

**T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİR ANTİ OBEZİTE İLACININ SPEKTRFOTOMETRİK VE  
KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLER İLE FARMASÖTİK  
PREPARATLAR VE BİYOLOJİK SIVILARDA MİKTAR TAYİNİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Kimyager Gökçe KILIÇARSLAN**

**Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA BÖLÜMÜ**  
**Enstitü Bilim Dalı : ANALİTİK KİMYA**  
**Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Aysel KÜÇÜK**

**Temmuz 2010**

T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİR ANTI OBEZİTE İLACININ SPEKTROFOTOMETRİK VE  
KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLER İLE FARMASÖTİK  
PREPARATLAR VE BİYOLOJİK SIVILARDA MİKTAR TAYİNİ

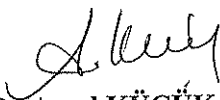
YÜKSEK LİSANS TEZİ

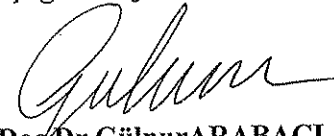
Kimyager GÖKÇE KILIÇARSLAN


Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA BÖLÜMÜ

Enstitü Bilim Dalı : ANALİTİK KİMYA

Bu tez 07 / 07 /2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

  
Yrd.Doç.Dr.Aysel KÜÇÜK  
Jüri Başkanı

  
Yrd.Doç.Dr.Gülnur ARABACI  
Üye

  
Yrd.Doç.Dr.Dilek ANGIN  
Üye

## TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın her safhasında, bilimsel yardım ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Aysel KÜÇÜK'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tezimi yürütmemde yol gösteren ve teşvik eden değerli hocam Sayın Doç. Dr. Abdil ÖZDEMİR'e,

Sibutramin etken madde standardını ve Reductil ticari ilacını temin etmem konusundaki yardımlarından dolayı FARGEM A.Ş.'ye ve abim Ecz. Gökhan KILIÇARSLAN'a,

Bölümümüzdeki araştırma laboratuvarımızda bulunan eski Thermo Marka HPLC'yi bölümümüze hibe ederek, bu sayede çalışmalarımızı oturtana kadar ön denemelerimi yapmamızı sağlayan Eczacıbaşı-Zentiva San. T.A.Ş.'ye,

Deneysel hesaplamalarımın yardımına başvurduğum Kalite Rehberi Danışmanı Sayın Reha UYGUN'a,

Deneysel çalışmalarımın yardımına başvurduğum Sevgili arkadaşım Esin İMAMOĞLU'na sonsuz sevgi, saygı ve şükranlarımı sunarak teşekkür etmek istiyorum.

'Bir Anti Obezite İlacının Spektrofotometrik ve Kromatografik Yöntemler ile Farmasötik Preparatlar ve Biyolojik Sıvılarda Miktar Tayini' adlı çalışmam, 109T555 no'lu Tübitak 1002 projesi kapsamında ve SAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 2010-50-01-052 nolu proje ile desteklenmiştir.

Gökçe KILIÇARSLAN

Temmuz 2010

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	x
ÖZET.....	xiii
SUMMARY.....	xiv
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ.....	1
1.1. Obezitede İlaç Tedavisi.....	2
1.2. Obezite Tedavisinde Sibutramin.....	3
1.2.1. Sibutramin hidroklorür.....	5
1.2.2. Sibutramin'in farmokokinetik özellikleri.....	5
1.2.3. Endikasyonları.....	6
1.2.4. Kontrendikasyonları.....	6
1.3. Biyoyararlanım ve Biyodeşdeğerlik.....	7
1.4. Validasyon.....	8
BÖLÜM 2.	
MATERYAL VE YÖNTEM.....	18
2.1. Materyaller.....	18
2.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	18
2.1.2. Kullanılan cihazlar.....	18
2.2. Yöntemler.....	19
2.2.1. Spektroskopik yöntem.....	19

2.2.1.1. Elektromanyetik ışınma-madde etkileşimleri.....	19
2.2.1.1.a. Işımanın kırılması ve yansımaları.....	20
2.2.1.1.b. Işımanın saçılması.....	20
2.2.1.1.c. Işımanın polarizasyonu.....	20
2.2.1.1.d. Işımanın absorpsiyonu ve emisyonu.....	21
2.2.1.2. Lambert-Beer kanunu.....	22
2.2.1.3. Ultraviyole-görünür bölge absorpsiyon spektroskopisi..	23
2.2.1.4. Standartların hazırlanması.....	31
2.2.1.5. Ticari numunelerin hazırlanması.....	31
2.2.2. Türev spektroskopisi.....	31
2.2.2.1. UV-türev spektrofotometrisinin avantajları ve kullanım alanları.....	34
2.2.2.2. Standartların hazırlanması.....	36
2.2.2.3. Ticari numunelerin hazırlanması.....	37
2.2.3. Kromatografik yöntem.....	37
2.2.3.1. Kromatografik parametreler.....	38
2.2.3.2. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi.....	45
2.2.3.3. HPLC cihazı.....	49
2.2.3.4. Kromatografik şartlar.....	53
2.2.3.5. Standartların hazırlanması.....	53
2.2.3.6. Ticari numunelerin hazırlanması.....	54
2.2.3.7. Standart ekleme yöntemi kullanılarak standartların hazırlanması.....	54
2.2.3.8. Plazma standart numunelerinin hazırlanması.....	55
2.2.3.9. Plazma içeren ticari numunelerin hazırlanması.....	55
2.2.3.10. Plazma içerisinde standart ekleme metodu kullanılarak standartların hazırlanması.....	56

### BÖLÜM 3

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	57
3.1. Spektrofotometrik Yöntem ile Elde Edilen Bulgular.....	57
3.1.1. Yöntem validasyonu.....	57
3.1.2. Yöntem geliştirme.....	61

3.1.3. Ticari preparatlarda miktar tayini.....	61
3.1.4. Çözücülerin etkisi.....	63
3.2. Türev Spektroskopisinden Elde Edilen Sonuçlar.....	63
3.2.1. Yöntemin validasyonu.....	63
3.2.2. Yöntem geliştirme.....	73
3.2.3. Ticari preparatlarda miktar tayini.....	76
3.3. HPLC Yöntemi ile Elde Edilen Bulgular.....	78
3.3.1. Yöntemin validasyonu.....	78
3.3.2. Yöntem geliştirme.....	82
3.3.3. Ticari preparatlarda miktar tayini.....	83
3.3.4. Standart ekleme yöntemi ile elde edilen sonuçlar.....	84
3.4. Plazma Ortamında Elde Edilen Bulgular.....	85
3.4.1. Yöntemin validasyonu.....	85
3.4.2. Ticari preparatlarda miktar tayini.....	89
3.4.3. Standart ekleme yöntemi ile elde edilen sonuçlar.....	90
3.4.4. HPLC-DAD yöntemi için elde edilen deneysel parametreler...	93
BÖLÜM 4.	
SONUÇLAR.....	94
KAYNAKLAR.....	96
ÖZGEÇMİŞ.....	100

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

A	: Absorbans
DAD	: Diod array dedektörü
$E_a$	: Mutlak hata
$\epsilon$	: Molar absorptivite katsayısı
H	: Tabaka yüksekliği
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
K	: Orantı sabiti
$k'$	: Kapasite faktörü
$k_d$	: Dağılım hız sabiti
LOQ	: Miktar tayin limiti
LOD	: Teşhis limiti
N	: Kolon verimliliği
n	: Deneme sayısı
RSD	: Bağlı standart sapma
$R_s$	: Rezolüsyon
RT	: Alıkonma zamanı
SD	: Mutlak standart sapma
S/G	: Sinyal/gürültü oranı
T	: Geçirgenlik
$t_{1/2}$	: Yarılanma süresi
UV-Vis.	: Ultraviyole görünür
$\bar{X}$	: Ortalama değer
$\lambda$	: Dalga boyu
$\alpha$	: Seçicilik katsayısı

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Sibutramin Hidroklorürün molekül formülü.....	5
Şekil 1.2.	Miktar tayin limiti (Limit of Quantitation, LOQ) ve Teşhis limiti (Limit of Detection, LOD).....	13
Şekil 2.1.	Işığın kırılması ve yansımaları.....	20
Şekil 2.2.	Işımanın polarizasyonu.....	21
Şekil 2.3.	Işımanın Absorpsiyonu ve Emisyonu.....	21
Şekil 2.4.	$I_0$ şiddetinde ışımının, ortamı daha küçük olan $I$ şiddetinde terk etmesi.....	22
Şekil 2.5.	Absorpsiyon spektrofotometresinin başlıca düzeneği.....	23
Şekil 2.6.	Dalga boyu seçicileri (monokromatörler).....	24
Şekil 2.7.	Tek ışık yollu spektrofotometre düzeneği.....	26
Şekil 2.8.	Çift ışık yollu spektrofotometre düzeneği.....	27
Şekil 2.9.	Tek dedektör kullanımlı çift ışık yollu spektrofotometre.....	28
Şekil 2.10.	Bir maddenin çeşitli dalga boylarındaki absorbans değerlerinin grafikte gösterilimi.....	29
Şekil 2.11.	Standart çözeltilerin bilinen derişimlerine karşı absorbans değerlerinin grafikte gösterilimi.....	29
Şekil 2.12.	Spektrofotometrelerde örneğin konulduğu örnek kap.....	30
Şekil 2.13.	1. ve 4. dereceden türev spektrumları (A:Özgün Spektrum, $\Delta_1$ :1.Türev Spektrumu, $\Delta_2$ :2.Türev Spektrumu, $\Delta_3$ :3.Türev Spektrumu, $\Delta_4$ :4.Türev Spektrumu).....	32
Şekil 2.14.	a) Gauss eğrisinin 1. tek tek ve 2. karışım halindeki spektrumları, b) Gauss eğrisinin karışım halindeki 1.- 4.türev eğrileri.....	33
Şekil 2.15.	Türev spektrumlarının değerlendirilmesi a) Pik-pik tekniği, b) Pik-sıfır tekniği, c) Tanjant tekniği.....	34



Şekil 2.16.	Kolondan ayrılan A ve B gibi iki maddenin kromatogramları...	39
Şekil 2.17.	Bir türün kolonda alıkonma zamanı.....	40
Şekil 2.18.	Bir kromatogramda pik yüksekliği (h) ve taban genişliği (W) bulunması.....	44
Şekil 2.19.	HPLC cihazının şematik olarak görünüşü.....	49
Şekil 3.1.	Metanolde hazırlanmış standartlar için elde edilmiş kalibrasyon eğrisi.....	57
Şekil 3.2.	Suda hazırlanmış standartlar için elde edilmiş kalibrasyon eğrisi.....	58
Şekil 3.3.	Sibutramin için metanol içerisinde alınmış UV spektrumları (5, 10, 15, 20, 30, 40, 45 ve 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ).....	60
Şekil 3.4.	Sibutramin için su içerisinde alınmış UV spektrumları (5, 10, 15, 20, 30, 40, 45 ve 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ).....	60
Şekil 3.5.	Metanol içerisinde 45 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 'lik ticari sibutramin numunesinin UV spektrumu.....	62
Şekil 3.6.	Su içerisinde 45 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 'lik ticari sibutramin numunesinin UV spektrumu.....	63
Şekil 3.7.	Metanol içerisinde birinci türev 217 nm dalga boyu için elde edilmiş kalibrasyon eğrisi.....	65
Şekil 3.8.	Metanol içerisinde ikinci türev 223 nm dalga boyu için elde edilmiş kalibrasyon eğrisi.....	65
Şekil 3.9.	Su içerisinde birinci türev 217 nm dalga boyu için elde edilmiş kalibrasyon eğrisi.....	67
Şekil 3.10.	Su içerisinde ikinci türev 223 nm dalga boyu için elde edilmiş kalibrasyon eğrisi.....	67
Şekil 3.11.	Metanol ortamında sibutramin standartları için alınmış 1. türev spektrumu (45 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ).....	68
Şekil 3.12.	Metanol ortamında sibutramin standartları için alınmış 2.türev spektrumu (45 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ).....	68
Şekil 3.13.	Su ortamında sibutramin standartları için alınmış 1.türev spektrumu (45 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ).....	69
Şekil 3.14.	Su ortamında sibutramin standartları için alınmış 2.türev spektrumu (45 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ).....	69

Şekil 3.15.	Sibutramin için metanol içerisinde alınmış 1.Türev UV spektrumları (5, 10, 15, 20, 30, 40, 45 ve 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ).....	74
Şekil 3.16.	Sibutramin için metanol içerisinde alınmış 2.Türev UV spektrumları (5, 10, 15, 20, 30, 40, 45 ve 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ).....	74
Şekil 3.17.	Sibutramin için su içerisinde alınmış 1.Türev UV spektrumları (5, 10, 15, 20, 30, 40, 45 ve 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ).....	75
Şekil 3.18.	Sibutramin için su içerisinde alınmış 2.Türev UV spektrumları (5, 10, 15, 20, 30, 40, 45 ve 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ).....	75
Şekil 3.19.	Sibutramin / İnternal standart miktarları için hazırlanmış kalibrasyon eğrisi.....	79
Şekil 3.20.	Sibutramin / İnternal standart geri kazanım miktarları için hazırlanmış kalibrasyon eğrisi.....	80
Şekil 3.21.	Metanol çözücü ortamında geri kazanım standartlarından 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 'e ait kromatogram (15 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Donepezil ilavesiyle)...	81
Şekil 3.22.	Ticari kapsülden elde edilen 15 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 'lik kromatogram.....	84
Şekil 3.23.	Standart ekleme yönteminden elde edilen 15 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 'lik kromatogram.....	85
Şekil 3.24.	İnsan plazmasında metanol çözücü ortamında Sibutramin standartlarından hazırlanmış kalibrasyon eğrisi.....	86
Şekil 3.25.	Plazmada hazırlanmış kalibrasyon eğrisinden elde edilen kromatogram (15 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ).....	87
Şekil 3.26.	İnsan plazmasında geri kazanımlar için Sibutramin standartlarından hazırlanmış kalibrasyon eğrisi.....	87
Şekil 3.27.	Plazmada ticari kapsülden elde edilen 15 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 'lik kromatogram.....	90

## TABLolar LİSTESİ

Tablo 3.1.	Sibutramin için metanol ve su ortamında elde edilen kalibrasyon eğrisi parametreleri (n=6).....	58
Tablo 3.2.	Sibutramin için gün-içi ve günler arası kesinlik değerleri (n=6).....	59
Tablo 3.3.	Metanol ve su ortamında Sibutramin içeren ticari kapsüllerden elde edilen geri kazanım değerleri (n=6).....	61
Tablo 3.4.	Metanol ve su ortamında Sibutramin içeren ticari preparatlar için elde edilen istatistiksel değerlendirmeler ( $\alpha=0,05$ , % 95 güvenle) (n=6).....	62
Tablo 3.5.	Metanol ortamında Sibutramin numuneleri için Türev Spektroskopisinden elde edilen kalibrasyon eğrisi parametreleri (5-50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ aralığında) (n=6).....	64
Tablo 3.6.	Su ortamında Sibutramin numuneleri için Türev Spektroskopisinden elde edilen kalibrasyon eğrisi parametreleri (5-50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ aralığında) (n=6).....	66
Tablo 3.7.	Metanol ve su ortamında, Sibutramin için 217 nm'de Birinci Türev UV Spektroskopisi yönteminden elde edilen gün-içi ve günler-arası kesinlik değerleri (n=6).....	70
Tablo 3.8.	Metanol ve su ortamında, Sibutraminin 230 nm'de Birinci Türev UV Spektroskopisi yönteminden elde edilen gün-içi ve günler-arası kesinlik değerleri (n=6).....	71
Tablo 3.9.	Metanol ve su ortamında, Sibutraminin 223 nm'de İkinci Türev UV Spektroskopisi yönteminden elde edilen gün-içi ve günler-arası kesinlik değerleri (n=6).....	72

Tablo 3.10.	Metanol ve su ortamında, Sibutraminin 232 nm'de İkinci Türev UV Spektroskopisi yönteminden elde edilen gün-içi ve günler-arası kesinlik değerleri (n=6).....	73
Tablo 3.11.	Ticari kapsüllerden eklenen numuneler için 1.Türev UV-spektroskopik yöntemden elde edilen geri kazanım değerleri (n=6).....	76
Tablo 3.12.	Ticari kapsüllerden eklenen numuneler için 2.Türev UV-spektroskopik yöntemden elde edilen geri kazanım değerleri (n=6).....	77
Tablo 3.13.	Metanol ve su ortamında 217 nm'de Sibutramin içeren ticari preparatlar için 1.türev spektroskopi ile elde edilen istatistiksel veriler ( $\alpha=0,05$ , % 95 güvenle) (n=6).....	77
Tablo 3.14.	Metanol ve su ortamında 223 nm'de Sibutramin içeren ticari preparatlar için 2. türev spektroskopi ile elde edilen istatistiksel veriler ( $\alpha=0,05$ , % 95 güvenle) (n=6).....	78
Tablo 3.15.	İnternal standart analiz yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisi değerleri (1 ml internal standart çözeltisi ilavesiyle)....	79
Tablo 3.16.	İnternal standart analiz yöntemi ile elde edilen geri kazanım kalibrasyon eğrisi değerleri (1 ml internal standart çözeltisi ilavesiyle).....	80
Tablo 3.17.	İnternal Standart Analiz Yöntemi ile elde edilen geri kazanım değerleri (1 ml internal standart çözeltisi ilavesiyle)	81
Tablo 3.18.	Ticari kapsülden elde edilen değerler (1 ml internal standart çözeltisi ilavesiyle).....	83
Tablo 3.19.	Standart ekleme yöntemi ile elde edilen değerler (1 ml internal standart çözeltisi ilavesiyle).....	85
Tablo 3.20.	İnsan plazmasında internal standart analiz yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisi değerleri (1 ml internal standart çözeltisi ilavesiyle).....	86
Tablo 3.21.	İnsan plazmasında internal standart analiz yöntemi ile elde edilen geri kazanım kalibrasyon eğrisi değerleri (1 ml internal standart çözeltisi ilavesiyle).....	88

Tablo 3.22.	Plazmada internal standart analiz yöntemi ile elde edilen geri kazanım değerleri (1 ml internal standart çözeltisi ilavesiyle)	89
Tablo 3.23.	Plazmada ticari kapsülden elde edilen değerler (1 ml internal standart çözeltisi ilavesiyle).....	90
Tablo 3.24.	Plazmada standart ekleme yöntemi ile elde edilen değerler (1 ml internal standart çözeltisi ilavesiyle).....	91
Tablo 3.25.	UV ve HPLC yöntemleriyle ticari preparatlar için (15 µg ml <sup>-1</sup> ) elde edilen istatistiksel veriler ( $\alpha=0,05$ , % 95 güvenle) (n=6).....	92
Tablo 3.26.	UV ve HPLC yöntemleriyle ticari preparatlar için (15 µg ml <sup>-1</sup> ) elde edilen istatistiksel veriler ( $\alpha=0,05$ , % 95 güvenle) (n=6).....	92

## ÖZET

Anahtar kelimeler: Sibutramin, UV-Vis. Spektroskopi, Türev Spektroskopisi, Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi

Bu çalışma ile literatürde mevcut bulunan bazı Sibutramin miktar tayini yöntemlerine alternatif olarak yeni yöntemler geliştirilmiştir. Bu maksatla, Sibutramin etken maddesini içeren ticari bir ilacın (Reductil kapsül, 15 mg), farklı çözücü ortamlarında (metanol ve su), farmasötik preparatlarda (kapsül dozaj şeklinde) ve in-vitro olarak (canlı dışında) insan plazmasındaki miktar tayini için basit, hızlı, spesifik, kesin, tekrarlanabilir ve hassas UV-Vis. Spektrofotometri, Türev Spektrofotometrisi, DAD dedektörlü HPLC (Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi) yöntemleri geliştirilmiştir.

