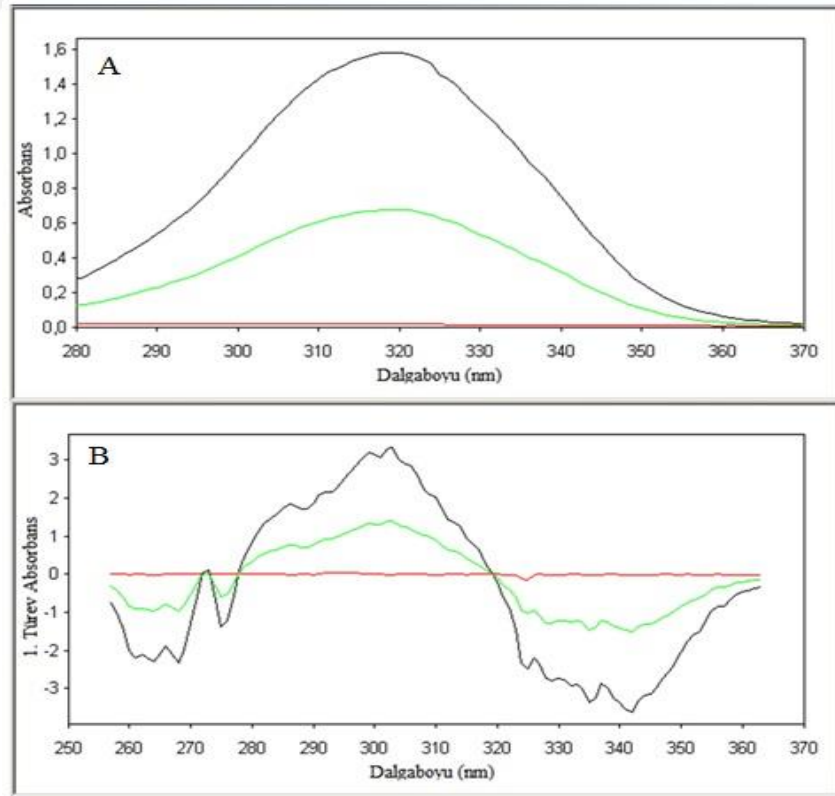
4.1.2.3. Doğruluk ve kesinlik

Yöntemin doğruluğu, kesinliği günüçi ve günler arası değişkenlerle belirlendi. Kalibrasyon eğrisi içine düşen üç farklı derişimde kalite kontrol (2, 20 ve 45 µg/mL) çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin günüçi (aynı yöntem ve aynı labaratuvar şartlarında 1 günde 6 kez) ve günler arası (aynı yöntemle 6 farklı günde 6 kez) absorbans değerleri okundu. Elde edilen deney sonuçlarının ortalaması, standart sapması, bağıl standart sapması ve bağıl hatası belirlendi. Kesinlik bağıl standart sapmayla [%BSS = (SS/Ortalama Değer) x 100] ve doğrulukta bağıl hatayla [%BH= (bulunan–eklenen/eklenen) x100] verildi (Tablo 4.2).

Tablo 4. 2. UV-Görünür Bölge ve 1. Türev Spektrofotometri yöntemlerinin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)

Yöntem	Eklenen (µg/mL)	Günüçi			Günler Arası		
		Bulunan ¹ ±SS (µg/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS	Bulunan±SS (µg/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS
UV-Görünür Bölge	2	2,04 ± 0,12	2,00	5,88	1,97 ± 0,07	-1,50	3,55
	20	20,31 ± 1,17	1,55	5,76	20,89 ± 0,39	4,45	1,87
	45	44,77 ± 1,33	-0,51	2,97	44,76 ± 0,20	-0,53	0,45
1. Türev	2	2,11 ± 0,04	5,50	1,90	1,94 ± 0,04	-3,00	2,06
	20	20,14 ± 0,24	0,70	1,19	20,48 ± 0,10	2,40	0,49
	45	45,77 ± 0,60	1,71	1,31	46,62 ± 0,39	3,60	0,84

SS: standart sapma, %BH= bağıl hata, % BSS: bağıl standart sapma,¹ altı kez analiz sonucunun ortalaması (n=6)



Şekil 4.5. Mirtazapin kalite kontrol çözeltilerinin (2, 20 ve 45 µg/mL) A- UV-Görünür Bölge ve B- 1. Türev spektrumları

4.1.2.4. Analitik geri kazanım

Farmasötik preparattan geri kazanım çalışmaları standart ekleme yöntemine göre yapıldı. Mirtazapin içeren, film tablet formundaki Minelza 30 mg ve Mirtaron 30 mg isimli ticari farmasötik preparatlardan tablet çözeltileri Bölüm 3.3.3 'de verildiği gibi şekilde hazırlandı. Bu çözeltilerin ilk önce UV–Görünür Bölge ve 1. Türev spektrumları alındı ve absorbansları okundu. Sonra bu çözeltilerin üzerine 3 farklı derişimde hazırlanan (1.00, 19.00 ve 44.00 µg/mL) mirtazapin standart çözeltileri eklendi, spektrumları alındı ve absorbans değerleri okundu. [% AGK= ((Bulunan–İlaç Çözeltisi)/Eklenen)x100] formülü kullanılarak yöntemlerin % Analitik Geri Kazanım (% AGK) değerleri elde edildi (Tablo 4.3).

Tablo 4. 3. Farmasötik preparatlarda standart ekleme yöntemine göre analitik geri kazanım değerleri (n=6)

Yöntem	Ticari Preparat	Eklenen (µg/mL)	Bulunan±SS (µg/mL)	Analitik Geri Kazanım (%AGK)	% BSS
UV- Görünür Bölge (319 nm)	Minelza (1 µg/mL)	1,00	2,01 ± 0,07	101,0	3,48
		19,00	20,03 ± 0,12	100,2	0,60
		44,00	45,01 ± 0,09	100,0	0,20
	Mirtaron 1 µg/mL	1,00	2,03 ± 0,05	103,0	2,46
		19,00	19,99 ± 0,21	99,9	1,05
		44,00	45,66 ± 0,09	101,5	0,20
1. Türev (302,5 nm)	Minelza 1 µg/mL	1,00	1,98 ± 0,06	98,0	3,03
		19,00	19,95 ± 0,05	99,7	0,25
		44,00	45,02 ± 0,02	100,1	0,05
	Mirtaron 1 µg/mL	1,00	2,02 ± 0,02	102,0	0,99
		19,00	20,26 ± 0,06	101,4	0,30
		44,00	44,55 ± 0,14	98,9	0,32