Geliştirilen analitiksel yöntemlerin hem farmasötik preparatlara hem de biyolojik sıvılara kolaylıkla ve başarılı bir şekilde uygulanması sağlanmıştır. Ayrıca geliştirilen yöntemlerin hem farmasötik preparatlarda hem de canlı dışındaki plazma düzeylerinin istatistiksel olarak karşılaştırılarak değerlendirilmesi için biyoanalitik yöntem validasyonu da yapılmıştır.

# **QUANTITATIVE DETERMINATION IN PHARMACEUTICAL PREPARATIONS AND BIOLOGICAL FLUIDS WITH SPECTROPHOTOMETRIC AND CHROMATOGRAPHIC METHODS OF AN ANTI-OBESITY DRUG**

## **SUMMARY**

Key Words: Sibutramine, UV-Vis. Spectrophotometry, Derivative Spectrophotometry, High Performance Liquid Chromatography

With this study, some new methods were developed as an alternative to quantification methods of sibutramine presented in the literature. For this purpose, the simple, rapid, specific, accurate, reproducible and sensitive UV-Vis. Spectrophotometry, Derivative Spectrophotometry, HPLC with DAD detector (High Performance Liquid Chromatography) methods were developed in different solvent media (methanol and water), in pharmaceutical preparations (capsule dosage forms) and in human plasma as in-vitro (live outside) for quantitative determination of a commercial drug (Reductil capsules, 15 mg) containing the active ingredient Sibutramine.

Developed analytical methods were applied easily and successfully both to pharmaceutical preparations and to biological fluids. Also bioanalytical method validation was achieved for comparison as statistical of developed methods both in pharmaceutical preparations and plasma levels in live outside.

## **BÖLÜM 1. GİRİŞ**

Obezite (şişmanlık), yaşam kalitesini ve süresini olumsuz yönde etkileyen kronik bir hastalık olup, gelişen dünyanın en önemli sağlık sorunlarından birisidir [1]. Yapılan araştırmalara göre, obezite özellikle son 20 yılda, bütün dünyada süratle artmakta ve bir salgın hastalık gibi yayılmaktadır. Bu salgından ülkemiz de oldukça fazla etkilenmektedir. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü'nün verilerine göre, Türkiye'de şişmanlığın görülme sıklığının son 10 yılda, kadınlarda % 65, erkeklerde ise % 30 oranında artış gösterdiği bildirilmiştir [2].

Obezite, kan basıncını ve kolesterolü yükselterek, kalp damar hastalıkları, felç, şeker hastalığı, bazı kanser türleri, solunum yetersizlikleri ile kemik ve eklem hastalıklarının ortaya çıkış hızını arttırmaktadır. Yaşam süresini kısaltan ve son yılların en popüler sağlık sorunu olan bu hastalığın önlenemediği sürece, sağlık üzerindeki etkilerinin ciddi boyutlara ulaşabildiği de açıktır. Obeziteyle baş etmek oldukça zor ve zahmetlidir. Fakat ilerleyici ve tekrarlayıcı olması açısından da mutlaka tedavi edilmelidir. Bazen tedavinin uzun yıllar hatta ömür boyu sürdürülmesi gerekebilmektedir. Bu nedenlerle hastalar için sayılamayacak kadar çok zayıflama yöntemi, ilaç ve bitkisel ürünler ortaya çıkmakta ve cerrahi müdahaleler önerilmektedir. Fazla kiloların tedavisinde kişiler, uzman tavsiyesi, egzersiz ya da düşük kalorili diyet ile yeterince kilo verememişlerse, zayıflamanın en kolay yolunu arayanların en çok başvurduğu ortak bir seçenek olarak, iştah azaltıcı etkilerinden dolayı antiobezite ilaçlarına yönelmektedirler. Bunun sonucu olarak da, zayıflama amaçlı bilinçsiz ilaç kullanımı, son yıllarda endişe verici boyutta giderek artmıştır. Maksimum terapötik etki sağlandığı zaman kilo kaybı durur ve ilaç kesildiğinde ise tekrar kilo alınır. Kilo kaybını sağlamak için kişinin aldığı enerji harcadığından az olmalıdır. Oysa tıpta, yaşam biçimini değiştirmenin yeterli olmadığı bazı hastalarda obezite için ilaç tedavisi önerilmektedir [3].



Günümüzde, obeziteyi önlemeye yönelik çeşitli ilaç araştırmaları yapılmaya devam etmektedir. Ancak bu çalışmalar, yan etkilerinin fazlalığı ve uzun dönemdeki etkilerinin bilinmemesi nedeniyle sınırlandırılmış bulunmaktadır. Öte yandan, bu konuda çeşitli etkilere sahip ilaçlar da geliştirilmeye devam etmektedir. Ancak bu ilaçların klinik kullanıma uygun hale gelebilmesi için uzun yıllara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmalardaki ana hedef, sadece kilo kaybı değil, aynı zamanda sağlıklı bir yaşam için olabilecek en ideal kiloya ulaşmak ve bu kiloyu korumaktır [4].

Piyasada, uzun dönem kullanım için lisans almış bazı obezite ilaçları mevcuttur. Bugün için piyasada FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından onaylanmış sadece iki ilaç (Orlistat ve Sibutramin içeren preparatlar) bulunmaktadır. Bunlar kesinlikle bir doktor tarafından ve reçeteli olarak verilmelidir [5]. İlaçların, diyet ve egzersiz yardımı olmadan kendi başlarına işe yaramayacaklarını da hatırlatmak gerekir. Ancak burada iki önemli sorun vardır; İlki, ilaç kullanımı kesildiğinde dikkat edilmez ise, verilen kilolar rahatlıkla geri alınmaktadır. İkincisi ise ilaç kullanımının bazı yan etkilerinin olmasıdır. Ancak bilinmesi gereken, % 5–10`luk bir kilo kaybının bile, kişinin sağlığını iyileştirebileceği ve riskleri azaltacağıdır [3].

### **1.1. Obezitede İlaç Tedavisi**

Tüm dünyada, değişik hastalıkların tedavi protokollerine ek olarak, günlük kilo kontrolünü desteklemek amacıyla, obezite hastalığına yakalanma riskinin azaltılması için çeşitli ilaçların kullanımıyla birlikte, antiobezite ilaçlarıyla ilgili araştırmalar da giderek yoğunluk kazanmaktadır.

Obezite ilaçlarından beklenen, alınan gıdayı azaltması veya enerji harcanmasını arttırmasıdır. Günümüzde enerji harcamasını arttıran ilaç mevcut değildir. Enerji alımını azaltan ilaçlar ise kabaca iki gruba ayrılabilir: santral etkili ve periferik etkili. Santral etkili olanlar sibutramin, rimonobant ve fentermindir. Periferik etkili olan ise orlistattır. Santral sinir sistemine etki ederek gıda alımını azaltan ilaçlar; periferik metabolizmaya etkili olan ilaçlardır [6].

Geçmişe nazaran günümüzde yaygın olarak karşılaştığımız sağlık sorunlarından biri haline gelen obezite hastalığı yüzünden kişiler bilinçli veya bilinçsiz olarak, meydana gelebilecek yan etkilerini düşünmeksizin Sibutramin gibi antiobezite ilaçlarını kullanmaktadırlar. Onay almış Sibutramin gibi ilaçların son yıllarda dünyada olduğu gibi ülkemizde de kullanımında ciddi artışlar olduğu bilinmektedir. Ancak, Sibutramin doktor reçetesi ile tıbbi kontrol altında kullanılması gereken bir ilaçtır. Çünkü uygun olmayan bir kullanım sonucu kalp ve damar sisteminde, gastro-intestinal sistemde, merkezi sinir sisteminde, deride, duyuşal organlarda ağır yan etkilere yol açabilmektedir. Kullanımı kontrol altında tutulan bir madde olan Sibutramin, özellikle başka ilaçlarla birlikte (bazı anti depresanlar, bazı migren ilaçları, öksürük, nezle tedavisinde kullanılan bazı ilaçlar v.s.) alındığında dikkatli ve hassas kullanılması gerekmektedir. Diğer ilaçlarda olduğu gibi, bu ilacın da kendine özgü birtakım özelliklerinden dolayı, emilimi kişiler arasında farklılıklar göstermektedir [7]. Bu sebeplerle hastaların kan seviyelerinin doğru analiz yöntemleri yoluyla belirlenmeleri gerekmektedir.

## **1.2. Obezite Tedavisinde Sibutramin**

Sibutramin, açlık duygusunu azaltmak üzere merkezi sinir sistemine etki eden kimyasal moleküllerden oluşmuş, kilo vermede, verilen kilonun korunmasında ve obezite tedavisinde kullanılan bir ilacın etken maddesidir. İlaçlarda, sibutramin hidroklorür monohidrat şeklinde kullanılmaktadır [8]. Açlığı ve enerji harcanmasını arttıran, serotonin ve norepinefrin inhibitörüdür. Ticari adı Amerika'da Meridia, Avrupa'da ve diğer ülkelerde ise Reductil'dir. Abbott Laboratuvarları tarafından üretilmektedir. Düşük kalorili bir diyetle birlikte kullanılmalıdır. Obezite tanısı için sıkça kullanılan beden kütle indeksi (BKİ), yani kilonuzun boyunuza oranı oldukça pratik bir yöntemdir (18–25 arası normal, 25–30 arası kilolu, 30 ve üzeri ise obez). Beden kütle indeksi (BKİ), 30 kg/m<sup>2</sup>'nin üzerinde olan hastalarda hipertansiyon, diyabet, dislipidemi gibi ek risk faktörlerinin varlığında Sibutramin önerilmektedir.

Tokluk hissini artırarak, gıda alımını azaltan Sibutramin, selektif serotonin ve noradrenalin reuptake inhibitörü olup sinaps boşluğunda bu iki nörotransmitter düzeylerinin artışına yol açar. Artan serotonin ile tokluk hissini uyarır. Diğer yandan

artan noradrenalin ile termogenezde artışa ve gıda alımında azalmaya yol açar. Yapılan çalışmalarda termogenez üzerine olan etkisi ile kilo kaybına bağlı olarak ortaya çıkan 24 saatlik enerji harcanmasındaki azalmayı sınırlandırdığı gösterilmiştir. Gastrointestinal sistemden iyi emilir (>% 85). Karaciğerden ilk geçişte Sitokrom P 450 3A4 enzimi ile büyük oranda metabolize olur ve farmakolojik etkisini gösteren iki metabolitine dönüşür. İdrarda inaktif glukoronidler olarak atılır.

Sibutramin, enerji alımında azalma ve enerji tüketiminde artış yoluyla anlamlı kilo kaybına yol açar ve etkisi doza bağlıdır. Günde bir kez sabah alınan 10 veya 15 mg'lık dozları, beraberinde uygulanacak düşük kalorili zayıflama diyeti ile efektif olur. Yapılan çeşitli çalışmalara göre, bir yıllık kilo kaybı ortalama % 6-10 arasında değişmektedir. Tedavideki bireylerin uyguladıkları düşük kalorili diyetle uyumu daha kolaylaşmaktadır. Diğer anorektik ajanlardan farklı olarak yemeğe başlamayı etkilemez, yani iştahı azaltmaz, doyumluk hissini öne alarak alınan gıda miktarını ve öğün sonrası atıştırmayı azaltır. Sabah alınan tek doz tüm gün boyunca öğünlerde ve öğün aralarında alınan kalori miktarını plaseboya göre anlamlı olarak daha fazla düşürmektedir [7].

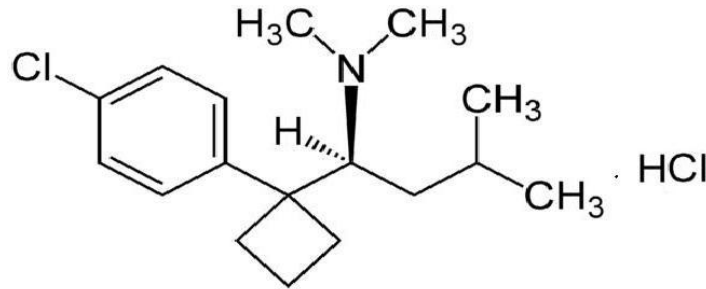
Plasebo, farmakolojik olarak etkisiz, fakat telkine dayalı ve 'plasebo etkisi' olarak da bilinen tedavi etkisini ortaya çıkaran bir tür ilaçtır. Vücuda ağız, burun veya enjeksiyon yolu ile verilebilir. Aslında plasebonun fiziksel anlamda tedaviye yönelik bir gücü yoktur. Sahip olduğu tedavi gücünü tamamen hastanın verilen ilacın "işe yarayacak" ilaç olduğunu düşünmesinden alır. Plasebo tıbbın bilimsel olarak açıklayamadığı bir yöne, 'insanların istemeleri halinde kendi kendilerini iyileştirme gücü'ne yöneliktir [9].

Sibutramin ile 24 haftada plaseboya göre önemli ölçüde kilo azalması olmaktadır. Başlangıca göre, % 5 kilo veren hasta oranı plasebo ile % 19,5 iken 10 mg sibutramin ile % 60, 15 mg sibutramin ile % 67,3 olmuştur. Sibutramin inilen kiloda kalmayı da sağlamaktadır. Storm çalışmasında, ilk 6 ayda kilo veren grup ikiye ayrılmıştır. Takip eden 18 ayda sibutramin olmaksızın diyet+egzersiz verilen grup, belirgin olarak geri kilo alırken, sibutramin+diyet+egzersiz verilen grupta bu oran düşük kalmıştır.

İlacın kullanımına bağlı yan etkiler % 3'den daha az olarak bildirilmiştir. Bunlardan ağız kuruluğu, konstipasyon ve uykusuzluk klinik kullanımda hekime en çok bildirilenlerdir ve yukarıdaki yan etkilerin çoğunluğu ilacı bırakmaya neden olmazlar. Parestezi, hemoroid agrevasyonu, terleme, anksiyete ve baş ağrısı yukarıdakilere ek olarak rastlanabilecek yan etkilerdir [10].

### 1.2.1. Sibutramin hidroklorür

(±)1-(4) klorofenil-N,N-dimetil-α (2-metilpropil)-siklo bütan metanamin hidroklorür monohidrat'ın kimyasal formülü  $C_{17}H_{29}Cl_2NO$ , moleküler ağırlığı ise 334,33 g dir. Sibutramin hidroklorürün yapısal formülü ise Şekil 1.1.'de gösterilmiştir [11].



Şekil 1.1. Sibutramin Hidroklorürün molekül formülü

### 1.2.2. Sibutramin'in farmokokinetik özellikleri

Sibutramin gastrointestinal sistemden hızlı emilir ( $t_{max}$  1,2 saat) ve karaciğerde kapsamlı bir ilk geçiş metabolizmasından geçerek, farmakolojik olarak aktif metabolitleri olan M1 (mono-desmetil) ve M2'yi (di-desmetil) oluşturur. Doruk plazma düzeylerine ( $C_{max}$ ) tek bir oral 20 mg sibutramin hidroklorür monohidrat dozundan 1,2 saat sonra ulaşır. Ana bileşiğin yarılanma ömrü ise, sırasıyla 14 ve 16 saattir.

Sibutramin, M1 ve M2 metabolitlerinin plazma proteinine bağlanması oranları sırasıyla; yaklaşık % 97, % 94 ve % 94'tür.

Sibutramin, sitokrom P450 (3A4) izoenzimi ile esas olarak karaciğerde desmetil metabolitleri olan M1 ve M2'e metabolize olmaktadır. Bu aktif metabolitler,

hidroksilasyon ve konjugasyon ile metabolize olarak farmakolojik inaktif metabolitlere (M5 ve M6) dönüşmektedirler. Lineer kinetikleri 10 ile 30 mg doz aralığında gösterilmiş olup eliminasyon yarılanma ömürlerinde doza bağlı değişimler yoktur. Ancak plazma konsantrasyonlarında doza bağlı artış görülür. Tekrarlanan dozlar verildiğinde, M1 ve M2 metabolitlerinin kararlı-durum konsantrasyonlarına, yaklaşık 2 katı bir birikmeyle 4 günde ulaşılır.

Sibutramin ve metabolitlerinin obez kişilerdeki farmakokinetiği normal kilolu kişilerdekine benzerdir. Şimdiye kadar elde edilen oldukça sınırlı veriler, erkeklerdeki ve kadınlardaki farmakokinetik bulgular arasında klinik önemi olan bir fark bulunduğuna dair kanıt sağlamamıştır. Sağlıklı yaşlı kişilerde (ortalama 70 yaş) gözlemlenen farmakokinetik profil, sağlıklı gençlerde görülene benzemektedir. Orta dereceli hepatik yetmezliği olan hastalarda, tek doz Sibutraminden sonra aktif metabolitlerin biyoyararlanımı % 24 daha yüksektir.

Hepatik metabolizma, Sibutramin ve aktif M1 ve M2 metabolitlerinin majör eliminasyon yoludur. Diğer (inaktif) metabolitler primer olarak idrar yoluyla atılır.

### **1.2.3. Endikasyonları**

Sibutramin, kilo verme ve verilen kilonun korunmasını içeren obezite tedavisi için endikedir ve düşük kalorili bir diyetle birlikte kullanılmalıdır. Beden kitle indeksi (BKİ)  $\geq 30 \text{ kg/m}^2$  olan veya beden kitle endeksi  $\geq 27 \text{ kg/m}^2$  olan hastalarda, ek risk faktörlerinin varlığında (örn. hipertansiyon, diyabet, dislipdemi gibi) önerilmektedir.

### **1.2.4. Kontrendikasyonları**

Sibutramin aşağıdaki durumlarda kontrendikedir:

Sibutramin hidroklorür monohidrat veya ürünün bileşimindeki diğer bir maddeye karşı bilinen aşırı duyarlılıkta,

- Majör bir yeme bozukluğu hikâyesi veya varlığında,

- Eş zamanlı Monoamin oksidaz inhibitörlerinin (MAOI) kullanımında, (Sibutramin tedavisine başlamadan en az iki hafta önce MAOI kesilmiş olmalıdır.)
- Merkezi etkili diğer zayıflama ilaçlarının eş zamanlı kullanımında,
- Anoreksiya nervosa mevcudiyeti olan hastalarda [10].

### **1.3. Biyoyararlanım ve Biyodeşdeğerlik**

Biyoyararlanım çalışmaları, ilacın ne kadarının dolaşıma geçtiğinin, dolaşıma geçme hızı ve derecesi ölçülerek deneysel olarak verilmesi ile sağlanır [12]. İlaç endüstrisi, ilaç üretme faktörlerini kontrol etmeye çalışarak, aynı ilacın aynı formülasyonunda her zaman aynı biyoyararlanım oranları vermesini sağlamak zorundadır. Formülasyon değışikliklerinde ise yeni ilacın etkin ve güvenilir olduğunun ispatlanması gerekmektedir. Bir ticari preparatın içindeki maddelerin özelliklerinin tam olarak belirtilmesi preparatların uniform olmalarını sağlar. Bu ilaçların düzgün yapılması, farklı firmaların aynı ürünleri arasındaki farklılıkları ve bir firmanın ürününde bulunan kutular arasındaki farklılıkları en aza indirir. Biyoyararlanım çalışmalarında genellikle hedef, aktif maddenin etki bölgesine ulaşma zamanı ve miktarını, kan düzeyini ölçerek tespit etmektedir. İmal edilmiş çeşitli dozaj şekli ürünlerinin in vivo ortamda izlenerek, amacına uygun biyolojik etki gösterdiklerinin kanıtlanması gerekmektedir. Aslında hasta kimyasal madde kullanamaz, mutlaka bir dozaj şekli kullanır. Dolayısıyla, etkin maddelerin değil, ancak dozaj şekillerinin biyoyararlanımından söz edilebilir. Etkin maddelerin belirli yardımcı maddelerle karıştırılması işlemi, belirli formüllere göre yapılmaktadır. Böylece etkin maddelerin uygun formülasyonlarla hastalara kolayca uygulanabilen özel sunum şekillerine de dozaj şekli denilmektedir. Bunlara örnek olarak; tablet, kapsül, şurup, merhem, transdermal yama vb verilebilir [13, 14].

Bazen yeni piyasaya çıkan ürünlerin kan düzeyleri eskilerine göre farklı olabilir. Bu ilaçların etkilerinin beklentilere uygun olması için, yeniden formüle edilip içerisindeki etken madde miktarının değıştirilmesi gerekir. Bazı durumlarda da iki kapsül yerine aynı miktarda etken madde içeren tek tablet gibi değışiklikler olabilir. Bu durumlarda da biyodeşdeğerlik çalışması yapılması gerekmektedir. İlaç ürünlerindeki küçük değışiklikler istatistikî açıdan önemlidir ve iyileştirici cevapta

küçük farklılıklar doğurabilirler. İlacın içindeki bir boya ya da katkı maddesi değiştirilmiş de olabilir. Bunun için de bir in-vitro testi yeterli olacaktır. Bazı ilaçlarda da yeni veriliş yolları geliştirildiğinde, yeni formülasyonun klinik etkinliğinin gösterilmesi gerekmektedir. Aynı zamanda ilaçlarda ruhsatlandırma yapılırken, etkinlik ve güvenilirliğin kanıtlanabilmesi için klinik öncesi ve klinik çalışmaların da tamamlanmış olması istenir. Böylelikle bu klinik çalışmalar ile hastane ve poliklinik gibi topluma sağlık hizmeti veren yerlerde, hizmet kalitesi ve hastaların tedavi şansı artarak, sonuçta yan etkilerin sıklığı da minimuma indirilmiş olur.

Teknoloji ve bilimdeki gelişmelere bağlı olarak ilaç araştırmaları kapsamında, tıbbi ve biyolojik numunelerde bulunan eser düzeydeki maddelerin tayin edilebilmeleri ve yeni ilaç etken maddeleri geliştirmenin yanı sıra yeni tayin yöntemlerinin de geliştirilmesine de ihtiyaç duyulmaktadır. Buna bağlı olarak, yeni ilaç miktar analizi yöntemlerinin de geliştirilmesi, analitik kimyadaki son araştırma konuları arasında yer almaktadır. Bu yöntemlerin genel amacı, önerilen ilacı alan bir hastanın gerçekten önerilen ilacı, önerilen dozda ve önerilen sınırlar içerisinde aldığından emin olmaktır. Aktif ilaç bileşeninin vücut sıvılarında veya çıkış ürünlerindeki konsantrasyonunu, uygun kesinliğe sahip olarak ve yeterli duyarlılıkta ölçtüğünün de deneysel olarak gösterilmesi gerekmektedir. Uygulanan analitik yöntemlerle ilaç, yeterli duyarlılık, özgünlük, doğrusalık, geri kazanım, doğruluk ve kesinlik bakımlarından tam olarak valide edilmiş uygun bir yöntem kullanılarak valide edilmelidir [15].

#### **1.4. Validasyon**

Validasyon, bir ürünün veya analitik yöntemin, arzu edilen ürün veya analitik yöntemine uygun sonuç alma süreci ya da ürünleri değerlendirme prosesi veya ürünleri garantiye almak için analitik yöntem veya yöntem gereksinimi olarak tanımlanabilir. İşlemden emin olmak için cihaz veya analitik yöntemin düzgünlüğünü, doğruluğunu ve kesinliğini tasarlamak için validasyon yapılır. Valide edilmiş yöntemin hedefi, bu yöntemle yapılmış sonuçlara güvenilirlik sağlamaktır. Kullanılan yöntemin rutin kullanımına geçmeden önce, valide edilmiş bir yöntemde

değişiklik yapılacaksa veya orijinal yöntemin dışına çıkıp değişiklikler yapılacaksa, mutlaka yöntem validasyonu yapılmalıdır [16].

Bir ticari preparatın içindekilerin özelliklerinin belirtilmesi, preparatların üniform olmalarını sağlar. Bu işlemin düzgün yapılması, farklı firmaların aynı ürünleri arasındaki farklılıkları ve bir firmanın ürününde kutular arasındaki farklılıkları en aza indirmektir. Ayrıca test edilen bir preparattaki katkı maddesi, o ilacın jenerik formunu kullanan bir hastada teorik olarak bir problem oluşturabilir. Bu bakımlardan da validasyon işlemi yapmak faydalı olmaktadır [15].

Bir biyoyararlanım ve biyoeşdeğerlik çalışması, iyi laboratuvar uygulamalarına bağlı kalınarak yapılmalıdır. İyi laboratuvar uygulamaları; laboratuvar çalışmalarının planlanması, yürütülmesi, izlenmesi, kaydedilmesi, rapor edilmesinde uygulanan organizasyonla ilgili yöntemleri, işlemleri ve koşulları belirleyen standartlardır. İyi laboratuvar uygulamalarına bağlı kalınarak yapılan biyoyararlanım ve biyoeşdeğerlik çalışmalarında, analitik yöntemin kabul edilebilirliğini sağlayan ve validasyon parametreleri denilen aşağıdaki kabul kriterlerine de titizlikle uyulmalıdır [17]:

1. Kararlılık
2. Doğrusallık
3. Doğruluk
4. Kesinlik
5. Duyarlılık
6. Özgünlük, belirleyicilik
7. Tutarlılık

Kararlılık; Analitin biyolojik matriks içinde, amaçlanan saklama ısısındaki dondurma veya çözme dönemlerinin etkisinde, oda ısısında ve diğer çevresel faktörlerin etkisindeki stabilitesidir.

Doğrusallık; Ortaya konulan analitik işlemin doğrusallığı, belirli sınırlar içinde numunedeki analit miktarı (konsantrasyon) ile deneysel cevap arasında doğrusal sonuçların alınma özelliğidir [16].



Uygun konsantrasyon aralığı seçilerek, cihaz cevabının (y), analitik konsantrasyonuna karşı (x) grafiğe geçilmesiyle doğrusal bir ilişki elde edilir [17]. Böylece hazırlanan standart kalibrasyon eğrisi üzerinde, gösterilen doğrusal ilişkiyi bulmanın en yaygın yolu, en küçük kareler yöntemidir (regresyon denklemi).  $y=mx+b$  ile verilen bu doğru denkleminde m ile doğrunun eğimi, b ile de kesim noktası bulunabilir [18]. En küçük kareler yöntemiyle elde edilen regresyon katsayısı  $r^2 \geq 0,95$  olmalıdır. Standart eğri, 5-8 standart nokta içermeli ve tekrarlanabilir olmalıdır. Analiz yöntemi ile geri kazanılmış ilaç miktarının, örnekte bulunan gerçek ilaç miktarına oranı da doğrusal olmalıdır [15].

Doğruluk; Sonuçların gerçek değere yakınlığını gösteren analitik işlemdir. Mutlak hata veya bağıl hata terimleriyle açıklanır. Gerçek değerden sapma, doğruluğun ölçümü olarak verilir. Az sayıda tekrar analiziyle elde edilen veri takımının ortalamasının (veya orta değer,  $X_{ort}$ ) mutlak hatası:

$$E_a = X_{ort} - X_1 \quad (1.1)$$

eşitliği ile gösterilir. Numune ortalaması  $X_{ort}$  olan sınırlı bir veri takımının aritmetik ortalamasıdır. Orta değer, gerçek değer % 15'i içinde olmalıdır.  $X_1$ , ölçüm sonucu elde edilen büyüklüğün kabul edilen değeridir. Mutlak veya bağıl hataların önüne yazılan işaret eğer pozitifse, onun gerçek değerinden büyük olduğunu, işaret negatifse de bunun tersi olduğunu gösterir. Genellikle doğruluk, aşağıdaki denklemde olduğu gibi, bağıl hata ile gösterilir [18].

$$B. \text{ Hata} = \frac{X_{ort} - X_1}{X_1} \cdot \% 100 \quad (1.2)$$

Kesinlik; Bir yöntemin birbirini takip eden ölçümleri arasındaki yakınlığın derecesini ifade eder [15]. Aynı şartlarda ve aynı yöntemle elde edilen sonuçların yakınlığını, diğer bir değişle ölçümlerin tekrarlanabilirliğini göstermek için kullanılır. Kesinlik; tekrarlanabilirlik, ara kesinlik ve kopyalanabilirlik olmak üzere 3 basamakta incelenmektedir.

Analitik bir işlemin veya ölçümün kesinliği ise yaygın olarak üç farklı terimle ifade edilmektedir. Mutlak Standart Sapma (SD), Bağlı Standart Sapma (RSD) ve Varyans veya Varyasyon Katsayısı (CV). Bu terimlerin hepsi ortalamadan sapmanın bir fonksiyonudur ve:

1. Kısa bir zaman aralığında ve aynı şartlarda yapılan işlemdeki doğruluğu,
2. Değişik gün, operatör ve cihazda yapılan deneyin sonuçlarının kesinliği,
3. Laboratuvar arası yapılan deneylerin kesinliği göstermektedir [16].

Bir analitik yöntemin kesinliği, ölçümlerin tekrarlanması suretiyle kolaylıkla bulunabilir. Tekrarlanabilirlik, aynı yöntem, aynı analist, aynı alet, aynı laboratuvar ve kısa sürede sağlanabilir. Kesinlik tayininde de homojen ve orijinal bir numune kullanılmalıdır. Sistemin kesinliği, aynı konsantrasyonda standart çözeltiden alınan 6 örnek ile arka arkaya ölçüm yapılarak bulunur. Okunan cevaplar için  $X_{ort}$ , SD ve RSD (CV) değerleri hesaplanır [19].

Numune Standart Sapması olan SD:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - X_{ort})^2}{N-1}} \quad (1.3)$$

bağıntısı ile Bağlı Standart Sapma, RSD:

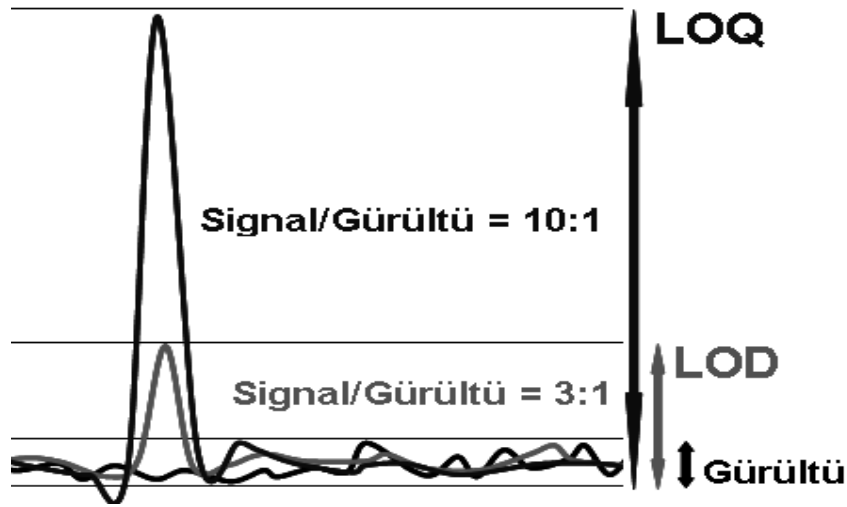
$$RSD = \frac{SD}{X_{ort}} 10^z \quad (1.4)$$

Bağıntısı ile verilir.  $z=2$  olduğunda RSD % olarak verilir ve bu da Varyasyon Katsayısı, CV olarak adlandırılır [18]:

$$CV = \frac{SD}{X_{ort}} \%100 \quad (1.5)$$

Biyolojik matriks içinde, uygun konsantrasyon aralığında hazırlanan standartlar birkaç deneyde, bir gün içinde veya farklı günlerde analiz edilir ve her gün için ayrı regresyon denklemi çıkarılır. Gün-içi için uygun konsantrasyon aralığında hazırlanan standartlar, tek bir deney içindeki örnek halinde tayin edilir. Günler-arası kesinlik için de uygun konsantrasyon aralığında hazırlanan standartların birkaç deneyde (farklı günlerde), tek bir defa analizi ile tayin edilir. Gün-içi ve günler-arası kesinlik, tüm deney ve her bir konsantrasyon için SD ve RSD (CV)  $\leq$  %15 olmalıdır [19].

Duyarlılık; Bir cihazın veya bir yöntemin duyarlılığı, bir analit derişimindeki küçük farkları ayırt edebilme kabiliyetinin bir ölçüsüdür. Ya da analitik yöntemin düşük konsantrasyonları saptayabilme yeteneği de denilen standart eğrinin eğimidir. Bir analitik yöntemde, Miktar tayin limiti (Limit of Quantitation, LOQ), numune içindeki analitin uygun kesinlik ve doğruluk ile miktar tayini yapılabilecek en düşük miktardır [16]. Kalibrasyon eğrisi üzerinde, kabul edilebilir doğruluk ( $\pm$  % 20), kesinlik (RSD < % 20) ve değişkenlik ve ölçülebilecek en küçük konsantrasyon olarak tespit edilmektedir. Standartlardan en az 5 örnek kullanılarak tayin edilir. Teşhis limiti (Limit of Detection, LOD) ise körden % 95 olasılıkla ayırt edilebilecek en küçük konsantrasyondur [15]. Ya da belirli bir analitik işlemin teşhis limitine, numune içindeki analitin teşhis edildiği miktardır da denilebilir. Burada bileşimin teşhisi yapılabilir, ancak bu miktar kantitatif analiz için yeterli olmayabilir. LOD için tipik olarak kabul edilebilen değer, gürültü seviyesinin 3 katıdır. S/G oranı, analit ile ilgili bilgiyi taşıyan sinyal S ve cihazdan gelen elektronik gürültü G'yi mukayese eder. LOD, S/G oranı, 3'e yaklaşan kadar seri olarak seyreltilmiş numuneler test edilerek belirlenebilir [16].



Şekil 1.2. Miktar tayin limiti (Limit of Quantitation, LOQ) ve Teşhis limiti (Limit of Detection, LOD)

Kalibrasyon eğrisine dayanarak bu eğriye karşılık gelen standart sapma ve eğimi kullanılarak Miktar Teşhis limiti ve Miktar tayin limiti hesaplanabilir [20]:

$\sigma$  = Kalibrasyon eğrisine dayanan standart sapma

S = Kalibrasyon eğrisine dayanan eğim

$$\text{LOD} = \frac{3\sigma}{S} \quad (1.6)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10\sigma}{S} \quad (1.7)$$

Özgünlük; Analitik yöntemin sadece amaçlanan bileşen veya bileşenleri tayin edebilme yeteneğidir [15]. Sadece tek bir analite cevap verecek bir yöntem için belirleyicilik, birden fazla analite cevap verecek bir yöntem için ise seçicilik olarak tanımlanır. Analitik teşhisin yapıldığından, analitik yöntemin analitin taşıdığı safsızlıkları tam olarak belirlendiğinden, ortaya konulan analitik yöntemin numune içinde bulunan analitin durumunu ve miktarını belirleyici olduğundan tam olarak emin olunmalıdır [16].

Tutarlılık; Yöntemin farklı deney şartlarında (farklı alet, farklı analist ve farklı laboratuvar gibi) tekrarlanması ile kabul edilebilen sonuç elde edilebilmesidir.

Kesinlik deneyleri, başka bir analist, başka bir alet ile başka bir laboratuarda tekrarlanarak, SD ve RSD değerleri ile tekrar uygulanabilirlik kontrol edilmelidir [15].

Bir analitik yöntemde, geri kazanım ve ekstraksiyon verimliliği ise numune işlemlerindeki kayıpları vermektedir. Geri kazanım, bir analitiksel yöntemin ekstraksiyon verimiyle yakından ilgilidir. Gaz kromatografisi (GC) veya yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) gibi yöntemlerde, ilacın her bir standart konsantrasyonunda, ekstrakte edilmemiş numunelerde ekstrakte edilen numunelerin pik yükseklikleri veya alanları mukayese edilerek mutlak iyileşme bulunur. Bu iyileşmenin tercihen % 75 civarında olması kabul edilebilir, fakat % 60 veya daha düşükse, ekstraksiyon işlemi tekrarlanmalıdır.

$$\text{Analitiksel İyileşme} = \frac{\text{Bulunan Miktar}}{\text{İlave Edilen Miktar}} \cdot \% 100 \quad (1.8)$$

Plazma ekstraksiyonu gibi bir temizleme adımıyla da, test ilacının beklenen alıkonma zamanında gözlemlenen ilaç piki hariç, başka istenmeyen pikler ortadan kaldırılabilir. Biyolojik numuneler için yapılan ekstraksiyon işlemi, diğer ilaçların varlığı, biyoakışkanların yapıtaşları, katkı maddeleri, safsızlıklar ya da bozunma ürünleri gibi potansiyel olarak girişim yapabilen maddelerin varlığında, sadece ilgili bileşiği belirlemek için uygulanan bütün işlemleri kapsamaktadır [21].

Aktif ilaç bileşenlerinin vücut sıvılarındaki konsantrasyonunu ölçmede kullanılan analitik yöntemin doğruluğunun ve bu aktif bileşenlerin vücutta eriştiği gerçek konsantrasyonu uygun kesinliğe sahip olarak ve yeterli duyarlılıkta ölçtüğünün deneysel olarak gösterilmesi gerekmektedir.

Rutin ilaç imalatında seriler arasındaki kalite kontrolü çalışmalarında, in-vitro tayin yöntemleri kullanılmakta ve böylece seriler arasında farklılıklar olup olmadığı araştırılmaktadır. Bu kalite kontrol testlerinin özenle ve dikkatli yapılması gerekmektedir. Aksi halde iyi hazırlanmayan formülasyonlar ortaya çıkabilir. in-vitro (canlı dışında) testler, in-vivo (canlıda) testlere model oluşturmak için yapılmaktadırlar. İlaç formüllerinde bir değişiklik yapılmadığı sürece, in-vitro bulgular kalite kontrolü çalışmaları için yeterlidir.

Literatürde biyolojik numunelerde ve farmasötik preparatlarda Sibutraminin kalite kontrolü maksadıyla yapılmış, spektrofotometrik ve kromatografik çeşitli miktar tayini çalışmalarına rastlanılmıştır.

Bunlardan ilki; Maluf et al. tarafından yapılmış olan, Sibutramin Hidroklorür monohidrat kapsüllerinde UV-Vis. Spektrofotometresi ile bir miktar tayini çalışmasıdır. 5-30  $\mu\text{g ml}^{-1}$  analitiksel aralıkta çalışılmış, 0,9997 korelasyon katsayısıyla bir lineerlik elde edilmiş ve 1,4359 RSD ile tekrarlanabilirliği gösterilmiştir. Doğruluk % 102,2-99,1 aralığında bulunmuş ve yöntem üzerinde validasyon çalışması da yapılmıştır [22].