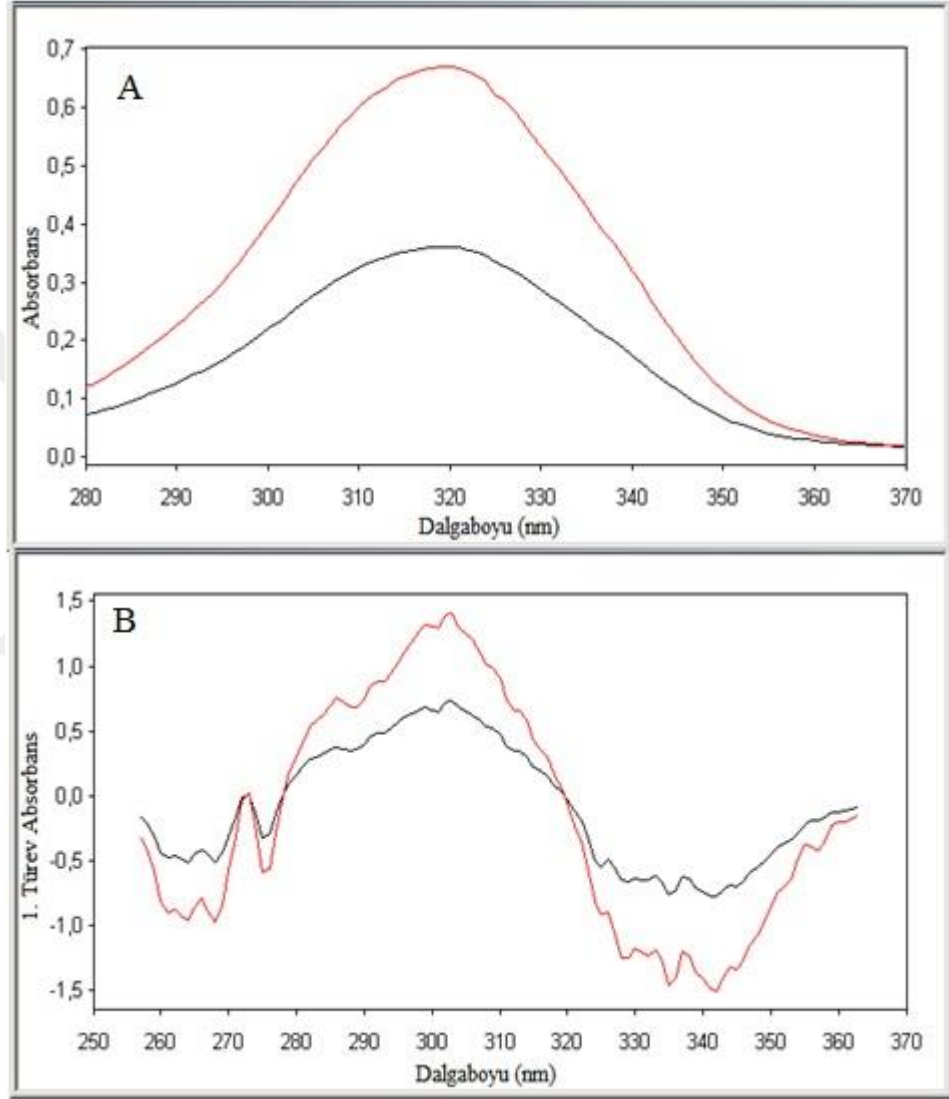
SS: standart sapma, % BSS: bağıl standart sapma, %AGK= analitik geri kazanım

4.1.2.5. Yöntemin farmasötik preparatlara uygulanması

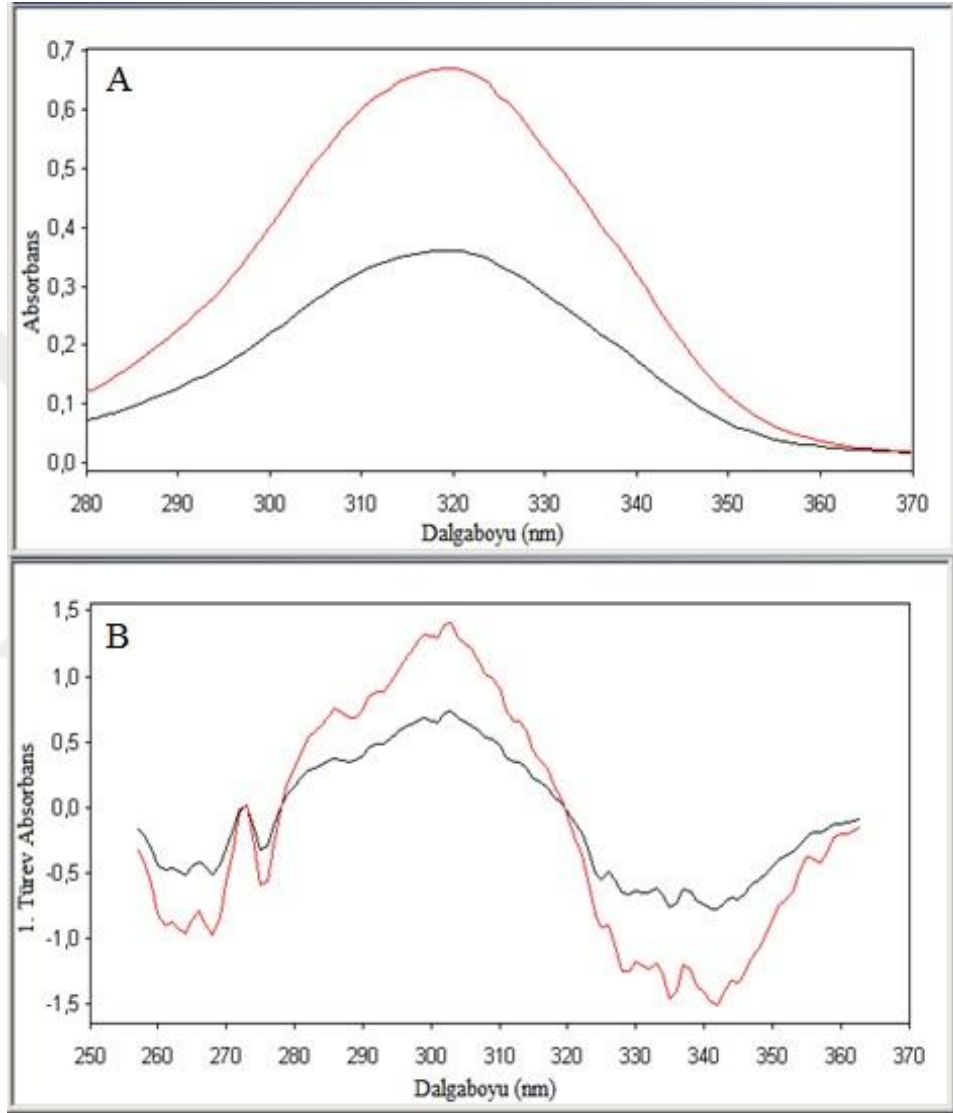
Geliştirilip validasyonları yapılan UV–Görünür Bölge Spektrofotometri ve 1. Türev Spektrofotometri yöntemlerinin uygulanabilir olduğunu görmek amacıyla mirtazapin etkin maddesine sahip ticari olarak piyasada mevcut olan Minelza ve Mirtaron isimli iki ilaç serbest eczanelerden temin edildi. Bu ilaçlardan Bölüm 3.3.3 'de belirtildiği gibi 10 µg/mL ve 20 µg/mL derişimlerde tablet çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin UV–Görünür Bölge ve 1. Türev spektrumları alındı, absorbanları okundu ve kalibrasyon eğrisi kullanılarak miktar tayinleri gerçekleştirildi. Sonuçlar % Geri Kazanım değerleriyle verildi. Farmasötik preparatlardan elde edilen spektrumlar Şekil 4.6 ve Şekil 4.7 'de analiz sonuçları Tablo 4.4 'de verildi.

Tablo 4. 4. Tablet çözeltilerinin analiz sonuçları

Yöntem	Tablet	Tablet Çözeltisi (µg/mL)	Bulunan±SS (µg/mL)	Geri Kazanım (%)	BSS (%)
UV-Görünür Bölge	Minelza (30 mg)	10	9,99±0,11	99,99	1,10
	Mirtaron (30 mg)	20	19,91±0,15	99,55	0,75
1. Türev	Minelza (30 mg)	10	10,01±0,13	100,1	1,30
	Mirtaron (30 mg)	20	19,88±0,12	99,4	0,60



Şekil 4.6. Minelza (30 mg) tabletinin 10 ve 20 µg/mL derişimlerdeki çözeltilerinin
A- UV-Görünür Bölge ve B- 1. Türev spektrumları



Şekil 4.7. Mirtaron (30 mg) tabletinin 10 ve 20 µg/mL derişimlerdeki çözeltilerinin
A- UV- Görünür Bölge ve B- 1. Türev spektrumları

4.2. HPLC-FD Yöntemi

4.2.1. Standart çözeltilerin hazırlanması

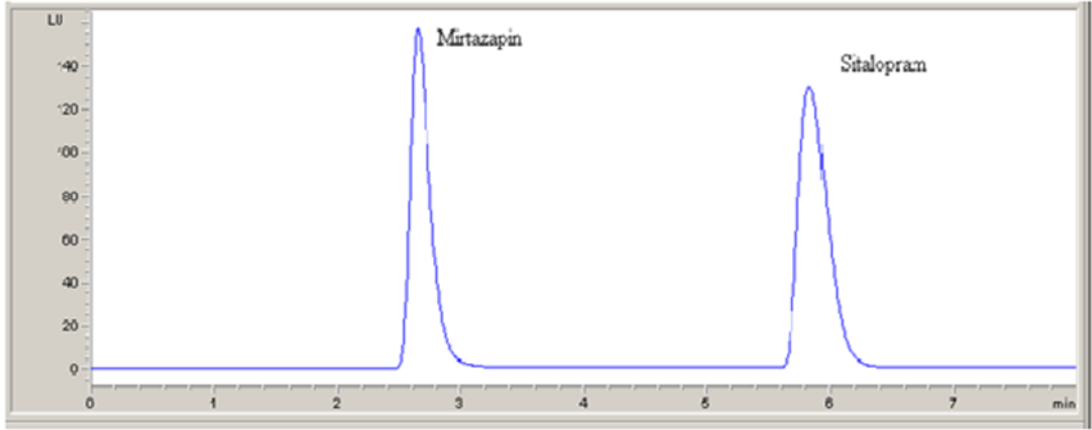
Standart mirtazapinden 100 µg/mL derişimde metanolde stok çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden 0.5, 2, 4, 6, 8, 15, 20 ve 30 µg/mL derişimlerde standart çalışma çözeltileri ve 1, 10 ve 25 µg/mL derişimlerde ise kalite kontrol çözeltileri hazırlandı. Çalışmada iç standart (IS) olarak sitalopram kullanıldı. Sitalopram standardından 100 µg/mL derişimde stok çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden ise deneylerde kullanılmak üzere 20 µg/mL derişimde sitalopram standart çalışma çözeltisi hazırlandı. Sitaloramli mirtazapin standart çözeltilerinin floresans dedektörlü HPLC'de 248 nm (λ_{uy}) uyarılma ve 410 nm (λ_{em}) emisyon dalga boylarında kromatogramları alındı.

4.2.2. Validasyon (yöntem geçerlilik testleri)

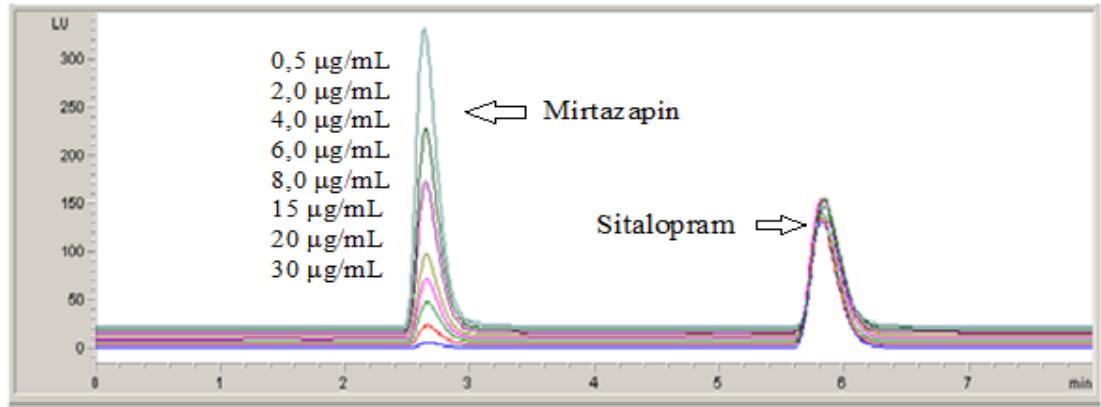
HPLC–FD yöntemi geliştirildikten sonra ICH (International Conference on Harmonisation) kılavuzlarına göre valide edildi.

4.2.2.1. Belirleyicilik

Sitalopramlı standart mirtazapin çözeltilerinin elde edilen kromatogramların incelemesinde bileşenlerin alıkonma zamanları mirtazapinin 2,64 dakika ve sitalopramın 5,80 dakika (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9) olarak belirlendi. Bütün çalışmalarda farmasötik preparatlardan ve standart çözeltilerden herhangi bir interferans gözlenmedi.



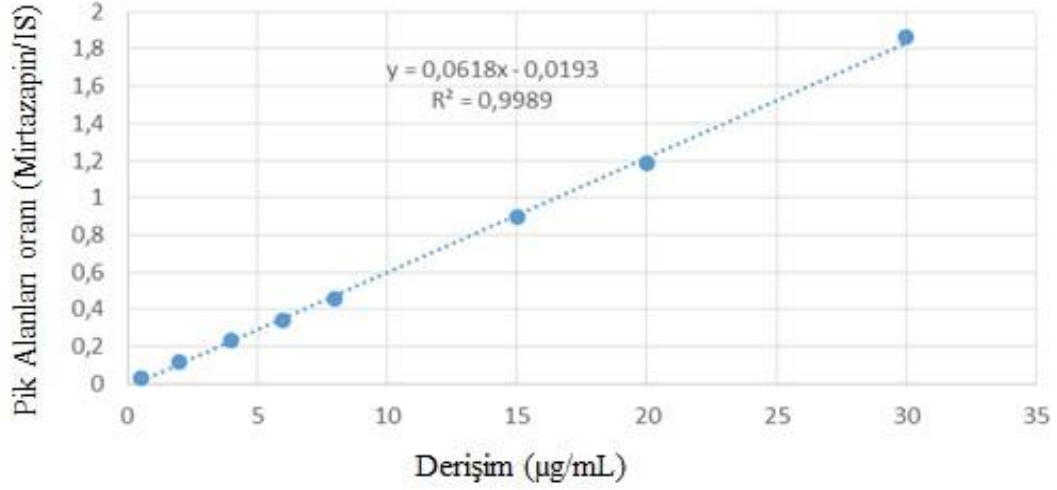
Şekil 4.8. HPLC–FD yöntemi ile elde edilen 15 µg/mL mirtazapin ve 20 µg/mL sitalopram içeren çözeltiye ait kromatogram



Şekil 4.9. Sitalopram iç standardı içeren farklı derişimlerde standart mirtazapinin HPLC–FD kromatogramları

4.2.2.2. Doğrusal aralık ve kalibrasyon eğrisi

20 µg/mL derişimde IS içeren 0,5–30 µg/mL (0,5, 2, 4, 6, 8, 15, 20 ve 30 µg/mL) derişim aralığında hazırlanan mirtazapin standart çalışma çözeltilerinin HPLC kromatogramları alındı, bu kromatogramlarda mirtazapin ve IS pik alanları belirlendi. Mirtazapin çözeltilerinin derişimine karşı, pik alan oranlarının (mirtazapin pik alanı/IS pik alanı) grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon eğrisi elde edildi (Şekil 4.9).