Diefenbach et al. tarafından, Sibutramin kapsüllerinde 223 nm'de metanol ve su çözücü ortamlarında bir UV Spektrofotometresi çalışması yapılmıştır. 6-16  $\mu\text{g ml}^{-1}$  konsantrasyon aralığında çalışılmış ve yöntem valide edilmiştir [23].

Bir GC-MS çalışmasında ise, 10 mg Sibutramin Hidroklorür içeren tek bir Reductil ticari tableti gönüllülere tatbik edildikten sonra Sibutraminin idrar metabolitleri analiz edilmiştir [24].

Rossi et al. tarafından, içinde Sibutramininde bulunduğu 19 farklı antidoping ilacı ve bunların metabolitleri, idrar ve tükürükte GC-MS ile analiz edilmiştir. 1-200  $\text{ng ml}^{-1}$  aralığında çalışılmış ve yöntem validasyonları gerçekleştirilmiştir [25].

Ding et al. tarafından, Sıvı Kromatografisi-Elektrosprey İyonizasyonu-Mass Spektrometre ile insan plazmasında Sibutraminin ve onun N-desmetil metabolitlerinin miktar tayini için yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Ters faz  $\text{C}_{18}$  kolonda, 10 mM amonyum asetat tamponu (pH: 3,5)- metanol (25:75) karışımını içeren mobil fazda analiz edilmiş, sağlıklı gönüllülerde bu yöntemin klinik uygulamaları başarı ile sağlanmıştır [26].

Chen et al. tarafından, Sibutraminin aktif metabolitinin Sıvı Kromatografisi-Elektrosprey İyonizasyonu-Tandem Mass Spektrometresi ile belirlenmesi için bir

ODS MS kolonu kullanarak, 0,3 ml dk<sup>-1</sup> akış hızında, asetonitril-triflorasetikasit (55:45) mobil fazı içerisinde yeni bir yöntem geliştirmişlerdir [27].

Segall et al. tarafından, ters faz C<sub>18</sub> kolonda, pH 4,5'da metanol:su:triethylamin (80:20:0,3) mobil fazıyla, 1,1 ml dk<sup>-1</sup> akış hızında ve 225 nm'de HPLC-UV belirlenmesi ile yeni bir yöntem geliştirilmiştir. 30-96 µg ml<sup>-1</sup> aralığında çalışılmış ve eksternal standart yöntemi kullanılmıştır. Yöntem, asit, baz, su, oksidatif, termal ve fotokimyasal ortamlarda Sibutramin Hidroklorürün zorunlu bozunmasıyla kararlılık göstererek valide edilmiştir [28].

Jain et al. tarafından, insan plazmasında Sibutramin ve onun primer ve seconder amin metabolitlerinin Sıvı Kromatografisi-Elektrosprey İyonizasyonu-Tandem Mass Spektrofotometresi ile yeni bir yöntem geliştirilmiş ve valide edilmiştir [29].

Bhatt et al. tarafından, insan plazmasında Sibutraminin aktif metabolitlerinin belirlenmesi için Ters-faz Sıvı Kromatografisi- Tandem Mass Spektrofotometresi ile yeni bir yöntem geliştirilmiştir. C<sub>8</sub> ters-faz kolonu kullanılmış, alıkonma zamanı 1,51 dk olarak tespit edilmiştir. M1 ve M2 için regresyon katsayıları ise  $\geq 0,9990$  olarak bulunmuştur. Geri kazanımlarına bakıldığında, M1 için % 93,5 ve M2 için ise % 77,9 ve kantitatif alt tayin limitleri de M1 için 0,1 ng/mL ve M2 için 0,2 ng/mL olarak kaydedilmiştir [30].

Yine yapılmış bir başka çalışmada, izokratik HPLC-UV sisteminde sodyum dihidrojen fosfat ve asetonitril mobil faz karışımı ile 1 ml dk<sup>-1</sup> akış hızında 230 nm'de sibutramin miktar tayini yapılmıştır. RSD değerleri % 2 nin altında bulunulmuştur. [31]

Huang et al. tarafından, kilo kontrolünde diyet tamamlayıcı olarak Sibutramin ve N-di-desmetil Sibutraminin eş zamanlı belirlenmesi HPLC-UV-ESI-MS ile yapılmıştır. Mobil faz olarak asetonitril ve 20 mM amonyum asetat içeren sulu % 0,2'lik formik asit tampon çözeltisi ile gradiyent modda çalışılmıştır. UV belirlenmesi 223 nm'de yapılmış, 0,025-1,00 mg ml<sup>-1</sup>'de kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur [32].

Um et al. tarafından, Sibutraminin fare serumunda miktar analizi gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak metanol:asetonitril:amonyum fosfat (8,3:4,5:87,2) (pH:6,0) tampon çözelti karışımı kullanılarak, 223 nm'de yeni bir column-switching HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Sibutraminin M1 ve M2 aktif metabolitleri ise aynı kolonda kolaylıkla ayrılmıştır [33].

Yapılmış bir başka HPLC ters faz yöntemi çalışmasında da, kapsül dozaj formlarındaki Sibutramin Hidroklorürün miktar tayini için yeni bir yöntem geliştirilmiş, alıkonma zamanı 6,18 dk ve akış hızı 1 ml dk<sup>-1</sup> olarak tespit edilmiştir. LOD değeri, 0,09 µg ml<sup>-1</sup> ve LOQ değeri ise 0,26 µg ml<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur [34].

Radhakrishna et al. tarafından, Sibutramin hidroklorürün saflığını ve onun enantiyomerlerini ayırmak için kiral kromatografi ile ters faz HPLC yöntemi kullanılmıştır. 4-kloro anilin ve lovastatin internal standartları kullanılarak, oldukça iyi kesinlikler elde edilmiştir. İki izokratik sıvı kromatografisi yöntemi, F testi ile karşılaştırılmıştır. % 1,3'den daha küçük RSD değerleri elde edilmiştir [35].

Bu çalışma ile literatürde mevcut bulunan bazı Sibutramin miktar tayini yöntemlerine [22-35] alternatif olarak yeni yöntemler geliştirilmiştir. Bu maksatla, Sibutramin içeren ticari bir ilacın (Reductil kapsül, 15 mg), farklı iki çözücü ortamında (metanol ve su) standart stok çözeltileri oluşturularak, bu stok çözeltilerden bir seri standartlar hazırlanmış ve kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. Farmasötik preparatlarda (kapsül dozaj şekillerinde) ve in-vitro olarak (canlı dışında) insan plazması numunelerinde üzerlerine spike edilerek (şırınga ile üzerine katarak) yapılan Sibutraminin bu yeni miktar tayini çalışmaları için basit, ekonomik, hızlı, kesin, spesifik, tekrarlanabilir ve hassas UV ve Türev Spektroskopisi ve ayrıca DAD dedektörlü Ters faz-HPLC (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi) yöntemleri geliştirilmiştir. Daha sonra geliştirilen yöntemlerin plazma düzeylerinin istatistiksel olarak karşılaştırılarak değerlendirilmesi için de, biyoanalitik yöntem validasyonu yapılmıştır. Geliştirilen yöntemlerden Türev Spektroskopisi yöntemi literatürdeki ilk çalışmadır. Ayrıca bugüne kadar literatürde, HPLC ile hem internal standart hem de DAD dedektörü kullanılarak yapılmış bir çalışmaya da rastlanılmamıştır.



## **BÖLÜM 2. MATERYAL VE YÖNTEM**

### **2.1. Materyaller**

#### **2.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler**

Sertifikalı saf Sibutramin standardı, tüm testleri yapılmış olarak (saflık, erime noktası, çözünürlük v.s.) Türkiye'deki Fargem A.Ş.'den ve Sibutramin içeren 15 mg'lık ticari Reductil kapsülleri ise Abbott İlaç firmasının Türkiye distribütöründen temin edilmiştir. Spektroskopik yöntem için; Analitik grade-Merck metanol, deiyonize su kullanılmıştır. Kromatografik yöntem için de ise; HPLC grade-Merck metanol, asetonitril ve deiyonize su kullanılmıştır. Plazma çalışmalarında kullanılan insan plazması numunesi ise sağlıklı bir gönüllüden temin edilmiştir.

#### **2.1.2. Kullanılan cihazlar**

UV spektroskopik çalışmalar için; bir LG Computer'e ve HP Deskjet yazıcıya ve Momentum SVC-1000 regülatöre bağlı, 10 mm'lik kuartz hücrelere sahip, Shimadzu marka UV-2401 PC model UV-Vis. Recording Spektrofotometre kullanılmıştır.

HPLC çalışmaları için de; bir Samsung Computer'e, FCM güç kaynağına bağlı, SIL-20A HT Prominence Auto Sampler, SPD-M20A Prominence DAD dedektör, LC-20 AD Prominence Liquid Chromatography, DGU-20 A<sub>5</sub> Prominence degaser, CTO-10AS VP Column Oven'dan ve LC Solution programından oluşan SHIMADZU marka HPLC sistemi kullanılmıştır.

Bütün bu cihazların yanı sıra, buzdolabı (Arçelik), hassas terazi (AND GR-200), vorteks karıştırıcı (Votex 2 GENIE), vakum pompası (Rocker 300) , 0,45 µm selüloz nitrat membran filtre (Sartorius Stedim Biotech), pH metre (HANNA), santrifüj

(nüve-NF200, ROTINA 420-Hettich), otomatik pipet (BIOHIT PROLINE), etüv (nüve-FN 120), Ultrasonik banyo (Bandelin Sonorex) 12x32 mm 2 ml silikon septum kapaklı autosampler cam vial kiti (National Scientific CERT4000), Inertsil ODS-2 GL Sciences Inc. 5 µm (4,6x150 mm) <sup>18</sup>C-ters-faz kolonu ve plastik vial filtreleri (CHROMACOL) kullanılmıştır.

## **2.2. Yöntemler**

### **2.2.1. Spektroskopik yöntem**

Spektroskopi, bir örnekteki atom, molekül veya iyonların, bir enerji düzeyinden diğerine geçişleri sırasında absorplanan veya yayılan elektromanyetik ışımının ölçülmesi ve yorumlanmasıdır.

Elektromanyetik ışımaya, uzayda çok büyük hızla hareket eden bir enerji türüdür. Elektromanyetik ışımının en çok karşılaşılan türleri, gözle algıladığımız görünür ışık ve ısı şeklinde algıladığımız infrared ışınlarıdır.

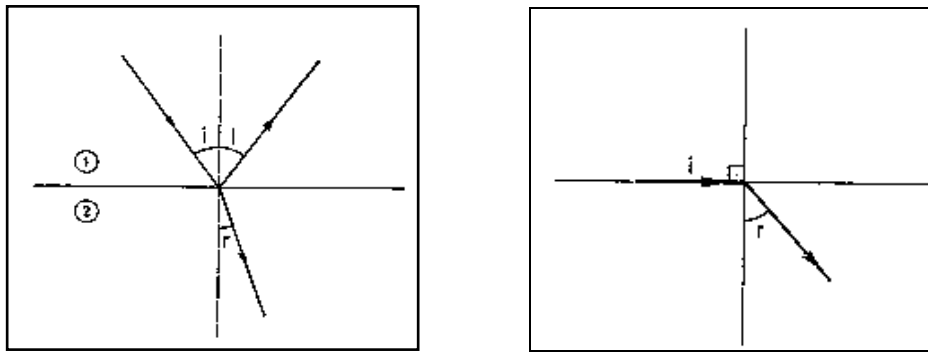
Elektromanyetik ışımaya, hem dalga hem tanecik özelliğine sahiptir. İnterferans (girişim) ve difraksiyon (kırınım) davranışları dalga özelliğiyle açıklanır. Bir metal yüzeyinden ışımaya ile elektronların koparılması (fotoelektrik olay), ışımaya enerjisinin bir madde tarafından absorpsiyonu (soğurulması) ve emisyonu (yayılması) olayları ışımının tanecik özelliği (foton) ile açıklanır.

#### **2.2.1.1. Elektromanyetik ışımaya-madde etkileşimleri**

- Işımanın kırılması ve yansımaları
- Işımanın saçılması
- Işımanın polarizasyonu
- Işımanın absorpsiyonu ve emisyonu

### 2.2.1.1.a. Işımanın kırılması ve yansıması

Işıma bir ortamdan ikinci bir ortama geçtiğinde kısmen yansır, kısmen de ikinci ortama geçer. İkinci ortamda ilerleyen ışımının frekansı değişmez, ilerleme yönü ve hızı değişir. Işık demetinin bir ortamdan yoğunluğu farklı başka bir ortama geçerken yön değiştirmesine kırılma (refraksiyon) adı verilir. Kritik açının ölçülmesiyle her madde için farklı kırılma indisi belirlenmiştir.



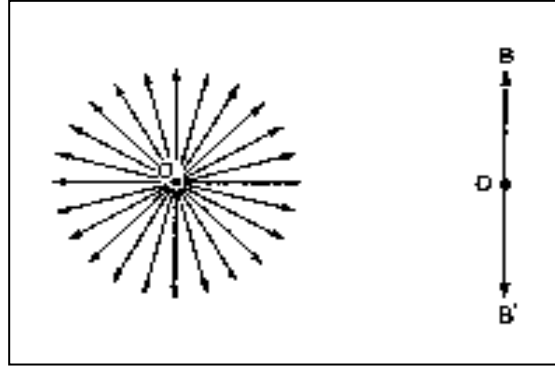
Şekil 2.1. Işığın kırılması ve yansıması

### 2.2.1.1.b. Işımanın saçılması

Fotonun örnekteki parçacıklara çarparak yön değiştirmesine saçılma adı verilir. Görünür bölge ışımaları kullanıldığında, kolloidal ve bulanık çözeltilerde gözlenen saçılma, Tyndall saçılmasıdır. Çözünmüş moleküller veya çok atomlu iyonlardan saçılma Rayleigh saçılmasıdır. Parçacıklarla etkileşen dalga boyunun, ışığı saçan moleküllerin titreşim enerji düzeylerine göre değiştirdiği saçılma türü Raman saçılmasıdır.

### 2.2.1.1.c. Işımanın polarizasyonu

Işık dalgası, genellikle her düzlemde ilerleyen dalgaların karışımıdır. Tek bir düzlemde ilerleyen ışık dalgasına düzlemsel polarize ışık denir.

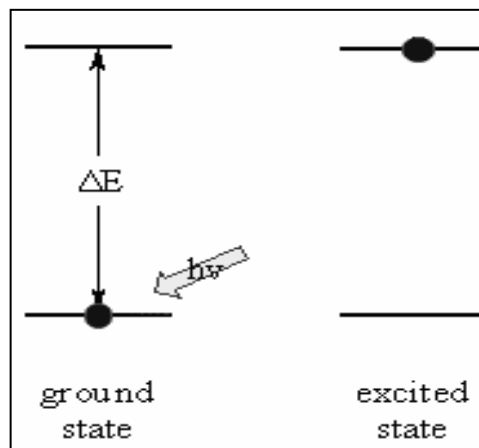


Şekil 2.2. Işımanın polarizasyonu

Düzlemsel polarize ışık ile asimetrik ve ışığı absorplamayan maddeler etkileştiği zaman, polarize ışığın düzlemi sağa (+) veya sola (-) açı değiştirir.

#### 2.2.1.1.d. Işımanın absorpsiyonu ve emisyonu

Kuantum kuramına göre atomlar, ancak elektron konfigürasyonuna ve dış elektronlarının belirli enerji düzeyleri arasındaki geçişlerine bağlı belirli potansiyel enerji düzeylerinde bulunabilirler. Elektronların bir enerji düzeyinden diğerine geçişleri ile ilgili atomik spektrumlar belirlenmiştir. Atomlar, elektromanyetik ışımayı absorbe ederek en düşük enerji düzeyinden (temel düzey) uyarılmış düzeylere geçerler; bu geçişlerle ilgili olarak söz konusu atomun absorpsiyon spektrumları da belirlenmiştir.



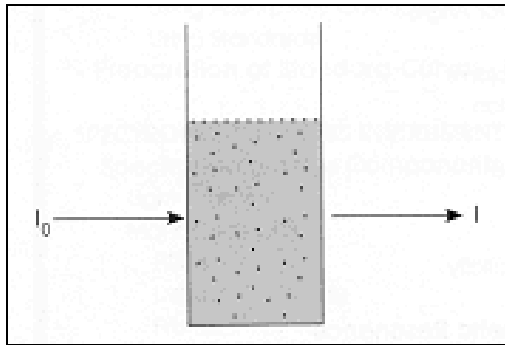
Şekil 2.3. Işımanın Absorpsiyonu ve Emisyonu

$$h \rightarrow \text{Plank sabiti } (6,63 \times 10^{-34}) \quad \nu \rightarrow \text{frekans} \quad (2.1)$$

Elektromanyetik ışığı absorbe ederek en düşük enerji düzeyinden (temel düzey) uyarılmış düzeylere geçmiş olan atomlar, temel düzeye dönüş sırasında ultraviyole veya görünür bölge sınırları içinde ışımaya enerjisi yayarlar (emisyon). Böylelikle her atom için emisyon spektrumu belirlenir.

Moleküller de atomlarda olduğu gibi uygun enerjideki fotonlarla etkileştiklerinde, bu fotonları absorplayarak uyarılmış hale geçerler. Uyarılmış moleküller, bu kararsız durumdan fazla enerjilerini yayarak kurtulurlar (moleküler emisyon). Atom spektrumlarından daha karmaşık olan moleküler spektrumlar da böylelikle belirlenir.

Absorplanan fotonların sayısı, ortamdaki absorpsiyon yapan türlerin sayısı ile orantılıdır. Monokromatik ve  $I_0$  şiddetinde ışımaya, ortamı daha küçük olan  $I$  şiddetinde terk eder.



Şekil 2.4.  $I_0$  şiddetinde ışımının, ortamı daha küçük olan  $I$  şiddetinde terk etmesi

### 2.2.1.2. Lambert-beer kanunu

Bir çözültiden geçen ışık miktarı, ışığın çözülti içinde kat ettiği yol ve çözülti konsantrasyonu ile logaritmik olarak ters orantılı, emilen ışık miktarı ise doğru orantılıdır.

$$\text{Transmittans (T)} = I/I_0 \quad (2.2)$$

$$\% \text{ Transmittans (\% T)} = 100 T \quad (2.3)$$

$$\text{Absorbans (optik dansite, O.D.)} = -\log_{10} T \quad (2.4)$$

$$\text{Absorbans (A)} = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (2.5)$$

c: çözelti konsantrasyonu ( $\text{mol L}^{-1}$ ), l: ışığın çözelti içinde kattığı yol (cm),  $\epsilon$ : molar absorpsiyon katsayısı ( $\text{L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )

### 2.2.1.3. Ultraviyole-görünür bölge absorpsiyon spektroskopisi

Çözelti içindeki madde miktarını çözümlenenden geçen veya çözeltinin tuttuğu ışık miktarından faydalanarak ölçme işlemine fotometri, bu tip ölçümde kullanılan cihazlara da fotometre denir. Fotometrik ölçümde, renksiz çözeltilerin konsantrasyonu da ölçülebilir. Analiz edilen örnek üzerine ışık demetinin bir kısmını filtreler kullanarak ayıran ve gönderen aletler kolorimetre veya fotometre olarak adlandırılırken, yarıklar ya da prizmalar aracılığı ile bu seçiciliği yapan aletler spektrofotometre olarak adlandırılırlar. Maddenin ışığı absorplamasını incelemek için kullanılan düzeneğe absorpsiyon spektrometresi veya absorpsiyon spektrofotometresi adı verilir. Bir spektrofotometre düzeneği, başlıca ışık kaynağı, dalga boyu seçicisi (monokromatör), dedektörden oluşur; dedektörde elektrik sinyaline çevrilen optik sinyal bir kaydedici veya bir galvanometre ile ölçülür.