Şekil 4.10. HPLC–FD yöntemi ile elde edilen mirtazapin standart çalışma çözeltilerinin ortalama kalibrasyon eğrisi

HPLC–FD yöntemiyle elde edilen kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.5 'de verildi.

Tablo 4. 5. Mirtazapin standart çalışma çözeltilerinin HPLC–FD yöntemine ait kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri

Dalga boyları (nm)		ÇA (µg/mL)	LR ⁿ	Sa	Sb	R
Uyarma	Emisyon					
290	370	0,5-30	Y=0,0618x – 0,0193	0,0063	0,0014	0,9989

ÇA: çalışma aralığı, n:6 kalibrasyon eğrisi, LR: lineer regresyon, Sa: regresyon eğrisindeki kaymanın standart sapması Sb: regresyon eğrisindeki eğimin standart sapması, R: korelasyon katsayısı

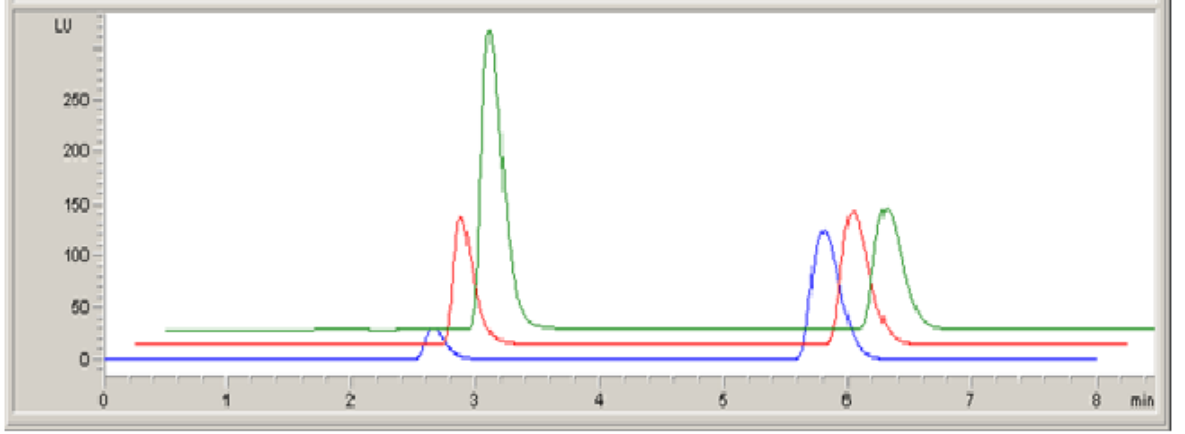
4.2.2.3. Doğruluk ve kesinlik

Yöntemin doğruluğu ve kesinliği günüçi ve günler arası değişkenlerle belirlendi. Kalibrasyon eğrisinin içerisine düşen düşük, orta ve yüksek üç farklı derişimde kalite kontrol çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin günüçi (aynı yöntem ve aynı labaratuvar şartlarında 1 günde 6 kez) ve günler arası (aynı yöntemle 6 farklı günde 6 kez) kromatogramları alındı (Şekil 4.11) ve pik alanları okundu. Okunan değerlerin ortalamaları, standart sapmaları, bağıl standart sapmaları ve bağıl hataları belirlendi. Yöntemin kesinliği bağıl standart sapmayla [%BSS = (SS/Ortalama Değer) x 100] ve doğruluğu da bağıl hatayla [%BH= (bulunan–eklenen/eklenen) x100] verildi (Tablo 4.6).

Tablo 4. 6. HPLC–FD yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)

Eklenen (µg/mL)	Günüçi			Günler Arası		
	Ortalama±SS (µg/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS	Ortalama±SS (µg/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS
1	1,04 ± 0,02	4,00	1,92	1,05 ± 0,06	5,00	5,71
10	10,25 ± 0,27	2,50	2,63	9,69 ± 0,45	-3,10	4,64
25	25,17 ± 0,11	0,68	0,44	24,37 ± 0,49	-2,52	2,01

SS: standart sapma (n=6), %BH= bağıl hata, % BSS: bağıl standart sapma



Şekil 4.11. Mirtazapinin doğruluk ve kesinlik çalışmalarında kullanılan kalite kontrol çözeltilerine ait kromatogramlar

4.2.2.4. Gözlenebilme sınırı (LOD) ve miktar tayin alt sınırı (LOQ)

HPLC–FD yönteminde mirtazapin çözeltilerinin alınan kromatogramlarından sinyal/gürültü oranı 3 olduğu derişim gözlenebilme sınırı (LOD) ve 10 olduğu derişimde miktar tayin sınırı (LOQ) değerleri olarak belirlendi. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,2 µg/mL ve 0,45 µg/mL olarak tespit edildi.

4.2.2.5. Analitik geri kazanım

Farmasötik preparattan analitik geri kazanım değerleri standart ekleme yöntemine göre belirlendi. Mirtazapin etkin maddesine sahip Minelza (30 mg) ve Mirtaron (30 mg) tabletlerinden Bölüm 3.3 'de belirtildiği şekilde 2 µg/mL derişiminde tablet çözeltileri hazırlandı, kromatogramları alındı ve pik alan oranları belirlendi. Sonra tablet çözeltileri üzerine mirtazapinin 3 farklı derişimdeki kalite kontrol çözeltileri eklendi, kromatogramları alındı ve pik alan oranları tespit edildi. [% AGK= ((Bulunan–İlaç Çözeltisi)/Eklenen)x100] formülü kullanılarak yöntemlerin % Analitik Geri Kazanım (%AGK) değerleri elde edildi (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. HPLC–FD yönteminin farmasötik preparatlarda standart ekleme yöntemine göre analitik geri kazanım değerleri (n=6)

Ticari Preparat	Eklenen (µg/mL)	Bulunan±SS (µg/mL)	Geri Kazanım	% BSS
Minelza (30mg) 2 µg/mL	1,00	2,97 ± 0,11	97,0	3,70
	10,00	12,36 ± 0,52	103,6	4,21
	25,00	27,24 ± 1,38	100,9	1,38
Mirtaron (30 mg) 2 µg/mL	1,00	2,99 ± 0,12	99,0	4,01
	10,00	12,18 ± 0,31	101,8	2,55
	25,00	27,03 ± 0,39	100,1	1,44

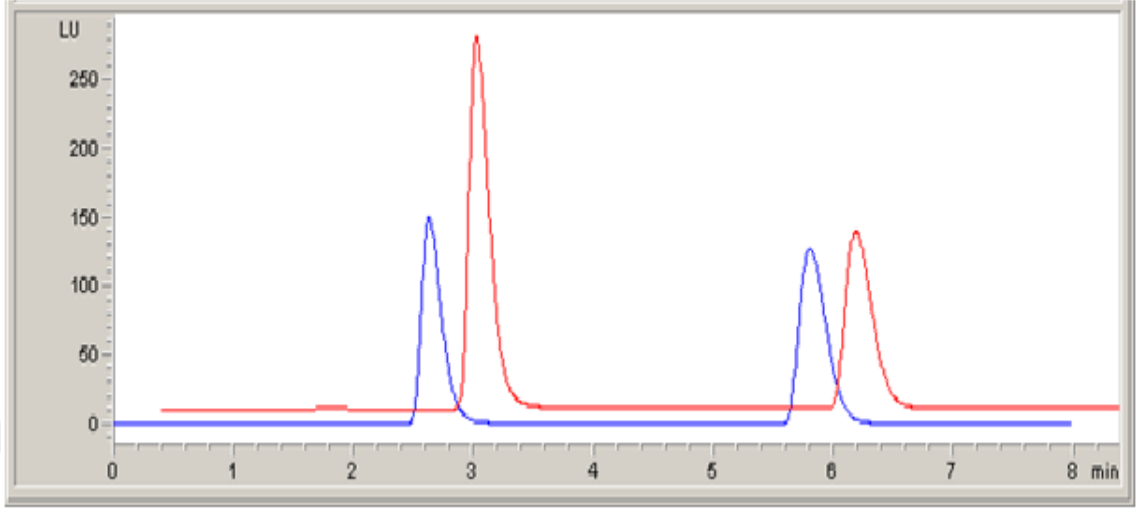
SS: standart sapma (n=6), % BSS: bağıl standart sapma

4.2.2.6. Yöntemin farmasötik preparatlara uygulanması

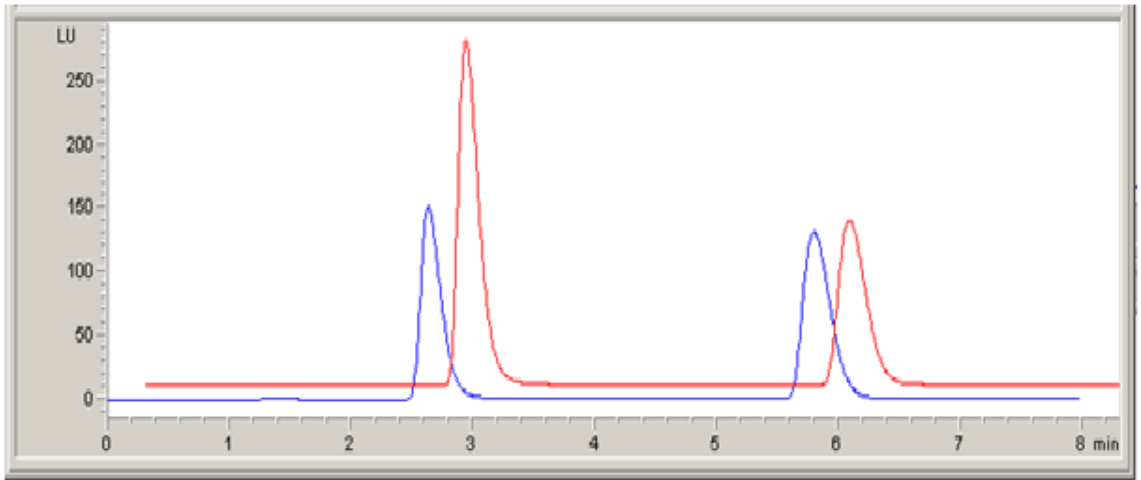
Geliştirilip validasyonları yapılan HPLC–FD yönteminin uygulanabilir olduğunu görmek amacıyla mirtazapin etkin maddesine sahip ticari olarak piyasada mevcut olan Minelza ve Mirtaron isimli iki ilaç serbest eczanelerden temin edildi. Bu ilaçlardan Bölüm 3.3.3 'de belirtildiği gibi 15 µg/mL ve 25 µg/mL derişimlerde tablet çözeltileri hazırlandı ve iç standart ilave edildi. Bu çözeltilerin HPLC–FID yöntemiyle kromatogramları alındı, pik alanları okundu, pik alan oranları belirlendi. Sonuçlar % Geri Kazanım değerleriyle verildi. Farmasötik preparatlardan elde edilen spektrumlar Şekil 4.12 ve Şekil 4.13 'de analiz sonuçları Tablo 4.8 'de verildi.

Tablo 4. 8. HPLC–FID yönteminin tablet çözeltilerinin analiz sonuçları

Tablet	Tablet Çözeltisi (µg/mL)	Bulunan±SS (µg/mL)	Geri Kazanım (%)	BSS (%)
Minelza (30 mg)	15	14,98±0,14	99,87	0,94
Mirtaron (30 mg)	25	25,01±0,11	100,04	0,44



Şekil 4.12. İç standartlı 15 ve 25 µg/mL derişimlerdeki minelza (30 mg tablet) çözeltilisinin HPLC kromatogramları



Şekil 4.13. İç Standartlı 15 ve 25 µg/mL derişimlerdeki mirtaron (30 mg tablet) çözeltilisinin HPLC kromatogramları

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde, insan ruh sağlığında ciddi oranda bozulmalar mevcuttur. Ruh sağlığındaki bozuklukların başında da depresyon gelmektedir. Diğer bir deyişle depresyon en yaygın olarak görülen psikiyatrik bozukluklardan birisidir ve yapılan çalışmalarla insanların % 15 'inin yaşamlarının belli bir döneminde depresyona girdiği gösterilmiştir (Beck *et al.*, 1979; Katon and Sullivan, 1990; Kirsch, 2010).

Depresyon kaynaklandığı nedene göre, a) reaktif (sekonder) depresyon, b) majör (endojen) depresyon, c) bipolar affektif (manik depresif) depresyon olmak üzere üç gruba ayrılabilir (Kayaalp, 2002; Kirsch, 2010). Günümüzde depresyon tedavisinde karamsarlığı ve endişeyi azaltıcı şekilde etki gösteren antidepresanlar kullanılmaktadır. Antidepresan ilaçlar etki mekanizmalarına göre, trisiklik antidepresanlar, tetra/bi/mono/heterosiklik antidepresanlar, seçici serotonin "re-uptake" inhibitörleri (SSRI), seçici serotonin-noradrenalin "re-uptake" inhibitörleri (SSNI) ve monoamin oksidaz inhibitörleri olarak 5 gruba ayrılmaktadır (Kayaalp, 2002; Bökesoy vd., 2000; Kirsch, 2010). Mirtazapin tetrasiklik antidepresanlar grubuna dahil olan ve majör depresyonun tedavisinde kullanılan bir antidepresandır. Etkisini merkezi presinaptik alfa 2–adrenerjik reseptörlerini antagonize ederek ve merkezi noradrenerjik ve serotonerjik iletiyi güçlendirerek gösterir. Aynı zamanda, serotonin 5–HT2 and 5–HT3 reseptörlerini güçlü bir şekilde bloke eder ve 5–HT1A reseptörlerinin aktivasyonuna neden olur (Özcankaya ve Acar, 2001).

Günümüzde insanların hastalıklardan kurtulmak ve kendilerini iyi hissetmek amacıyla sık olarak ilaçları tüketmektedirler. İlaçlar, içerdikleri sentetik ve doğal olarak elde edilmiş etkin maddeler sayesinde canlılarda etki gösterebilmektedirler. Bu etkin maddelerin canlı bünyesinde etki gösterebilmeleri için ilacın farmakokinetik parametrelerine göre belirlenmiş miktarlarda alınması gereklidir. Bu miktardan az alındığında hiçbir etkisi olmaz. Bu miktardan daha fazla yani aşırı miktarda alınması durumunda da tehlikeli boyutlarda zararları dokunur. Bir başka deyişle toksik etkilere sebep olurlar. Bundan dolayı ilacın sentezinden hastaya sunumuna, hastanın

ilacı kullanması evresinde ilaçların analizlerinin yapılması gereklidir. İlaç çalışmalarında etkin madde miktar analizleri önemli bir yer tutmaktadır. Günümüzde ilaç analizlerinde genel olarak spektroskopik ve kromatografik yöntemler daha çok tercih edilmektedir.