Şekil 2.5. Absorpsiyon spektrofotometresinin başlıca düzeneği

Ana bileşenlere ek olarak spektrofotometrede ışığı toplamak, odaklamak, yansıtmak, iki demete bölmek ve örnek üzerine belli bir şiddette göndermek amacıyla mercekler, aynalar, ışık bölücüler, giriş ve çıkış aralıkları vardır. Örnek, kullanılan dalga boyu bölgesinde ışığı geçiren maddeden yapılmış örnek kaplarına (küvet) konularak ışık yoluna yerleştirilir. UV-görünür bölgede  $D_2$ , W,  $H_2$ , Xe, civa buhar lambası gibi sürekli ışık kaynakları kullanılır.

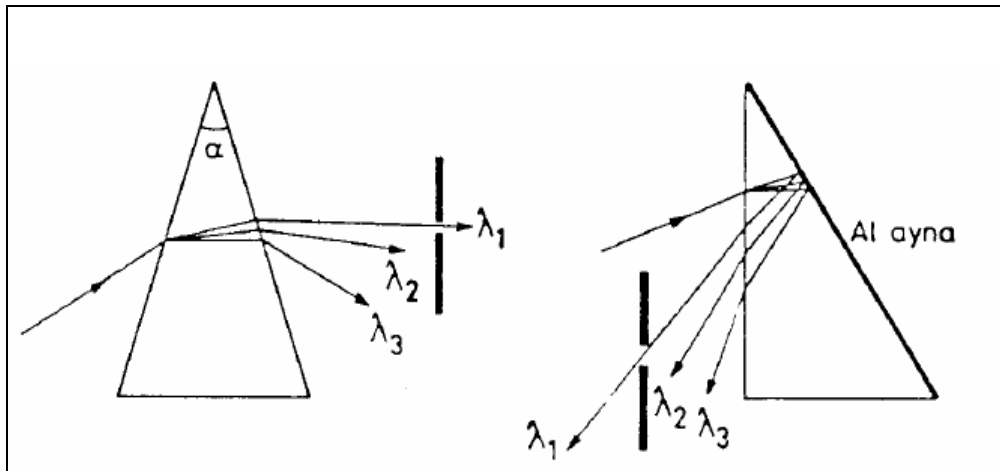
Tungsten flaman lambası, görünür ve yakın IR bölgede (320-3000 nm) ışık yayar. Tungsten lambasının içinde bir miktar iyot veya brom buharı bulunursa lambanın ömrü artar ve bu lamba tungsten-halojen lambası olarak adlandırılır.

Ultraviyole bölgede en çok kullanılan lambalar, hidrojen ve döteryum elektriksel boşalım lambaları'dır. Bu lambalar 180-380 nm arasında ışık yayar. Daha pahalı ve daha uzun ömürlü olan D<sub>2</sub> lambasının yaydığı ışığın şiddeti H<sub>2</sub> lambasına göre çok daha fazladır.

Xe ark lambası, UV-görünür bölgenin tümünde (150-700 nm) kullanılabilir şiddetli ve sürekli ışık kaynağıdır.

Civa buhar lambası, her iki bölgede ışımaya yapabilen bir ışık kaynağıdır; sürekli spektruma ek olarak kesikli hatlar da içerir.

Dalga boyu seçicileri (monokromatörler), ışık kaynağından gelen polikromatik ışıktan tek bir dalga boyunda monokromatik ışık elde edilmesini gerçekleştiren düzeneklerdir.



Şekil 2.6. Dalga boyu seçicileri (monokromatörler)

Monokromatör, filtreli fotometrelerdeki ışık filtresidir; spektrofotometrelerde ise ışık prizmasıdır. Örnek üzerine gönderilen ışığın daha monokromatik olmasını sağlamak için bazı spektrofotometrelerde çift monokromatör kullanılır.

Işık filtreleri, camdan yapılmış ve uygun boya ile boyanmış filtrelerdir. Portatif olup kullanıcı istediği zaman uygun dalga boyundaki filtreyi cihaza takar. Filtrelerin üzerinde geçirdikleri dalga boyu yazılıdır. Filtrenin rengi, ölçüm yapılacak çözeltinin rengine göre seçilir; örneğin, mavi ışığı tutan (sarı) bir maddenin ölçümünde sadece mavi ışığı geçiren filtre kullanılır.

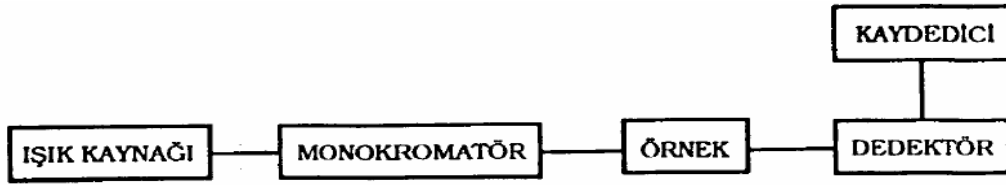
Işık prizmaları, cam veya kuartz olabilir. Özellikle düşük UV ışınları iyi geçirmediğinden cam prizma görünür bölge için uygundur. Kuartz prizmalar ise hem UV ışınlarını iyi geçirir, hem de görünür ışık ve IR'e yakın bölgelerde çalışmaya elverişlidir. Kuartz prizmalar pahalı spektrofotometrelerde bulunur.

Spektrofotometrelerde dedektör, maddenin ışığı absorplayıp absorplamadığını anlamak için ışık kaynağından gelen ışığın şiddetinin ölçülmesi amacıyla kullanılan düzendir. UV-görünür bölgede kullanılabilen üç tür dedektör vardır.

- Fotovoltaik dedektörler
- Fototüp
- Fotoçoğaltıcı tüp [36].

En basit spektrofotometrede kaynaktan çıkan ışık, bir mercekle toplanarak monokromatöre gönderilir ve dalga boyu seçiminden sonra bir aralıktan geçirilerek örnek üzerine düşürülür. Örneğin ışığı absorplama miktarı uygun bir dedektörle ölçülür, bu sinyal elektronik olarak çoğaltılır ve bir galvanometrede okunur. Bu bileşenlerin tümünün aynı ışık yoluna yerleştirildiği böyle bir spektrofotometreye tek ışık yollu spektrofotometre adı verilir [37].





Şekil 2.7. Tek ışık yollu spektrofotometre düzeneği

Bu aletin başlıca üç ayar düğmesi vardır: Bunlardan biri, alette kullanılan optik ağ veya prizmayı mekanik olarak döndürmeyi sağlayan düğmedir. İkinci düğme, ışık yolunu tamamen kapatarak galvanometre “sıfır” geçirgenlik ayarını yapmak içindir. Üçüncü düğme, ışığın geçtiği aralığın enini değiştirir.

Ölçümün yapılacağı dalga boyu birinci düğme ile ayarlandıktan sonra ışık yolu kapatılarak ikinci düğme ile “sıfır” ayarı yapılır. Daha sonra üçüncü düğme ile ışığın geçtiği aralığın eni değiştirilerek ve örnek kabında sadece çözücü kullanılarak galvanometre 100 değerine getirilir. Sıfır ve 100 ayarları her dalga boyunda yeniden yapılmalıdır [36].

Örnek çözeltisinin düşük ve yüksek geçirgenlik gösterdiği, yani ışığı çok ve az absorpladığı durumlarda, ölçümdeki bağıl hata yüksektir. Bu bağıl hatayı azaltmak için ‘sıfır’ ve ‘yüz’ ayarları değişik biçimde yapılır ve okunan geçirgenlik değeri ‘ $T_0$ ’ın % 20-70 arasında okunması sağlanır. Daha sonra bu değerler kullanılarak gerçek geçirgenlik değerleri  $T_g$ , hesaplanır. Düşük geçirgenlik yani büyük absorbans okumalarının söz konusu olabileceği derişik çözeltiler kullanılırken aletin ‘sıfır’ ayarı yine ışık yolu kapatılarak yapılır. Ancak ‘yüz’ ayarı, saf çözücü yerine aynı örneği içeren ve derişimi örnek derişiminden biraz daha düşük olan bir çözelti ile yapılır. Bu referans çözeltisinin geçirgenliği  $T_r$  olarak tanımlanırsa;

$$T_g = T_0 \cdot T_r \quad (2.6)$$

eşitliğinden örneğin gerçek geçirgenlik değeri  $T_g$  hesaplanır.

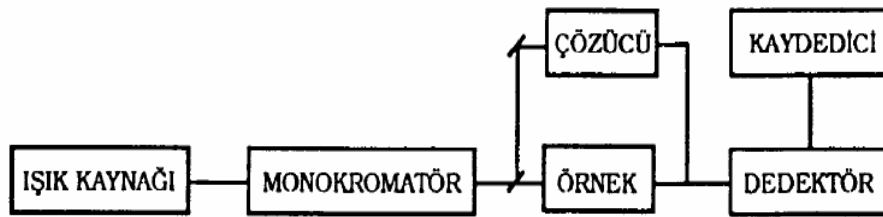
Yüksek geçirgenlik yani düşük absorbands değerlerinin ölçülmesine yol açacak seyreltik çözeltiler için ise, aletin 'yüz' ayarı yine saf çözücü olarak kullanılarak yapılır. Bu kez 'sıfır' ayarı, ışık yolu kapatılarak değil, ışık yoluna örneği içeren ve derişimi örnek derişiminden daha büyük olan bir çözelti ile yapılır. Bu çözeltinin geçirgenlik değeri  $T_k$  olarak tanımlanırsa, örneğin gerçek geçirgenliği  $T$

$$T_0 = (T_g - T_k) / (1 - T_k) \quad (2.7)$$

$$T_g = T_0(1 - T_k) + T_k \quad (2.8)$$

eşitliği ile hesaplanır. [37].

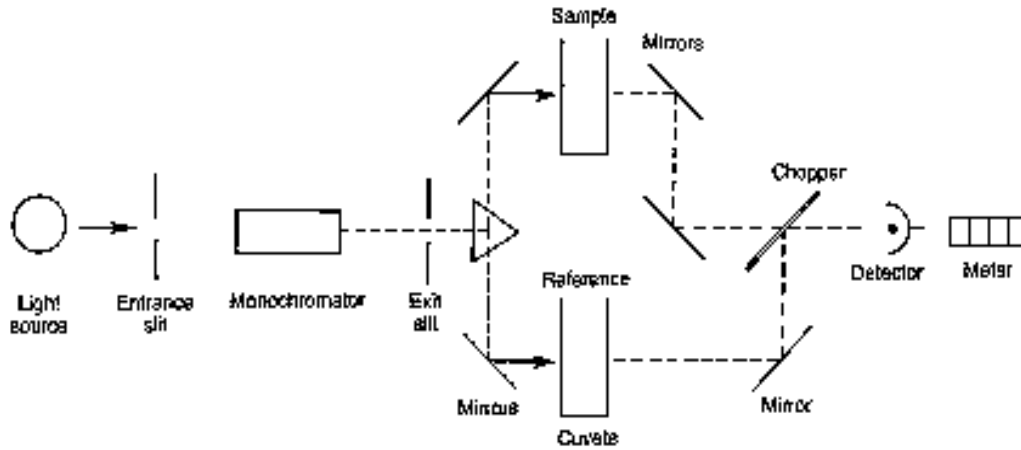
Her dalga boyunda 'sıfır' ve özellikle 'yüz' ayarlarının yapılması, oldukça zaman alıcı bir işlemdir. Spektrofotometrede, monokromatörden çıkan ışığın eşit şiddette iki demete bölünerek birinin örneğe, diğerinin ise sadece çözücünün bulunduğu kaba gönderilmesi ile bu işleme gerek kalmaz. Böylece örnekteki geçirgenlik değeri sürekli olarak çözücününki ile karşılaştırılmış olur. İkiye ayrılan ışık, iki ayrı dedektörle algılanır ve dedektörlerde oluşan sinyallerin oranı ölçülür. Bu tür aletlere çift ışık yollu spektrofotometreler denir. Burada iki dedektörün tam uyumlu olması, yani eşit şiddetteki ışık ile aynı sinyali oluşturması gerekir [36].



Şekil 2.8. Çift ışık yollu spektrofotometre düzeneği

Çift ışık yollu spektrofotometrelerde, tek dedektör kullanılarak da ölçüm yapmak mümkündür. Bunun için örnekten ve çözücünden geçen ışık demetleri dedektör üzerine, dedektör önüne yerleştirilmiş dönen bir ışık bölücü yardımıyla ve ardı ardına gönderilir. Ardarda gelen bu ışık demetlerinin oluşturdukları sinyal ise, alternatif yani periyodik türden olur. Işık bölücünün frekansına ayarlı bir elektronik çoğaltıcı

yardımı ile bu alternatif sinyal kaydedilir. Her iki ışık yolundan birbiri peşine gelen ışığın şiddetleri eşit ise, dedektörde herhangi bir sinyal oluşmaz. Örnek bölmesinden geçen ışığın absorpsiyon nedeniyle azaldığı zaman ise, dedektöre gelen sinyal alternatif sinyal olarak algılanır. Çift ışık yollu aletlerde, ışık kaynağının şiddetindeki değişimlerden doğan hatalar ortadan kalkar.

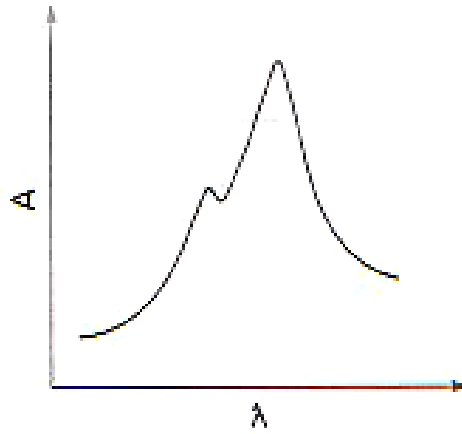


Şekil 2.9. Tek dedektör kullanımlı çift ışık yollu spektrofotometre

Spektrofotometrelerde, iki ayrı monokromatör kullanılarak, iki farklı dalga boyundaki ışık, dönen bir ışık bölücü yardımı ile örnekle ardı ardına etkileştirilir. Bu tür çift ışık yollu spektrofotometrelere çift dalga boylu spektrofotometre adı verilir. Örnekteki iki dalga boyunu absorplayacak iki bileşen varsa, bunların absorbanslarında zamanla oluşan değişimler, dalga boyu taraması yapılmaksızın izlenebilir. Çift dalga boylu spektrofotometrede, her iki monokromatör aralarında bir  $\Delta\lambda$  değeri olacak şekilde beraberce taranırsa, absorbans farkı  $\Delta A$ , spektrumu ölçülmüş olur. Çift dalga boylu ölçümün uygulandığı bir başka örnek türü de bulanık çözeltilerdir. Dalga boylarından biri çözeltideki maddenin absorplayacağı, diğeri ise absorplamayacağı değerlere ayarlanır. Bulanıklıktan dolayı her iki dalga boyunda aynı miktarda ışık kaybı olacağından iki dalga boyunda yapılan ölçümlerin farkı, sadece örneğin absorbansı ile ilişkili olur [37].

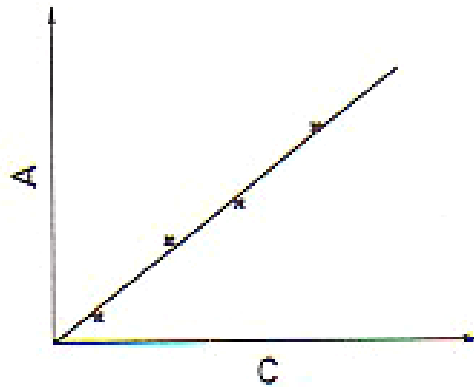
Spektrofotometre ile bir maddenin nicel analizinin yapılacağı dalga boyunu kararlaştırmak için, örneğin absorpsiyon spektrumunu bilmek gerekir. Bunun için,

maddenin 1 molar çözeltisinin çeşitli dalga boylarındaki absorptans değeri ölçülür. Çözücünün ve çözeltide bulunan başka türlerin ışığı absorplamadığı, Lambert-Beer eşitliğine uyulduğu ve nicel analiz için en duyarlı bir biçimde yapılabileceği dalga boyu değeri saptandıktan sonra analizi yapılacak maddeyi içeren ve derişimleri bilinen bir dizi standart çözelti ile bu dalga boyundaki absorptans (A) değeri ölçülür. A değeri, standart çözeltilerin bilinen derişimlerine karşı grafiğe geçirilir.



Şekil 2.10. Bir maddenin çeşitli dalga boylarındaki absorptans değerlerinin grafiğe gösterilmesi

Standart çözeltilerin bilinen derişimlerine karşı A değerlerini grafiğe geçirmek suretiyle elde edilen doğruya kalibrasyon doğrusu denir.



Şekil 2.11. Standart çözeltilerin bilinen derişimlerine karşı absorptans değerlerinin grafiğe gösterilmesi

Nicel analiz, kalibrasyon doğrusunun doğrusal olduğu bölgede yapılır. Derişimi bilinmeyen örneğin A değeri ölçülür ve kalibrasyon doğrusunda bu değere karşılık gelen derişim saptanır.

Molar absorpsiyon katsayısının değerinin bilindiği durumlarda, Lambert-Beer eşitliğinin analizde doğrudan kullanılması da mümkündür.

Spektrofotometrelerde örneğin konulduğu örnek kapları (küvet), yuvarlak bir tüp veya dört köşe olabilir. Küvetler, soft veya borosilikat camdan, kuartz veya plastikten yapılır. Soft camlar asidik çözeltiler, borosilikat camlar kuvvetli alkali çözeltiler için uygundur. Corex gibi bazı camlar 340 nm’de kullanılabilir de, kısa UV dalgalar için uygun değildir. Kuartz küvetler hem UV hem görünür dalga boyları için uygundur. Plastik küvetler özel üretilmiş ise 200-700 nm arasında rahatlıkla kullanılabilir.



Şekil 2.12. Spektrofotometrelerde örneğin konulduğu örnek kap

Spektrofotometrik ölçümlerde kör, standart ve numune olmak üzere üç tüp hazırlanır; Kör, cihazın optik ayarlarının (sıfır ve 100 ayarı) yapılması amacıyla kullanılan çözeltilerdir. Kör çözeltileri olarak distile su veya reaktifin kendisi kullanılır. Bazı ölçümlerde numune körüde kullanılabilir. Distile su körü, en sık kullanılan kördür; okuma küvetine distile su konularak hazırlanır. Daima absorbans değerinin sıfırlanması için kullanılır. Reaktif körü, deneyde kullanılan reaktif ile hazırlanan kördür. Deneyde birden fazla reaktif varsa birden fazla reaktif körü de olabilir. Bazen absorbans değerinin sıfırlanması için, bazen de distile su körüne karşı numune gibi kullanılır. Numune körü, deneyde kullanılan reaktif/numune oranına uygun olarak

distile su veya serum fizyolojik ile numune karıştırılarak hazırlanır. Daima distile su veya reaktif körüyle sıfırlanmış cihazda numune gibi okutulur. Numune gibi okutulan reaktif veya numune körü değerleri numune değerinden çıkarılır. Standart, aranan maddenin bilinen konsantrasyondaki çözeltisidir. Numune, içindeki madde miktarını tayin etmek istediğimiz çözeltidir [36].