Tüm bu bilgilerin ışığı altında bu tez çalışmasının amacı, antidepresan bir etkin madde olan mirtazapinin farmasötik preparatlarda miktar tayinine yönelik UV–Görünür Bölge Spektrofotometri, 1. Türev Spektrofotometri ve HPLC–FD yöntemlerini geliştirmek, validasyonlarını yapmak ve valide edilen yöntemlerle mirtazapin etkin maddesini içeren farmasötik preparatlarda uygulanabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

UV–Görünür Bölge Spektrofotometri ve 1. Türev Spektrofotometri yöntemleri için maksimum absorbans değerlerini elde edebilmek amacıyla farklı çözücü ortamları araştırıldı ve en iyi değerlerin 0,1 M HCl/Metanol ortamında olduğu belirlendi. Bu ortamda çözülerek elde edilen mirtazapin standart çalışma çözeltileri ile kalite kontrol çözeltilerinin UV–Görünür Bölge Spektrumları alındıktan sonra 319 nm dalga boyunda da maksimum absorbans değerleri okundu. 1. Türev spektrofotometri yönteminde, türev spektrumlarında 302,5 nm dalga boyunda bir maksimum ve 265, 277 ve 342 nm dalga boylarında üç minimum pik gözlemlendi ve türev çalışmalarında 302,5 nm dalga boyunda absorbans değerleri kaydedildi.

Her iki yöntemin doğrusal olduğu 1–50 µg/mL derişim aralığında doğrusallık elde edildi. 1, 5, 10, 15, 30 ve 50 µg/mL derişimlerde hazırlanan mirtazapin çözeltilerinin derişimine karşı okunan absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edildi. Kalibrasyon eğrisinin regrasyon analizinden, UV–Görünür Bölge Spektrofotometri yöntemi için regrasyon doğrusunun denklemi $A = 0,0306x + 0,0257$ (A:absorbans, x:mirtazapin derişimi) ve korelasyon katsayısı 0,9987, günüçi ve günler arası bağıl standart sapma (% BSS) ve bağıl hata (% BH) değerleri sırasıyla %6 ve % 5 'den küçük olduğu ve yöntemin analitik geri kazanım değeri de ortalama olarak %100,9 olarak tespit edildi. 1. Türev Spektrofotometri yöntemi için ise regrasyon doğrusunun denklemi ${}^1D = 0,0662x + 0,0466$ (1D : 1.Türev absorbans değeri;

x: mirtazapin derişimi) ve korelasyon katsayısı 0.999, günüçi ve günler arası bağıl standart sapma (% BSS) ve bağıl hata (% BH) değerleri sırasıyla % 2,5 ve % 5,5'den küçük olduğu ve yöntemin analitik geri kazanım değeri de ortalama olarak % 100,0 olarak tespit edildi. Her iki yöntem için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,1 µg/mL ve 0,5 µg/mL olarak belirlendi. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri ve 1.Türev Spektrofotometri yöntemlerinin ticari olarak satılan iki tablet formülasyonuna % 99 doğrulukla uygulanabilir olduğu gösterildi.

Kromatografik yöntemler ilaç analizlerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu yöntemler içinde de, hem kalite kontrol amaçlı hem de hastalarda ilaç düzeylerinin takibinde ve biyoyararlanım işlemlerinde en çok HPLC yöntemi uygulanmaktadır. HPLC çalışmalarında başarılı bir sonuç alabilmek için; kolon, elüsyon tekniği, hareketli faz, çözücü akış hızı, kolon sıcaklığı, enjeksiyon hacmi ve dedektör gibi parametrelerin iyi bir şekilde seçilmesi ve uygulanması gereklidir. Çalışmada, floresans dedektör, ters faz kolon C₁₈ kolon, hareketli faz olarak izokratik elüsyonlu metanol-su-asetonitril (5:60:35, h/h/h) karışımı, kolon sıcaklığı değişken, hareketli faz akış hızı 1.0 mL/dk, 10 µL enjeksiyon hacmi, 290 nm uyarma ve 370 nm emisyon dalga boyundan oluşan çalışma parametreleri ve iç standart olarak sitalopram (2,0 µg/mL) kullanıldı. Bu şartlarda mirtazapinin alıkonma zamanı 2,64 dk ve sitalopram (IS) alıkonma zamanı da 5,80 dk olarak belirlendi. HPLC-FD yönteminin 0,5–30 µg/mL derişim aralığında doğrusallık gözlemlendi. Kalibrasyon eğrisinin regrasyon analizinden, regrasyon doğrusunun denklemi $y = 0,0618x - 0,0193$ (y:mirtazapin pik alanı ile IS (sitalopram) pik alanı oranı, x: mirtazapin derişimi), korelasyon katsayısı 0.9989, günüçi ve günler arası % BSS ve % BH değerleri sırasıyla % 6,0 ve % 5,0 den küçük, LOD değeri 0,2 µg/mL, LOQ değeri 0,45 µg/mL ve ortalama analitik geri kazanım değeri % 100,4 olarak tespit edildi. HPLC-FD yönteminin ticari olarak satılan iki tablet formülasyonuna % 99,9 doğrulukla uygulanabilir olduğu gösterildi.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, mirtazpin etkin maddesinin standart çözeltilerinde ve farmasötik preparatlarda miktar tayini için UV–Görünür Bölge Spektrofotometri, 1. Türev Spektrofotometri ve HPLC–FID yöntemleri geliştirildi ve validasyonları yapıldı.

Geliştirilen yöntemlerin hassas, duyarlı, seçici, doğru ve kesin olduğu validasyon çalışmasıyla gösterildi. Bundan dolayı ilaç endüstrisinde kalite kontrol amaçlı çalışmalarda başarıyla uygulanabilir olduğu sonucuna varıldı. Bu çalışmadan elde edilen veriler mirtazapin ile ilgili ileri çalışmalara yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Adamovics, J.A., “Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals 2nd ed.”, **Merckel Dekker Inc.**, New York, (1997).

Ağargün, M.Y. ve Ebrıç, S., “Mirtazapın: Bir Gözden Geçirme”, **Klinik Psikofarmakoloji Bülteni**, 8 (2): 59-68 (1998).

Ağın, F., Karadaş, N., Uslu, B. ve Özkan, S.A., “Voltametric and RP-LC assay for the antidepressant drug mirtazapine: A validated method for the pharmaceutical dosage form”, **Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, 32 (1): 41-55 (2013).

Akgün, M.K., “Gıda boyalarının Türev Spektrofotometrik Yöntem ile Tayini”, Yüksek Lisans Tezi, **Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, İstanbul (2001).

Anand, A. and Bansal, G., “LC–UV and LC–MS studies on mirtazapine to characterize its degradation products”, **Journal of Pharmaceutical Education and Research**, 2 (1): 66-70 (2011).

Anderson, I.M., “Meta–analytical studies on new antidepressant” **British Medical Bulletin**, 57 (1): 161-178 (2001).

Andrews, J.M. and Nemeroff, C.B., “Contemporary management of depression”, **American Journal of Medicine**, 97 (Suppl 6A): 24S-3S, (1994).

Anonim, “Analitik Kimya II Laboratuvar Aletli Analiz Deneylei”, **Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi**, Analitik Kimya A.B.D., Ankara, (2005).

Anonymous, “ICH Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology” International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use”, **Geneva**, Switzerland, May (1997).

Anttila, S.A. and Leinonen, E.V., "A review of the pharmacological and clinical profile of mirtazapine" *CNS Drug Reviews*, 7 (3). 249-264 (2001).

Armstrong, L., "Topics in Drug Therapy: Antidepressant Update", Department of Pharmaceutical Services, *University of Chicago Hospitals, Topics in Drug Therapy*, Volume 35, Number 6 (1997).

Aydemir, Ö., Ergün, H., Soygür, H., Kesebir, S. ve Tulunay, C., "Majör Depresif Bozuklukta Yaşam Kalitesi: Kesitsel Bir Çalışma", *Türk Psikiyatri Dergisi*, 20(3): 205-212, (2009).

Basci, N., Temizer, A., Bozkurt, A. and Isimer, A., "Optimization of mobile phase in the separation of β -blockers by HPLC", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 18 (4-5): 745-750 (1998).

Beck, A.T., Rush, A.J., Shaw, B. F. and Emery, G., "Cognitive therapy of depression", *The Guilford Press*, New York (1979).

Benajeer, Sk., Venkata Raman, K., Koti Reddy, V. and Anil Kumar, A., "New simple UV spectrophotometric method for determination of mirtazapine in bulk and pharmaceutical dosage forms", *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 13: 482-486 (2012).

Bidlingmeyer, B.A., "HPLC Methodology and Applications", *John Wiley & Sons*, USA (1992).

Bhusari, K.P., Tajne, M.R. and Ahmed, R.H., "Stress degradation studies and development of validated stability indicating method for assay of mirtazapine", *Research Journal of Chemical Sciences*, 1 (4): 74-79, (2011).

Borges, N.C., Barrientos-Astigarraga, R.E., Sverdloff, C.E., Donato, J.L., Moreno, P., Felix, L., Galvinas, P.A.R. and Moreno, R.A., "A fast, sensitive and simple method for mirtazapine quantification in human plasma by HPLC-ESI-MS/MS. Application to a comparative bioavailability study" *Biomedical Chromatography*, 26: 1399-1407 (2012).

Bökesoy, T. A., Çakıcı, İ. ve Melli, M., “Türk Farmakoloji Derneği Farmakoloji Ders Kitabı”, *Gazi Kitapevi*, Ankara (2000).

Çelikel, F.Ç., Cumurcu, E.B. ve Etikan, İ., “Mirtazapinin Majör Depresyonda Etki Başlangıcı ve Güvenirliği: Olgu Serisi”, *Klinik Psikiyatri Dergisi*, 9: 89-98 (2006).

Dallet, P., Labat, L., Richard, M., Langlois, M. H. and Dubost, J.P., “A Reversed-Phase HPLC Method Development for the Separation of New Antidepressants” *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 25(1): 101–111 (2002).

Danilevičiūtė, V., Sveikata, A., Virginija, A., Gumbrevičius, G., Fokas, V. and Sveikatiėnė, R., “Efficacy, Tolerability and Preference of Mirtazapine Orally Disintegrating Tablets in Depressed Patients: A 17-week Naturalistic Study in Lithuania”, *Medicina (Kaunas)*, 45(10): 778-784 (2009).

Dodd, S., Burrows, G.D. and Norman, T.R., “Chiral determination of mirtazapine in human blood plasma by high-performance liquid chromatography”, *Journal of Chromatography B*, 748: 439-443 (2000).

Dola, J.W. and Jupille, T.H., “What is Chromatography? A (very) brief history” *ASIN: B009FCPITC*, September 21 (2012).

Duverneuil, C., la Garnadmaison G.L., de Mazancourt, P. and Alvarez, J-C. “A High-Performance Liquid Chromatography Method with Photodiode–Array UV Detection for Therapeutic Drug Monitoring of the Nontricyclic Antidepressant Drugs” *Therapeutic Drug Monitoring*, 25: 565-573 (2003).

Fawcett, J. and Barkin, R.L., “Review of the results from clinical studies on the efficacy, safety and tolerability of mirtazapine for the treatment of patients with major depression” *Journal of Affective Disorders*, 51 (3): 267-285 (1998).

Foye, W. O., Lemke, T. L. and Williams, D. A., “Foye’s Principles of Medicinal Chemistry”, *Lippincott Williams & Wilkins*, USA (2008).

Gündüz, Y., “İnstrümental Analiz” Dokuzuncu baskı, *Gazi kitapevi*, ISBN:9757313434, (2007).

Gurke, R., Rossmann, J., Schubert, S., Sandmann, T., Rößler, M., Oertel, R. and Fauler, J., “Development of a SPE–HPLC–MS/MS method for the determination of most prescribed pharmaceuticals and related metabolites in urban sewage samples”, *Journal of Chromatography B*, 990: 23–30 (2015).

Gillman, P.K., “Tricyclic antidepressant pharmacology and therapeutic drug interactions updated”, *British Journal of Pharmacology*, 151 (6): 7373-748 (2007).

Gondov, T. and Petrkov, I., “Determination of new antidepressants in pharmaceuticals by thin-layer chromatography with densitometry”, *Journal of AOAC International*, 93 (3): 778-782 (2010).

Haeflinger, P., “Limits of the Internal Standard Technique in Chromatography”, *Journal of Chromatography*, 218: 73-81 (1981).

Hamilton, R.J. and Sewell, P.A., “Introduction To High Performance Liquid Chromatography, Second Edition”, *Chapman and Hall*, USA (1982).

Hartmann, P.M., “Mirtazapine: A Newer antidepressant” *American Family Physician*, 1 (59): 159-161 (1999).

Hollas, J.M., “Modern Spectroscopy” *4th Press, Chichester: Hoboken*, NJ, J Wiley, (2004).

Horvath, C., Melander, W., Molnar, I. and Molnar, P., “Enhancement of retention by ion–pair formation in liquid chromatography with nonpolar stationary phases” *Analytical Chemistry*, 49 (14): 2295-2305 (1977).

İnal, A., Büyükşekerci, M. and Ulusoy, H.B., “Diyabetik Nöropati Oluşturulmuş Sıçanlarda Mirtazapinin Antinöroseptif Etkisi”, *Arch Neuropsychiatr*, 53: 12-16 (2016).

Karabekiroğlu, A., “Majör Depresyon Hastalıklarında Yürütücü İşlevlerin değerlendirilmesi, İlk Epizod Depresyon ve Tekrarlayıcı Depresyon Grupları Arasındaki Farklılıkların Karşılaştırılması”, Uzmanlık Tezi, *Marmara Üniversitesi*, İstanbul (2008).

Karaşen, N. and Altinöz, S., “Determination of mirtazapine in tablets by UV spectrophotometric and derivative spectrophotometric methods”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24: 11-17, (2000).

Katon, W. and Sullivan, M.D., “Depression and chronic medical illness”, *Journal of Clinical Psychiatry*, 51: 3-11 (1990).

Kaya, E., “Kronik gerilim tipi başağrısı profilaksi tedavisinde amitriptilin, mirtazapin, venlafaksin ve sitalopram etkinliği, tolerabilitesi ile serum lipid düzeyleri ve koagülasyon parametreleri üzerine etkileri”, Tıpta uzmanlık tezi, *Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi*, Aydın (2006).

Kayaalp, S.O., “Tıbbi Farmakoloji”, *Hacettepe Taş Kitapçılık*, Ankara (2002).

Kirchherr, H. and Kühn–Velten, W.N., “Quantitative determination of forty-eight antidepressants and antipsychotics in human serum by HPLC tandem mass spectrometry: A multi–level, single–sample approach”, *Journal of Chromatography B*, 843: 100-113, (2006).

Kirsch, I., “Antidepressants: The Emperor's New Drugs?” *The Huffington Post*, January 19, http://www.huffingtonpost.com/irving-kirsch-phd/antidepressants-theemper_b_442205.html (2010).

Krstulovic, A.M. and Brown, P.R., “Reversed–Phase High–Performance Liquid Chromatography”, *Theory, Practice and Biomedical Applications*, John Wiley & Sons, USA (1982).

Labat, L., Dallet, P., Kummer, E. and Dubost, J.P., "Spectrophotometric, Spectrofluorimetric, HPLC and CZE Determination of Mirtazapine in Pharmaceutical Tablets", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28(2): 365-371 (2002).