#### **2.2.1.4. Standartların hazırlanması**

Sibutramin stok çözeltileri, saf Sibutramin hidroklorür monohidrat standardından metanol ve deiyonize su içerisinde  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  olacak şekilde hazırlanarak, kullanılıncaya kadar buzdolabında  $+4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.  $5-50 \mu\text{g ml}^{-1}$ 'lik konsantrasyon aralığındaki çalışma standart çözeltileri, metanol ve su ile stok çözeltilerin sabit bir hacme seyreltilmesi ile elde edilmiştir. Kalibrasyon eğrileri için  $5, 10, 15, 20, 30, 40, 45, 50 \mu\text{g ml}^{-1}$ 'lik 8 farklı konsantrasyonda standart çözeltiler hazırlanmıştır. Yine ana stoktan hazırlanan  $15, 30$  ve  $45 \mu\text{g ml}^{-1}$ 'lik çalışma standartları ile gün-içi ve günler-arası ölçümler alınmıştır. Bütün ölçümlerde, UV spektrumları için referans olarak metanol ve deiyonize su kullanılmıştır.

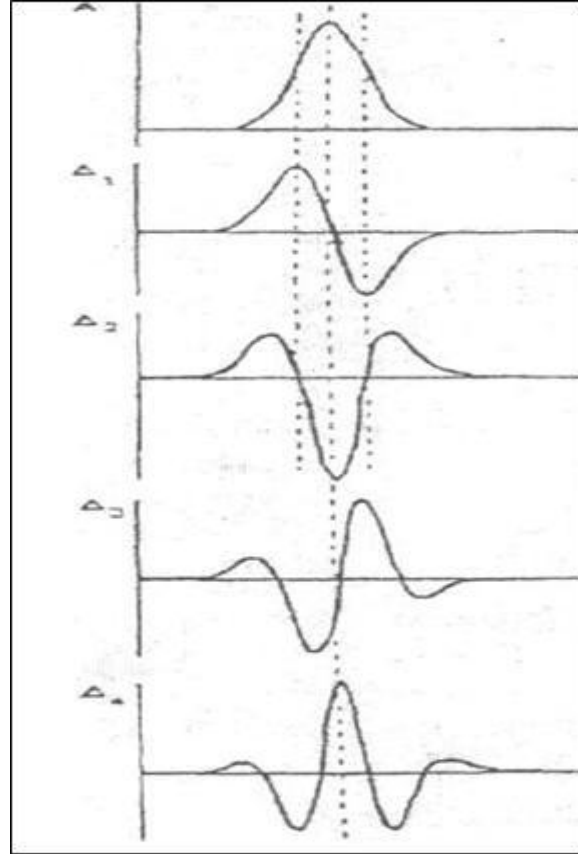
#### **2.2.1.5. Ticari numunelerin hazırlanması**

$15 \text{ mg}$  Sibutramin hidroklorür etken maddesini içeren ticari Reductil kapsüllerinden numuneler hazırlamak için, iki farklı çözücü ortamında (metanol ve su içerisinde)  $100 \text{ ml}$ 'lik balon jojelerde kapsüller iyice çözülünceye kadar  $5-10$  dakika süre ile vorteks yardımıyla karıştırılmış ve  $150 \mu\text{g ml}^{-1}$ 'lik ana stok çözeltileri hazırlanmıştır. Daha sonra, bu stoklardan  $15, 30$  ve  $45 \mu\text{g ml}^{-1}$  olacak şekilde kısımlar alınarak, yine iki farklı çözücüde seyreltilmiştir.

### **2.2.2. Türev Spektroskopisi**

UV spektrumu, madde üzerine gönderilen ışığın dalga boylarına karşı absorpsiyon değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilir. Orijinal spektrum veya sıfıncı derece spektrum  $A=f(\lambda)$  fonksiyonudur. Bir fonksiyonu gösteren eğrinin herhangi bir noktasındaki teğetinim eğimi, fonksiyonun bu noktadaki türevidir. Bu fonksiyonun

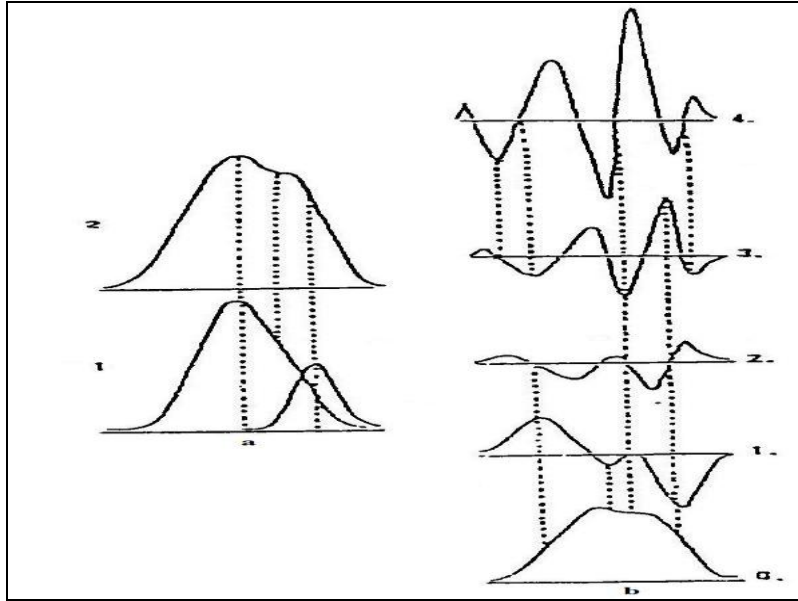
her noktasındaki türevi ( $dA/d\lambda$ ) hesaplanabilir. Eğer bu türev değerleri grafiğe geçirilecek olursa "türev spektrumu" elde edilir. 1'den n'e kadar derecede olabilir. Şekil 2.13'de görüldüğü gibi bir çan eğrisinin 1. derece türev eğrisi orijinal spektrumdaki eğrinin teğetlerinin eğimini göstermektedir. Böylece türevlendirme ile spektrum daha ayrıntılı ve net bir görünüm kazanmaktadır.



Şekil 2.13. 1. ve 4. dereceden türev spektrumları (A:Özgün Spektrum,  $\Delta_1$ :1.Türev Spektrumu,  $\Delta_2$ :2.Türev Spektrumu,  $\Delta_3$ :3.Türev Spektrumu,  $\Delta_4$ :4.Türev Spektrumu)

Türev almanın bir diğer avantajı da türev derecesi arttıkça geniş bantların dar bantlara göre daha fazla baskılanmasıdır. Bu özellikten faydalanılarak numune matrisinden ileri gelen ve bozucu etki gösteren bantlar elimine edilebilir. Bu da ikinci ve dördüncü türevde teşhis ve tayine imkân sağlar. Maksimum dalga boyları farklı, eşit olmayan iki Gauss eğrisinin tek tek ve karışım halindeki spektrumları ise Şekil 2.14'de görülmektedir. Bu tür spektrumların maksimum dalga boyları farklı yani merkezleri aynı olmadığından karışım halinde alınan spektrumları bir omuz verir. Bu bantların türevleri alınarak omuzlar düz noktalar haline dönüştürülür. Orijinal Gauss

eğrisi tipindeki bir pike karşılık  $n$ . türevde  $n+1$  tane maksimum ve minimuma rastlanmaktadır. Yani birinci derece türev eğrisinde iki, ikinci derece türev eğrisinde üç, üçüncü derece türev eğrisinde ise dört tane maksimum ve minimum nokta görülmektedir. Özellikle biyokimyasal analizlerde bu işlem saflık kriteri olarak iki dalga boyundaki absorpsiyon oranının oluşması açısından önemli olup tanıma ve saflaştırma işlerinde üstünlük sağlar.



Şekil 2.14. a) Gauss eğrisinin 1. tek tek ve 2. karışım halindeki spektrumları, b) Gauss eğrisinin karışım halindeki 1.- 4.türev eğrileri

Direkt spektrofotometride derişim ile absorbans arasında oluşturulan kalibrasyon eğrileri, türev spektrofotometrisinde standart çözeltilerin derişimi (C) ile bunlara karşılık olan türev absorbans değerleri ( $\Delta_n$ ) arasında çizilir. Türev absorbans değerlerinin ölçülmesinde çeşitli teknikler uygulanmaktadır:

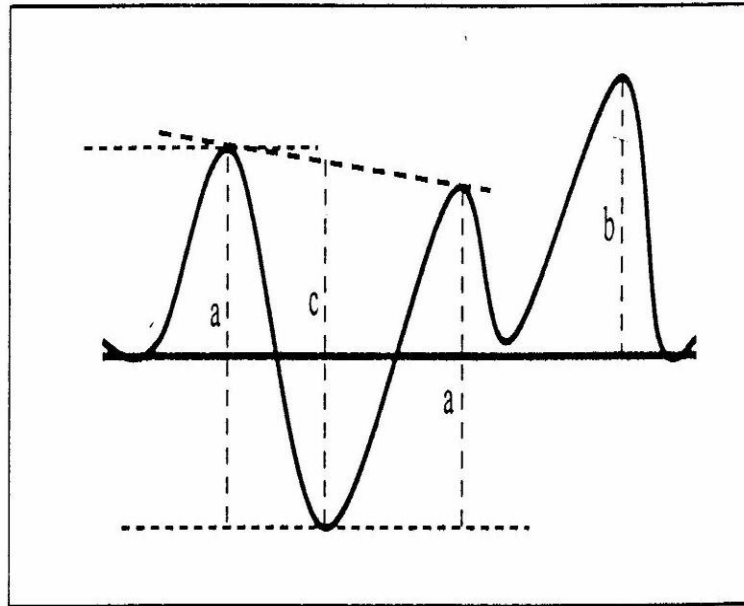
**Pik-Pik Tekniği;** Birbirini izleyen iki ekstremum arasındaki uzaklık, ordinata paralel olarak ölçülür. Bu teknik genellikle zemin absorbansının giderilmesinde, çok bileşenli karışımların kantitatif analizinde kullanılmaktadır.



Pik-Sıfır Tekniği; Peak-zero ya da zero-crossing tekniği olarak adlandırılan bu teknik ise pik tepesinin absise olan uzaklığının ordinata paralel olarak ölçülmesidir. Çok bileşenli karışımların analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Zemin etkisinin giderilmesinde yararı olmaz.

Pik-Pik Oranı Tekniği; Birbirine komşu iki pikin oranı alınır. Bu teknik ikili karışımların kantitatif analizinde kullanılmaktadır.

Tanjant tekniği; Birbirini izleyen iki maksimum ya da iki minimuma ortak teğet çizilir. Bu teğetin aradaki ekstremuma olan uzaklığı ordinata paralel olarak ölçülür. Bu teknik, doğrusal bir zemin olduğu zaman daha tatminkar sonuçlar verir ve zeminin spesifik olmayan etkilerinin elimine edilmesinde ya da azaltılmasında yararlıdır (Şekil 2.15) [38].



Şekil 2.15. Türev spektrumlarının değerlendirilmesi a) Pik-pik tekniği, b) Pik-sıfır tekniği, c) Tanjant tekniği

### 2.2.2.1. UV-türev spektrofotometrisinin avantajları ve kullanım alanları

Maksimum absorpsiyon dalga boyunun kesin olarak belirlenmesi; Özellikle geniş absorpsiyon bantlarının bulunduğu absorpsiyon spektrumlarında absorpsiyonun

maksimum olduğu dalga boyunun kesin bir şekilde saptanmasında, 1. türev spektrumu çok yararlıdır. Orijinal spektrumda  $\lambda_{max}$ 'un bulunduğu dalga boyunda 1. türev eğrisi sıfırdan geçeceği için, bu dalga boyu çok daha kesin bir şekilde kolayca saptanabilir.

Rezolüsyonda artış; Türev spektrumlarının ikinci avantajı da orjinal spektrumda zor görülebilen spektral ayrıntıların ortaya çıkması yani ayırıcılığın artmasıdır. Bunun için çift sayılı türev spektrumları daha avantajlıdır. Çünkü orjinal spektrumda bulunan maksimum ve minimumlar bu spektrumlarda yine aynı dalga boylarında birer ekstremum halinde ortaya çıkmaktadır. Bu şekilde türev spektrumlarının alınması ile spektral ayrıntıların netleştirilmesi, tanıma, saflık testleri ve eser analizlerde çok yararlı olmaktadır.

Teşhis; Özellikle absorpsiyonu görünür bölgede olan renkli maddelerin absorpsiyon spektrumlarının geniş bantlar halinde olduğu için bu spektrumlar maddenin karakterizasyonu ve saptanmasında önem taşımaz. Buna karşın orijinal spektrumdaki omuzların türev spektrumlarında, özellikle yüksek dereceli olanlarda ekstremum haline dönüşmesi, piklerin sayısının artması ve keskinleşmesi ile spektral ayrıntılar ortaya çıkar ve infrared parmak izi spektrumlarına benzeyen spesifik spektrumlar elde edilir. Bu şekilde absorpsiyon spektrumları birbirine benzer kimyasal yapıdaki bileşiklerin türev spektrumlarının alınması, bunların farkedilmesine olanak sağlar.

Saflık kontrolü; Türev spektrumlarındaki spektral ayrıntılar maddelerin saflık testlerinde de avantaj sağlamaktadır. Eser miktardaki safsızlıklara ait küçük absorpsiyon pikleri türev spektrumlarında daha kolay saptanabilen pikler haline dönüşür. Test edilen numune spektrumlarının, saf maddenin aynı koşullarda kaydedilen türev spektrumlarıyla karşılaştırılmasıyla ham madde, ara ürün ve nihai ürünlerde saflık kontrolü yapılır.

Eser analiz; İlaç maddeleri, besinler vb. maddelerde bulunabilen eser miktardaki safsızlıkların saptanması ve miktarlarının tayin edilmesi de türev spektrofotometrisinin bir başka uygulama alanıdır.

Karışımların bir arada analizi; Türev Spektrofotometrisinin oldukça yaygın bir kullanım alanı da absorpsiyon bantları çakışan ve bu sebeple bir ön ayırma yapmaksızın doğrudan tayin edilemeyen karışımların eş zamanlı analizidir. Bu analizlerde pik-sıfır, pik-pik ve pik-pik oranı teknikleri kullanılmaktadır. Her üç teknikte de kalibrasyon eğrileri, derişim ile bu parametrelerden biri arasında hazırlanır. Burada önemli nokta, standart ve bilinmeyen çözeltilerin spektrumlarının aynı enstrümantal parametrelerle alınmasıdır.

Bulanık çözeltilerde nicel analiz; Bulanık çözeltiler ve süspansiyon veya emülsiyon şeklindeki çözeltilerde spektrofotometrik ölçümlerin yapılması zordur. Özellikle ultraviyole alanda ışın saçılması sebebiyle analitin spektrumu kuvvetli ya da zayıf bir zemin absorpsiyonu ile örtüşür. Bulanıklığın sebep olduğu geniş bantlı zemin absorpsiyonu dalga boyu ile hafif bir değişim gösterir. Türev spektrumlarındaki karakteristik pik-pik mesafeleri değerlendirilerek bulanıklığın spektrum üzerindeki bu olumsuz etkisi yok edilebilir.

Matriks etkisinin giderilmesi; Türev spektrumları alınması ile orjinal spektrumdaki keskin spektral özellikler kuvvetlenmekte, buna karşın geniş ve yaygın bantlar daha da basıklaşmaktadır. Bu özellik, analit piki ile çakışan değişken zemin absorpsiyonunun düzeltilmesine ve bu şekilde matriks etkisinin giderilmesine olanak sağlar [39].

#### **2.2.2.2. Standartların hazırlanması**

Sibutramin stok çözeltileri, saf Sibutramin hidroklorür monohidrat standardından metanol ve deiyonize su içerisinde  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  olacak şekilde hazırlanarak, kullanılıncaya kadar buzdolabında  $+4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.  $5-50 \mu\text{g ml}^{-1}$ 'lik konsantrasyon aralığındaki çalışma standart çözeltileri, metanol ve su ile stok çözeltilerin sabit bir hacme seyreltilmesi ile elde edilmiştir. Kalibrasyon eğrileri için 5, 10, 15, 20, 30, 40, 45,  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ 'lik 8 farklı konsantrasyonda standart çözeltiler hazırlanmıştır. Yine ana stoktan hazırlanan 15, 30 ve  $45 \mu\text{g ml}^{-1}$ 'lik çalışma standartları ile gün-içi ve günler-arası ölçümler alınmıştır. Bütün ölçümlerde, UV spektrumları için referans olarak metanol ve deiyonize su kullanılmıştır.

### 2.2.2.3. Ticari numunelerin hazırlanması

15 mg Sibutramin hidroklorür etken maddesini içeren ticari Reductil kapsüllerinden numuneler hazırlamak için, iki farklı çözücü ortamında (metanol ve su içerisinde) 100 ml'lik balon jojelerde kapsüller iyice çözülünceye kadar 5-10 dakika süre ile vorteks yardımıyla karıştırılmış ve  $150 \mu\text{g ml}^{-1}$ 'lik ana stok çözeltileri hazırlanmıştır. Daha sonra, bu stoklardan 15, 30 ve  $45 \mu\text{g ml}^{-1}$  olacak şekilde kısımlar alınarak, yine iki farklı çözücüde seyreltilmiştir.

### 2.2.3. Kromatografik Yöntem

Kimyasal maddeler, sabit bir ortama ilave edilip, bunların belirli bir çözücüyle yüzey adsorpsiyonu, dağılma, iyon değiştirme ve eleme özelliklerine bağlı olarak, sabit ortamdan ayrılma yöntemlerine kromatografi denilmektedir.

Kromatografi türleri genel olarak aşağıdaki şekilde sınıflandırılır:

#### 1. Teorik Sınıflandırma

- a. Paylaşım Kromatografisi
- b. Adsorpsiyon Kromatografisi
- c. Boyut Eleme (Jel Filtrasyon ve Jel Geçirgenlik) Kromatografisi
- d. İyon Değiştirme Kromatografisi

#### 2. Pratik Sınıflandırma

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

Kromatografik yöntemler fiziksel olarak da iki şekilde sınıflandırılır. Kolon kromatografisinde, sabit faz ince bir kolonda tutulur ve hareketli faz da basınç altında bu sabit faz arasından geçmeye zorlanır. Düzlemsel kromatografi de ise sabit faz düz

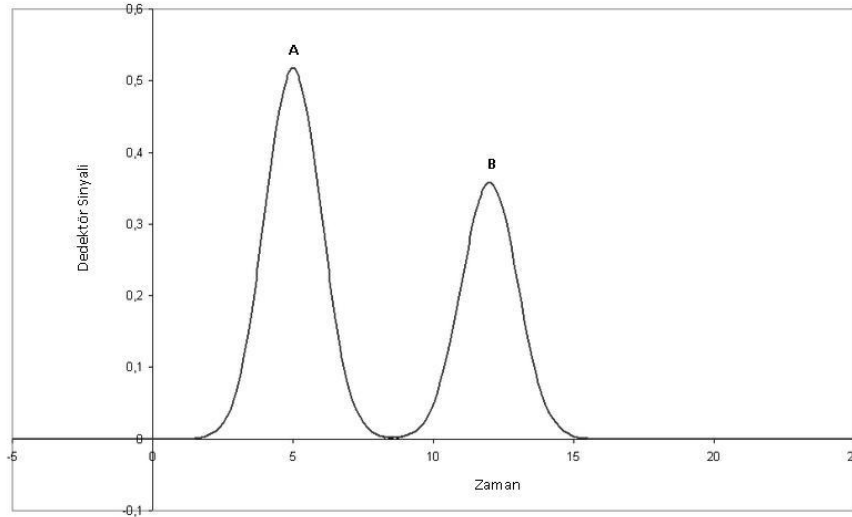
bir plaka üzerinde veya bir kâğıdın gözenekleri arasında tutturulur. Ve bu durumda hareketli faz, sabit faz arasından kapiler veya yer çekimi etkisiyle hareket eder. Kolon kromatografik yöntemlerde; sıvı, gaz ve süper kritik akışkanlı olmak üzere üç kısımda sınıflandırılabilir. Böyle bir sınıflandırma hareketli ve sabit fazların cinsine ve bileşenlerin iki faz arasındaki dengesine dayanır. Birinci kromatografi türünde hareketli faz sıvı, ikincisinde gaz ve üçüncüsünde ise bir süper kritik akışkandır [18].