Laird, L.K., Benefield, W.H., "Mood Disorders 1: Major Depressive Disorders", In: Young LE, Koda-Kimble MA, eds. Applied Therapeutics. 6th ed. **Vancouver: Applied Therapeutics**, Inc; pp. 4-76 (1995).

Lavasani, H., Giorgi, M., Sheikholeslami, B., Hedayati, M. and Rouini, M.R., "A rapid and sensitive HPLC-Fluorescence method for determination of mirtazapine and its two major metabolites in human plasma", *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 13 (3): 853-862 (2014).

Lindsay, S.J., "High Performance Liquid Chromatography" Second Edition, London (1992).

Malfará, W.R., Bertucci, C., Queiroz, M.E.C., Carvalho, S.A.D., de Lourdes Pires Bianchi, M., Cesarino, E.J., Crippa, J.A. and Queiroz, R.H.C., "Reliable HPLC method for therapeutic drug monitoring of frequently prescribed tricyclic and nontricyclic antidepressants", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44: 955-962, (2007).

Mandrioli, R., Mercolini, L., Ghedini, N., Bartoletti, C., Fanali, S. and Raggi, M.A., "Determination of the antidepressant mirtazapine and its two main metabolites in human plasma by liquid chromatography with fluorescence detection", *Analytica Chimica Acta*, 556: 281-288, (2006).

Maris, F.A., Dingler, E. and Niehues, S., "High performance liquid chromatographic assay with fluorescence detection for the routine monitoring of the antidepressant mirtazapine and its demethyl metabolite in human plasma", *Journal of Chromatography B*, 721: 309-316 (1999).

Masana, M., Castane, A., Santana, N., Bortolozzi, A. and Artigas, F., “Noradrenergic antidepressants increase cortical dopamine: potential use in augmentation strategies”, *Neurpharmacology*, 63 (4): 675-684, (2012).

Meyer, V.R., “Practical High Performance Liquid Chromatography” (V. Cottrell, Çev.), John Wiley and Sons, (1988).

Morgan, P.E. Tapper, J. and Spencer, E.P., “Measurement of total mirtazapine and normirtazapine in plasma/serum by liquid chromatography with fluorescence detection”, *Journal of Chromatography B*, 798: 211-215, (2003).

Murthy, V.R., Acharyulu, M.L.N., Jagannadharao, V., Reddy, T.S. and Rama Lakshmi, C.S., “Ion-association methods for the determination of mirtazapine in pure and pharmaceutical formulations”, *Asian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 2 (1): 85-97, (2013).

Özcankaya, R. ve Acar, A., “Depresyon Tedavisinde Amitriptilin ve Mirtazapinin Etkinlik ve Yan Etkilerinin Karşılaştırılması”, *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni*, 11 (1): 17-27 (2001).

Özdemir, E.K., Ulu, S.T. ve Ünal, D.Ö., “Spectrometric Determination of Mirtazapine in Pure and Tablet Pharmaceutical Preparation”, *Journal of Faculty of Pharmacy*, Istanbul, 42 (2): 77-82 (2012).

Pistos, C., Koutsopoulou, M. and Panderi, I., “A validated liquid chromatographic tandem mass spectrometric method for the determination of mirtazapine and demethylmirtazapine in human plasma: Application to a pharmacokinetic study” *Analytica Chimica Acta*, 514: 15-26 (2004).

Ptacek, P., Klima, J. and Macek, J., “Determination of mirtazapine in human plasma by liquid chromatography”, *Journal of Chromatography B*, 794: 323-328 (2008).

Preskorn, S.H., “Antidepressant drug selection: criteria and options”, *Journal of Clinical Psychiatry*, 55 (9): 6-22 (1994).

Rao, R.N. and Raju, A.N., "Development and validation of a reversed-phase HPLC method for separation and simultaneous determination of process-related substances of mirtazapine in bulk drugs and formulations", *Journal of Chromatographic Science*, 47: 223-230 (2009).

Ravi, M., Veeraiah, T. and Reddy, C.V.R., "Extractive spectrophotometric determination of mirtazapine in pure and pharmaceutical forms", *Oriental Journal of Chemistry*, 30 (2): 723-730 (2014).

Riley, C.M. and Rosanske, T.W., "Development and validation of analytical methods", 1st Edition, *Elsevier Science*, (1996).

Romiguieres, T., PehourcQ, F., Matoga, M., Begaud, B. and Jarry, C., "Determination of mirtazapine and its demethyl metabolite in plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection: Application to management of acute intoxication", *Journal of Chromatography B*, 775: 163-168 (2002).

Shah, V.P. and Midha, K.K., "Bioanalytical Method Validation-A revisit with Decade of Progress", *Journal of Pharmaceutical Research*, 17 (12): 1551-1557 (2000).

Shawartz, M.E. and Krull, I.S., "Analytical Method Development and Validation", *Markel Dekker Inc.*, New York (1997).

Skoog, D.A., Holler, F.J. and Neiman, T.A., "Enstrümental Analiz İlkeleri", *Bilim Yayıncılık*, 849, Ankara (1998).

Snyder L.R., Glajch, J.L. and Kirkland, J.J., "Practical HPLC Method Development", *John Wiley and Sons*, USA (1988).

Sonawane, L.V., Poul, B.N., Usnale, S.V., Waghmare, P.V. and Surwase, L.H., "Bioanalytical method validation and its pharmaceutical application—A review" *Pharmaceutica Analytica Acta*, 5 (3): 1-7 (2014).

Timmer, C.J., Sitsen, J.M. and Delbressine, L.P., “Clinical pharmacokinetics of mirtazapine” *Clinical Pharmacokinetics* 38 (6): 461-474 (2000).

Uddin, J., “Macro to Nano Spectroscopy: Basic Principles and Analytical Application of Derivative Spectrophotometry” *Publisher:InTech* pp. 253-268 (2012).

USP 37 “Physical Tests/ (851) Spectrophotometry and Light-Scattering” *U.S. Pharmacopeial Convention*, (2014).

Viggiano, J.A., “Spectrophotometric Analysis of Beer and Wort” Chester F Carlson Center for Imaging Science Rochester, *Institute of Technology*, August (2006).

Yıldız, A., Genç, Ö. and Bektaş, S., “Enstrümental Analiz Yöntemleri”, *Hacettepe Üniversitesi Yayınları*, Ankara (1997).

Youssef, R.M., “Determination of mirtazapine in spiked human plasma and tablets by first derivative spectrofluorimetric method”, *Saudi Pharmaceutical Journal*, 18: 45-49 (2010).

ÖZGEÇMİŞ

20 Kasım 1991 yılında Avcılar/İstanbul'da doğdum. Avcılar Güngör Tekiner İlköğretim Okulu'nda okuyup Erzincan Kazım Karabekir Lisesini bitirdikten sonra 2009 yılında girdiğim Erzincan Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden 2013 yılında mezun oldum. Aynı yıl Erzincan Üniversitesi Eğitim Fakültesi Pedagojik Formasyon Eğitimi (2013) ve Erzincan Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans Programına (2014) başladım. Pedagojik Formasyon Eğitimi'nden 2014 yılında, Yüksek Lisans Programı'ndan ise 2016 yılında mezun oldum.

İş Denevimi :

Stajlar :

- 1) Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı
Erzincan Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü (2012)
- 2) Özel Neon Hastanesi
Biyokimya Laboratuvarı (2013)
- 3) Erzincan Mengücek Gazi Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Biyokimya Laboratuvarı (2013)
- 4) Erzincan Anadolu Lisesi
Öğretmenlik Uygulaması-Staj (2014)

İletişim : elifnilay_91@hotmail.com