Kromatografide hareketli faz olarak, su dâhil bütün organik çözücüler ve bu çözücülerin çeşitli oranlardaki karışımları, gaz veya süper kritik çözücüler kullanılabilir. Hareketli fazda hiç çözünmeyen sabit faz olarak da, silikajel, alümina, kömür, florasil, kizelgur, poliamit, nişasta, talk vb çeşitli gözenekli maddeler kullanılmaktadır [40]. Numune hareketli fazda ya da polaritesi daha zayıf olan bir çözücüde çözülmesi oldukça avantajlıdır. Hareketli fazlarda değişiklik yaparak daha iyi bir ayırım sağlanabilmektedir [16].

### **2.2.3.1. Kromatografik Parametreler**

Bir kolondan sürekli taze çözücü geçirilerek çözünmüş bileşenin yıkanması işlemine elüsyon işlemi denir. A ve B gibi iki bileşenin bulunduğu hareketli faz içinde çözünmüş olan numune, başlangıçta kolon girişine verilir. A ve B bileşenleri iki faz arasında dağıtılır. Hareketli fazın sisteme verilmesiyle numunenin çözünmüş kısmı kolonda aşağı taşınır. Böylece taşınan hareketli faz ile yeni sabit faz arasında tekrar dağılım oluşur. Aynı anda, başlangıçtaki numune bileşenlerini içeren sabit faz ile taze hareketli faz arasında da dağılım meydana gelir. Çözücünün sürekli kolona verilmesiyle, iki faz arasında sürekli aktarımlar sonunda çözünen moleküller kolonda aşağı taşınır. Çözünen madde kolonda sadece hareketli faz taşındığından, ortama 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 oranda büyüktür. İdeal olarak bileşenlerin hızlarının farklı olması, karşısındaki bileşenlerin kolon boyunca bantlar veya bölgeler halinde ayrılmasına sebep olur. Yeterli miktarda hareketli fazın kolondan geçirilmesiyle, her bant kolonun sonuna ulaşır ve burada ayrılarak toplanabilir.

Kromatogram; Çözünen madde derişimlerine cevap veren bir dedektör kolon çıkışına yerleştirilirse ve dedektör sinyali zamanın veya kullanılan hareketli faz hacminin bir fonksiyonu olarak kaydedilirse, bir seri pik elde edilir. Şekil 2.16’da görüldüğü gibi, kromatogram olarak adlandırılan bu grafikler, hem kalitatif hem de kantitatif analiz için kullanılmaktadır [18].



Şekil 2.16. Kolondan ayrılan A ve B gibi iki maddenin kromatogramları

Bir kromatogramdaki pik sayısı, numunedeki bileşen sayısı kadardır. Kromatogramdaki zaman eksenindeki pikin yeri, onun hangi maddeye ait olduğunu, numune miktarı ile orantılı pikin alanı da, o bileşenin kantitatif ölçüsünü vermektedir. Bir kromatografik kolonun iki çözüneni ayırmadaki verimliliği, iki türün elüsyon sırasındaki bağıl hızlarına bağlıdır. Bu hızlar ise çözünenlerin iki faz arasındaki partisyon oranları tarafından belirlenmektedir.

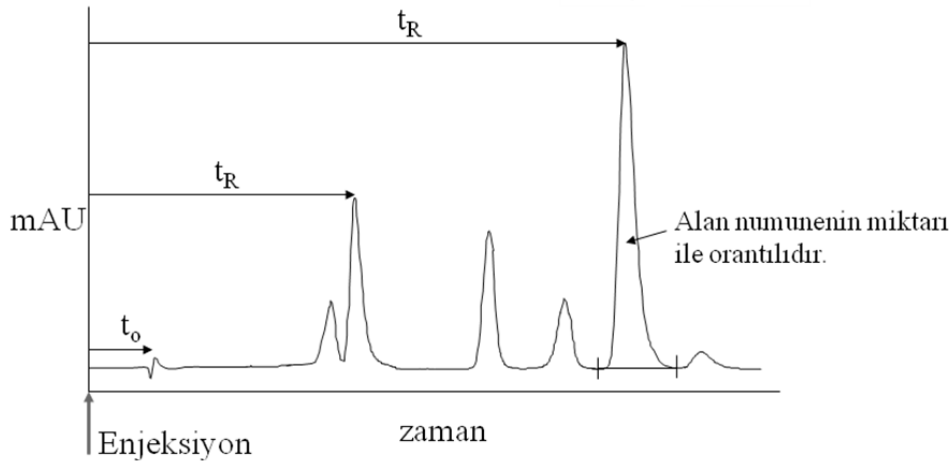
Partisyon Oranı; Bütün kromatografik ayırmalar, çözünenlerin hareketli ve sabit faz arasındaki partisyonun derecesini temel almaktadır. A çözücüsü için söz konusu denge, aşağıdaki eşitlikle gösterilebilir.

$$A_{\text{hareketli}} \xrightleftharpoons{\quad} A_{\text{sabit}} \quad (2.9)$$

Bu reaksiyonun denge sabiti K'ya partisyon oranı veya partisyon kat sayısı denir.

$$K = \frac{C_s}{C_M} \quad (2.10)$$

Şeklinde gösterilir. Burada  $C_s$ , çözünenin sabit fazdaki analitik konsantrasyonu ve  $C_M$  ise hareketli fazdaki analitik konsantrasyonudur.



Şekil 2.17. Bir türün kolonda alıkonma zamanı

Alıkonma zamanı; Şekil 2.17’de soldaki küçük pik, sabit fazda hiç tutulmayan bir türü göstermektedir. Numunenin enjeksiyonundan sonra gelen bu pik için pik süresi ölü zaman olarak adlandırılır ve  $t_0$  ile gösterilir. Ölü zaman, hareketli fazın ortalama göç hızını verir ve analit piklerinin tanınmasında önemli rol oynar. Şekilde sağ taraftaki pik ise bir analit türüne aittir. Numunenin enjeksiyonu ile bu pikin dedektöre ulaşması arasında geçen süreye alıkonma zamanı denir ve  $t_R$  ile gösterilir.

Çözünenin ortalama göç hızı  $\bar{v}$ ,

$$\bar{v} = \frac{L}{t_R} \quad (2.11)$$

olarak verilir;  $L$  kolon dolgusunun uzunluğudur. Benzer şekilde, hareketli faz moleküllerinin ortalama doğrusal hızı  $u$ , şu şekilde verilir:

$$u = \frac{L}{t_0} \quad (2.12)$$

Çözünen bir maddenin göç hızıyla partiyon oranı arasındaki ilişkiyi bulmak için hızı hareketli faz hızının bir oranı şeklinde yazabiliriz

$$\bar{v} = u \cdot \text{çözünenin hareketli fazda geçirdiği zaman kesri} \quad (2.13)$$

Bu kesir, aynı zamanda herhangi bir anda hareketli fazda bulunan çözünen maddenin ortalama mol sayısının kolondaki toplam çözünen maddenin mol sayısına bölünmesiyle de elde edilir.

$$\bar{v} = u \cdot \frac{\text{hareketli fazda çözünenin mol sayısı}}{\text{çözünenin toplam mol sayısı}} \quad (2.14)$$

Hareketli fazdaki çözünen maddenin toplam mol sayısı, molar konsantrasyon  $C_M$  ile hacmi  $V_M$ 'nin çarpımına eşittir. Benzer şekilde, sabit fazdaki çözünen maddenin mol sayısı da, çözünenin sabit fazdaki konsantrasyonu  $C_S$  ile hacmi  $V_S$ 'nin çarpımıyla elde edilir:

$$\bar{v} = u \cdot \frac{C_M V_M}{C_M V_M + C_S V_S} = u \cdot \frac{1}{1 + C_S V_S / C_M V_M} \quad (2.15)$$

Eşitlik 2.10'nun bu eşitlikte yerine konulmasıyla, hem partiyon oranı, hem de sabit ve hareketli faz hacimlerine bağlı olarak çözünen maddenin göç hızını veren bir bağıntı bulunur.

Kapasite Faktörü; Önemli bir deneysel parametre olup, çözünen A maddesinin kolonda göçü sırasındaki hızı şeklinde tanımlanır. Bir A çözüneni için pikin alıkonma fonksiyonu olan kapasite faktörü  $k'_A$  olursa,

$$k'_A = \frac{K_A \cdot V_S}{V_M} \quad (2.16)$$

dir.  $K_A$ , A türü için partiyon oranıdır. Eşitlik 2.16'nın eşitlik 2.15'de yerine konması ile



$$\bar{v} = u \cdot \frac{1}{1 + KV_S / V_M} \quad (2.17)$$

bulunur. Kromatogramdan  $k'_A$  'nın nasıl bulunduğunu göstermek için eşitlik 2.11'de ve 2.12, eşitlik 2.17'e konulursa:

$$\frac{L}{t_R} = \frac{L}{t_0} \cdot \frac{1}{1 + k'_A} \quad (2.18)$$

eşitliği elde edilir. Bu eşitlik de düzenlenerek aşağıdaki eşitlik bulunur.

$$k'_A = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (2.19)$$

Şekil 2.17'de görüldüğü gibi,  $t_R$  ve  $t_0$  değerleri kromatogramdan kolayca bulunur. Bir çözünen madde için kapasite faktörü birden çok küçük ise elüsyon o kadar hızlı olur ki alıkonma zamanının doğru tayini zorlaşır. Yani  $k' = 0$  olduğunda herhangi bir ayırma işlemi gerçekleşemez. Öte yandan kapasite faktörü 20-30 gibi bir sayıdan daha büyük ise elüsyon süreleri gereksiz şekilde uzar. Karşımdaki çözünenler için kapasite faktörlerinin 1-5 arasında olmasını sağlayan şartlarda, ayırmalar en ideal şekilde yapılabilir.

Seçicilik Katsayısı; Bir kolondaki iki analit için seçicilik katsayısı  $\alpha$ , bu kolonun söz konusu iki maddeyi ne kadar iyi ayıracağıнын bir ölçüsüdür. Kolonda A ve B gibi iki tür çözünen varsa, bu iki tür için seçicilik katsayısı aşağıdaki eşitlik ile verilir.

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} \quad (2.20)$$

Buradaki eşitlik, daha kuvvetli tutulan B çözüneni için partiyon oranının  $K_B$ , daha az kuvvetli tutulan veya daha hızlı olarak kolondan elüe edilen A çözüneninin partiyon oranı  $K_A$ 'ya bölümü şeklinde tanımlanır. Bu tanıma göre  $\alpha$ , daima birden

büyükür. Zaten iyi bir kromatografik ayırım için  $\alpha > 1$  olmalı,  $\alpha=1$  olduğunda ise iki bileşik ayrılmaz.

Eşitlik 2.16 ve çözünen B türü için benzer eşitliğin eşitlik 2.20’de yerine konması ve düzenlenmesi ile her iki çözünen madde için  $k'_A$  ve  $k'_B$  olan kapasite faktörleriyle bunların seçicilik katsayısı arasında yeni bir ilişki elde edilir:

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} \quad (2.21)$$

Bu iki çözünen madde için eşitlik 2.19’un eşitlik 2.21’de yerine konmasıyla  $\alpha$  değerinin deneysel kromatogramdan bulunmasına olanak veren başka bir bağıntıda elde edilebilir:

$$\alpha = \frac{(t_R)_B - t_0}{(t_R)_A - t_0} \quad (2.22)$$

Kolon Verimliliği; Bir bileşiğin kolondan geçişi sırasında meydana gelen piklerin bant genişliğinin derecesi tarafından etkilenir. Kromatogramlar incelenirse, elüsyon piklerinin bant genişliğinin derecesi tarafından etkilenir. Kromatogramlar incelenirse, elüsyon piklerinin Gauss veya normal hata eğrilerine çok benzediği görülür. Bir kromatografik bandın tipik Gauss şekli de, kolondan geçişleri sırasında rastgele hareketleriyle bir bant oluşturan moleküllerin varlığıyla açıklanabilir. Kromatografik kolon verimliliklerinin kantitatif ölçümünde, birbirleriyle bağıntılı iki terim kullanılır: Tabaka yüksekliği H ve teorik tabaka sayısı N. Bu iki terim arasındaki bağıntı da aşağıdaki gibidir.

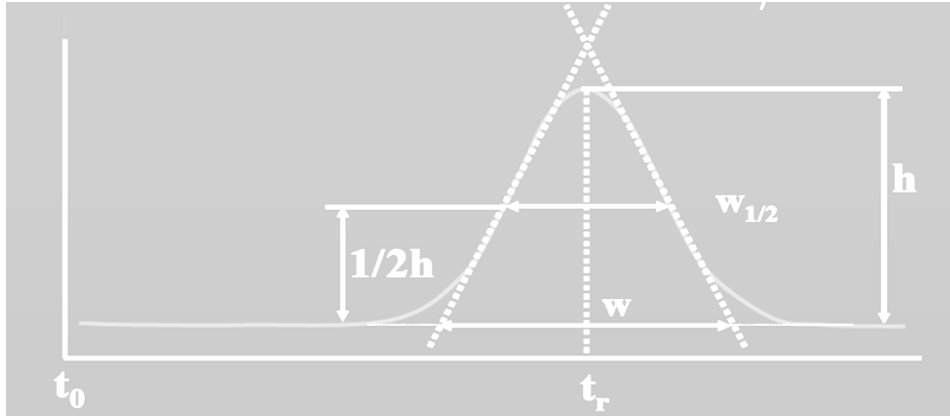
$$N = \frac{L}{H} \quad (2.23)$$

Buradaki L, genellikle cm olarak kolon dolgusunun uzunluğudur. Tabaka yüksekliği, teorik tabakanın eşdeğer yüksekliği TTEY, olarak da bilinmektedir. Aynı zamanda, bir kolonda tabakaların sayısının artması ve tabaka yüksekliğinin azalmasıyla da verim artmaktadır.

Bir pik için alıkonma zamanı  $t_R$  ve pikin taban genişliği  $W$  zaman birimiyle ölçülmektedir. Buna göre, tabaka sayısı aşağıdaki basit ilişkiyle hesaplanabilir:

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (2.24)$$

Şekil 2.19'deki gibi  $W$ 'nin bulunması için standardın pik yüksekliği ve taban genişliğinin aynı şartlarda bulunması gerekmektedir.



Şekil 2.18. Bir kromatogramda pik yüksekliği ( $h$ ) ve taban genişliği ( $W$ ) bulunması

**Kolonun Ayırma Gücü;** Kolonun ayırma gücü (rezolüsyon)  $R_s$  değeri, kolonun A ve B gibi iki analiti ayırma gücünün kantitatif ölçüsüdür. Buna göre, kolonun ayırma gücü,

$$R_s = \frac{2\Delta t_R}{(W_A + W_B)} = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{(W_A + W_B)} \quad (2.24)$$

şeklinde verilir. Rezolüsyon 1,5 veya daha büyük değerde olursa, pikler iyi ayrılır. Bir kolonun ayırma gücü ile kolonda bulunan iki çözünen bileşen için kapasite ve seçicilik faktörleri ve ayrıca tabaka sayısı arasındaki ilişkiyi veren bir eşitlik türetilmiştir.

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left( \frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \left( \frac{k'_B}{1+k'_B} \right) \quad (2.25)$$

Verimlilik Seçicilik Kapasite

Burada,  $k'_B$  daha yavaş ilerleyen tür için kapasite faktörü,  $\alpha$  ise seçicilik faktörüdür. Bu eşitlik düzenlenerek, arzulanan bir ayırım için gereken tabaka sayısını verecek şekilde düzenlenirse aşağıdaki bağıntı elde edilir.

$$N = 16 R_s^2 \left( \frac{\alpha-1}{\alpha} \right)^2 \left( \frac{1+k'_B}{k'_B} \right)^2 \quad (2.26)$$

### 2.2.3.2. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

Sıvı kromatografisi (LC) yöntemleri arasında geniş bir uygulama alanına sahip olduğu için en fazla kullanılan Yüksek Basınçlı (Performanslı) Sıvı Kromatografisidir (High Performance Liquid Chromatography) [41]. Klasik sıvı kromatografisinde, numune ve hareketli faz kolonun üstünden ilave edilir. Hareketli fazın kolondan aşağıya inmesi esnasında, numunedeki bileşenlerin bantlar halinde ayrılmaları sağlanır. Bantların iyi ayrılmamaları durumunda, daha uzun kolonlar kullanılır. Fakat böyle durumlarda da saatlerce beklemek gerekir. Alternatif olarak kolondaki dolgu maddesi inceltirse bile yine çok uzun süre beklemek gerekmektedir. Bunları gören bilim adamları, başka yollar araştırmışlar ve sonunda kolonu uygun büyüklükte dolgu maddesiyle doldurarak kolonun üstünden yüksek basınç uygulayarak çok daha iyi sonuçlar almışlardır. Böylece küçük dolgu maddeleriyle doldurulmuş yüksek basınç altındaki bir kolonda yapılan kromatografi türüne, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi denilmiştir.

Yöntem son derece hassas olması, sıcaklığa karşı hassas olan maddelere bile uygulanabilmesi, doğruluk dereceleri ve kesinlikleri yüksek sonuçlar vermesi bakımından en çok kullanılan analitik ayırma yöntemleri arasında bulunmaktadır.

Gaz kromatografisi yöntemi, sadece uçucu bileşiklere uygulanabildiği halde, HPLC yöntemi uygun çözücü, kolon ve dedektör kullanılması durumunda bütün bileşiklere uygulanabilmektedir.

Ayırma işlemi, sabit faz ile hareketli (mobil) faz arasındaki göçe bağlı olduğundan, uygun bir hareketli ve sabit faz seçimi yapılarak, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi tekniği ile hem kalitatif hem kantitatif analizler yapmak mümkün olmaktadır. Kalitatif analizde amaç, numune karışımı içindeki bir bileşiğin teşhisini yapmak olduğundan, maddelerin bilinen alıkonma zamanları ile karşılaştırma yapılarak analiz yapılabilir. Kantitatif analizde ise, kromatografik sonuçlardan hareketle madde miktarının bulunması için bilinmeyen derişimdeki bir bileşiğin, bilinen bir çözelti içinde tanımlanması yapılmaktadır.

Bu amaçla kullanılan iki farklı yöntemden birisi olan eksternal standart analiz yönteminde, bilinen konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanarak, alınan cevap, pik yüksekliği veya pik alanına göre tayin edilir. Bilinen miktarların cevabına karşı numunenin cevabı çizilerek tayin gerçekleştirilir. Piklerin zaman eksenindeki konumları numunedeki bileşikleri tanımak için piklerin altındaki alanlar ise her türün kantitatif tayini için kullanılır.

İnternal standart analiz yönteminde ise numune içinde olmayan, iyi karakterize edilmiş, saf ve kararlı olan bir bileşik, standart çözelti ve numune içine katılır. Daha sonra, internal standart ve analitin cevap oranı bulunarak, miktar oranına göre grafik edilir. Kullanılan internal standardın kimyasal ve fiziksel özellikleri, tayin edilecek bileşiğe yakın olmalı ve bu bileşik, diğer bileşiklerin piklerinden tamamen ayrı bir pik vermelidir [16].

Yaygın olarak kullanılan beş tür yüksek basınçlı sıvı kromatografi yöntemi vardır: 1) Dağılma veya sıvı-sıvı kromatografi; 2) Adsorpsiyon veya sıvı-katı kromatografi; 3) İyon değiştirici kromatografi; 4) Jel geçirgenlik kromatografi 5) Jel süzme kromatografisidir. Bu yöntemlerden son ikisi Boyut ayırıcı kromatografi olarak da bilinir. Sıvı kromatografi tiplerinin aslında uygulamalarda birbirini tamamlayan teknikler olduğu bilinmektedir. Örneğin; mol kütlesi 1000'den büyük olan

maddelerin analizinde, iki boyut ayırıcı yönteminden biri olan jel geçirgenlik yöntemi apolar maddeler için; jel süzme yöntemi ise, polar ve iyonik maddeler için kullanılmaktadır. Mol kütlesi daha düşük olan iyonik türlerin analizinde ise, iyon değiştirici kromatografi genellikle tercih edilen yöntemdir. İyonik olmayan küçük polar türler ise en iyi şekilde dağılma yöntemleri ile analiz edilir. Geniş bir uygulama alanına sahip olduğu için, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, ayırma teknikleri içerisinde en çok kullanılanıdır.

Bütün sıvı kromatografi teknikleri arasında en yaygın olarak kullanılan dağılma kromatografisidir. Bu teknik sıvı-sıvı kromatografi sıvı bağlı faz kromatografi olmak üzere iki alt sınıfa ayrılabilir. İki teknik arasındaki fark, katı parçacıklar yüzeyine durgun fazın tutturulmasındaki metot farkından kaynaklanır. Sıvı-sıvı tekniğinde durgun faz katı yüzeyine fiziksel adsorbsiyonla; bağlı faz tekniğinde ise, kovalent bağlarla tutturulur.

Bağlı faz dolgu maddelerinin çoğu bir organoklorosilanın, sıcak seyreltik hidroklorik asit çözeltisinde hidrolizlenerek yüzeyine -OH grubu bağlanmış silisyum dioksit ile reaksiyona sokulmasıyla hazırlanır. Bu reaksiyon sonucunda oluşan ürün bir organosiloksandır. Bağlı faz dolgu maddeleri, fiziksel olarak yüzeye tutturulmuş dolgulara göre daha kararlı olma gibi bir üstünlüğe sahiptir.

Normal faz kromatografide, polar sabit faz ve apolar veya düşük polariteye sahip hareketli faz kullanılır. Normal faz kromatografide polarlığı en az olan bileşen kolondan ilk önce çıkar; hareketli fazın polarlığı arttıkça elüsyon zamanı da azalır. Ters faz kromatografide ise, sabit faz apolar, hareketli faz ise polardır. Ters-faz tekniğinde, aksine polarlığı en çok olan bileşen kolondan ilk önce çıkar ve hareketli fazın polarlığı arttıkça elüsyon zamanı da artar. Normal faz kromatografide, sıvı fazın kontrolü çok önemli ve kritiktir. Hareketli faz bileşimindeki küçük değişiklikler kromatogramda belirgin farklılıklara neden olabilir. Normal faz kromatografide dengeye ulaşma ve polar maddelerin elüsyonu çok yavaştır ve yayvan piklere sebep olur. Apolar çözücüler çok pahalıdır ve ayrıca nemden uzak tutmak zordur.

Yüksek performanslı adsorpsiyon kromatografisindeki çalışmalar, analitin bir katı yüzeyinde adsorpsiyonuna dayanır. Bu durumda durgun faz, çok ince toz haline getirilmiş polar katı yüzeyidir. Bu tür dolgularda analit, dolgu maddesinin yüzeyinde hareketli faz ile adsorpsiyon yarışına girer. Kolondaki tutulma zamanı, analitin yüzeydeki adsorpsiyon kuvvetlerine bağlıdır. Adsorpsiyon kromatografisinde durgun faz olarak genellikle ince toz haline getirilmiş silis ve alümina kullanılır. Adsorpsiyon kromatografisinin uygulamaları sıvı-katı HPLC, daha çok mol kütleleri 5000'den daha az, nispeten apolar ve suda çözünmeyen organik maddelerin ayırmalarında kullanılmaktadır.

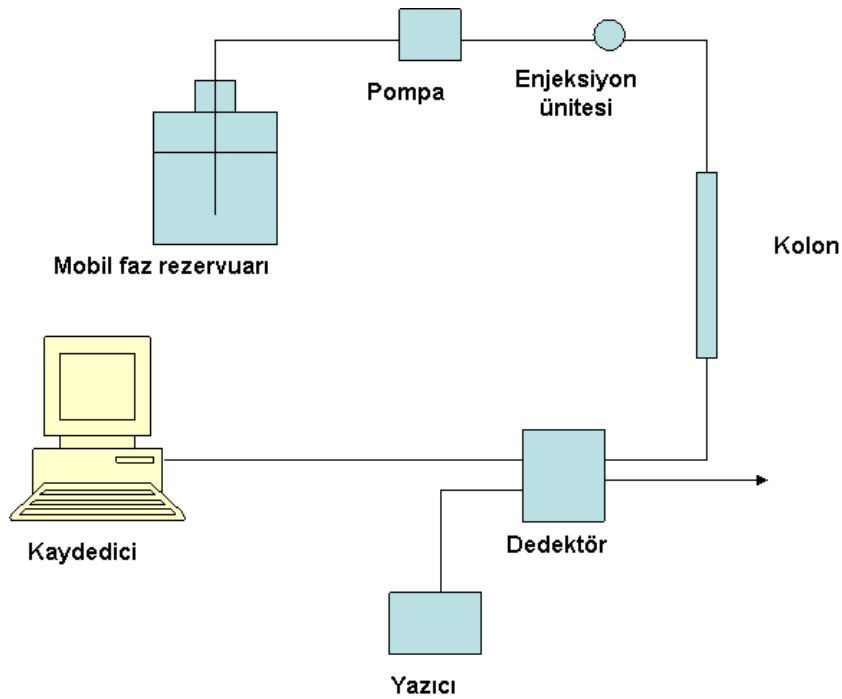
İyon kromatografisinde durgun faz olarak iyon değiştirici reçineler kullanılır. Bu teknikte, çok ince bir şekilde öğütülerek toz haline getirilmiş reçineyle doldurulan kolonlarda elüsyonla aynı yüklü iyonlar birbirinden ayrılabilir. Sentetik iyon değiştirici reçineler, moleküllerinde çok çeşitli iyonik fonksiyonlu gruplar bulunduran ve molekül ağırlığı yüksek olan polimerik maddelerdir. İyon kromatografisinde analit iyonları, uygun bir iyon değiştirici reçine ile doldurulmuş bir kolonun üstünden ilave edilir. Sonra reçine yüzeyindeki yüklü gruplara bağlanmak için analit iyonları ile yarışan bir iyon içeren çözelti ile elüsyon yapılır. Örneğin klorür, tiosiyanat, sülfat ve fosfat gibi anyonlar, bazik formdaki bir anyon değiştirici reçine üzerinde ayrılabilirler. Bu ayırma işleminde kolonun üst kısmına önce numune konur. Kolondaki anyonlar, reçine tarafından tutulurlar. Daha sonra bir seyreltik baz çözeltisi ile elüsyon işlemi yapılarak anyonlar serbest hale getirilir. İyon kromatografisinin çekici yönlerinden biri, iletkenlik ölçümlerinin, elüsyon ile ayrılan türlerin tanıma ve konsantrasyonlarının tayininde hemen hemen bütün iyonlara uygulanabilen genel bir metot olmasıdır.

Boyut ayırıcı veya jel kromatografi, sıvı kromatografi tekniklerinin en yenisidir. Özellikle, yüksek molekül ağırlığı türlere uygulanan çok etkili bir tekniktir. Boyut ayırıcı kromatografide dolgular küçük boyutlu (% 10  $\mu\text{m}$ ) silis veya polimer parçacıklarıdır. Bu dolgular ile çözünen madde ve çözücü moleküllerinin difüzlenebileceği düzgün gözenekli bir ağ oluşturulur. Bu gözeneklerde moleküller, hareketli fazın akışı esnasında etkin bir şekilde tutulur ve sonra bırakılır. Boyut ayırıcı kromatografinin tipik uygulamaları; molekül ağırlığı 1000'den büyük olan

molekülleri tutmayan hidrofilik dolgu maddeleri kullanılması (jel süzücü kromatogramı) ve bir diğer uygulaması ise; elüentin tetrahidrofuran olduğu hidrofobik dolgulu kolonla alınmasıdır (jel geçirgenlik kromatografisi). Boyut ayırıcı kromatografinin diğer bir önemli uygulaması da polimerlerin veya doğal maddelerin, molekül ağırlıklarının dağılımının hızlı bir şekilde tayinidir. Bu tür analizlerde numunenin elüent hacmi, analitle aynı kimyasal özelliklere sahip standart maddelerin elüent hacmi ile karşılaştırılır.

### 2.2.3.3. HPLC cihazı

Mobil faz rezervuarı, pompa, enjeksiyon ünitesi, kolon, dedektör, yazıcı ve kaydediciden ibaret olan HPLC sistemi şematik olarak Şekil 2.19’da görülmektedir.



Şekil 2.19. HPLC cihazının şematik olarak görünüşü

Hareketli faz kapları ve çözücü muamele sistemleri olarak modern bir HPLC cihazında bir veya daha çok cam veya paslanmaz çelik kaplar bulunur. Bunların her biri 500 ml’den daha fazla çözücü alacak kapasiteye sahiptir. Çözücü sıvılarda bulunabilecek tozları veya çözülmüş gazları gidermek için de önlemler alınır. Çözülmüş gazlar kolonlarda kabarcıklar oluşturarak pik genişlemesine yol açar.



Ayrıca gerek gaz kabarcıkları gerekse tozlar, dedektörlerle girişim yaparak bunların performansını azaltır. Gaz gidericilerde bir vakum pompa sistemi, bir damıtma sistemi, ısıtıcı ve karıştırıcı cihaz veya çözünmüş gazı hareketli fazda çözünmeyen bir gaz yardımıyla sürükleyerek gideren bir süpürme sistemi bulunur.

Sabit bileşimli tek bir çözücü ile (örneğin; % 50 etanol ve % 50 su) yapılan elüsyon izokratik elüsyon olarak adlandırılır. Polarlıkları birbirinden farklı iki (veya bazen daha fazla) çözücü sistemlerinin kullanıldığı tekniğe de gradiyent elüsyon denir. Bu elüsyon türünde çözücünün bileşimi, programlanarak devamlı veya basamaklı olarak arttırılabilir. İki veya daha fazla çözücünden belirli oranlarda gelen hacimler bir sistemle karıştırılır ve bu şekilde ayırma gücünü arttırır.

Sıvı kromatografide kullanılan pompa sistemlerinde şu özellikler bulunmalıdır: 1) 6000 psi'ye kadar basınçlar oluşturulabilmeli, 2) pulssuz sıvı çıkışı bulunmalı, 3) akış hızı 0,1'den 10 ml/dk'ya kadar ayarlanabilmeli, 4) sıvı akış hızlarının tekrarlanabilirliği % 0,5 veya daha iyi olmalı ve 5) çok sayıda çözücünün korozyon etkisine karşı dayanıklı olmalıdır.

İki tip pompa kullanılır. Bunlar; vidalı şırınga ve reciprocating pompalardır. Birincisi akış hızı kolayca kontrol edilebilen pulssuz bir sıvı çıkışı oluşturur. Ancak hem kapasiteleri sınırlıdır ( $\approx 250$ ), hem de değişik çözücü sistemlerinin kullanımına uygun değildir. Daha yaygın olarak kullanılan reciprocating pompalarda genellikle küçük bir silindirik bölme bulunur ve bu bölme bir pistonun ileri-geri hareketiyle doldurulur ve boşaltılır. Bu pompalama hareketi sonucunda pulslu bir akış meydana gelir. Bu pulslu akış daha sonra düzeltilerek sürekli bir akışa dönüştürülür.

Bazı cihazlarda ise pinömatik pompalar da bulunur. Bu pompaların en basitinde, sıkıştırılmış bir gazla basınç uygulanabilen büyük bir kabın içerisine yerleştirilmiş kırılabilir çözücü kabı vardır ve bu tür pompalar ucuz basit olup ve pulssuz çıktıya uygundur. Ancak, kapasiteleri ve basınçları sınırlıdır. Ayrıca pompalama hızı çözücü viskozitesinden etkilenir. Üstelik gradiyent elüsyon tekniğine uygun değildir.

Numune enjeksiyon sistemi; sıvı kromatografisinde, elastomerik bir septum içinden şırınga ile enjeksiyon oldukça sık kullanılmasına rağmen, bu işlemin tekrarlanabilirliği düşüktür ve 1500 psi'den daha düşük basınçlarda kullanılabilir. Akış-durdurma enjeksiyon sistemlerinde ise, çözücü akışı ani olarak durdurulabilmekte ve kolon ucundaki bağlantı elemanı çıkartılarak numune, bir şırınga yardımıyla dolgu kolona doğrudan enjekte edilmektedir. Sıvı kromatografisinde numunenin kolona enjeksiyonu daha çok numune uygulama luları ile yapılır. Programlanabilen otomatik enjeksiyon sistemleri (otosampler) ile oldukça küçük miktarda ve istenilen sayıda enjeksiyon yapılabilir.

Yüksek basınçlı sıvı kromatografi kolonları, genellikle paslanmaz çelik borulardan imal edilir. Düşük basınçlı (<600psi) sistemlerde ise et kalınlığı fazla olan cam borularda kullanılabilir. Kolonların uzunluğu 10-30 cm ve iç çapı 4-10 mm civarındadır. Kolon dolgu maddelerinin parçacık boyutu 5-10 µm kadardır. Bu tip kolonların 1 metresinde 40000-60000 kadar tabaka bulunur. Son yıllarda uzunluğu 3-7,5 cm ve iç çapı 1-4,6 mm olan yüksek basınçlı mikro kolonlar da imal edilmeye başlanmıştır. Bu mikro kolonlar ile çok az miktarda çözücü ile hızlı bir şekilde ayırma yapılabilir. Sıvı kromatografisinde kullanılan en yaygın kolon dolgu maddeleri silisyum dioksittir. Mikrodan daha küçük boyutlardaki silisyum dioksit parçacıklarının aglomerasyonu, daha büyük ve yaklaşık aynı boyutlarda parçacıklar elde edilir. Hazırlanan parçacıkların yüzeyi, genellikle bu yüzeye fiziksel veya kimyasal bağlarla bağlanmış ince bir organik filmle kaplanır. Alümina parçacıkları, gözenekli polimer parçacıkları ve iyon değiştirici reçineler de dolgu maddesi olarak kullanılabilir. Kılavuz kolonlar, analitik kolonun giriş kısmına takılarak çözücülerden gelebilecek toz ve kirlilikleri tutmak suretiyle kolonun ömrünü uzatırlar.

Birçok çalışmada kolon sıcaklığının hassas bir şekilde kontrol edilmesine ihtiyaç duyulmaz ve oda sıcaklığında çalışılır. Modern cihazların birçoğunda, kolon sıcaklığını oda sıcaklığından 150 °C'a kadar onda bir derece mertebesinde kontrol etmek için ısıtıcı sistemleri bulunur. Kolon sıcaklığını iyi bir şekilde kontrol etmek için kolon ısıtıcıları (kolon termostatları) bulunur.

Dedektörler; sıvı kromatografisinde en çok kullanılan dedektörler, ultraviyole ve görünür ışığın absorpsiyonuna dayanırlar. Piyasada, kromatografik kolonlara takılarak kullanılacak şekilde özel olarak tasarlanmış fotometreler ve spektrofotometreler bulunmaktadır. Birçok organik madde ultraviyole bölgesinde absorpsiyon gösteren fonksiyonlu gruplar bulundurduğu için, fotometrelerde 245 nm ve 280 nm dalga boyunda ışın veren civa lambaları kullanılır. Girişim yapan maddenin türü kolay bir şekilde tespit edilir. Bazı modern cihazlarda birçok girişim filtresi bulunduran tekerlek şeklinde filtreler bulunur. Amaca göre bunlardan uygun olanı kolay bir şekilde seçilebilir. Spektrofotometrik dedektörler, fotometrik dedektörlere göre yüksek basınçlı sıvı kromatografisi cihazlarında daha yaygın olarak kullanılır. Diyod sistemli bu cihazlarla bazen kolonda bulunan bütün maddelerin spektrumlarını görmek mümkündür [42].

Işın kaynağı olarak, civa lambasından başka döteryum ve tungsten lambaları da kullanılabilir. HPLC cihazlarından pek çoğu da monokromatörlü UV absorbans dedektörü (bir spektrofotometre) ihtiva ederler. Bunlardan bazıları sadece UV alanında, bazıları da hem UV hem de görünür alanda kullanılırlar. UV-Vis, bölgede, diyot serisinden meydana gelen değişken dalga boylu bir diyot array dedektör (DAD) kullanılarak kolonda bulunan bütün maddelerin spektrumlarını görmek mümkün olur. Böyle bir dedektör, bir spektrumla ilgili bütün bilgileri bir saniyede toplayabilir ve her pike ait bilgiler bilgisayarda depolanır. Bu tip bir dedektörle üç boyutlu spektrumlar alınabilir, aynı anda spektrumun bütün dalga boylarındaki piklerin ölçümü yapılabilir ve tek bir enjeksiyonla maksimum dalga boyları saptanabilir. Döteryum lambadan gelen UV ışık demeti, dalga boylarına ayrılmadan önce akış hücresinden geçer. Grating mekanizmasından geçtikten sonra yerleştirilen yüzeylerce foto diyot dizisi ile istenilen her dalga boyunda kromatogram elde edilebilmektedir. Spektrumların çakıştırılması yöntemiyle de pik saflığının tespitini yapabilen DAD dedektörü ile bütün UV-Vis, bölgede çalışmak mümkün olmaktadır. Dalga boyu aralığı ise, 190-900 nm (tungsten ve döteryum lambaları) arasındadır [40].

Geniş kullanım alanı bulan diğer bir dedektör türü de, çözücünün kırma indisinin analit molekülleri tarafından değiştirilmesine dayanır. Diğer bütün dedektörlerin

aksine kırma indisi dedektörleri hemen hemen bütün maddelere cevap veren genel amaçlı dedektörlerdir. Bu dedektörlerin tek sakıncası duyarlılığının biraz daha düşük olmasıdır. Potansiyometrik, kondüktometrik ve voltametrik ölçümlere dayanan çeşitli elektrokimyasal dedektörler de kullanılmaktadır [42].

#### **2.2.3.4. Kromatografik şartlar**

Geliştirilen HPLC yöntemi için izokratik pompa sistemi kullanılarak, UV-DAD dedektörüyle 200-400 nm arası bölge taratılmış ve Sibutramin'in 224 nm'de maksimum absorbands gösterdiği tespit edilmiştir. 212, 224, 229, 254, 256 ve 271 nm dalga boylarının her birinde ayrı ayrı kromatogramlar alınmış ve en uygun dalga boyu olarak 224 nm'de bütün kromatogramlar kaydedilmiştir. HPLC sisteminde yapılan denemeler sonucunda, C<sub>18</sub> ters-faz kolonu kullanılarak, 25 °C'lik kolon fırını sıcaklığı, 15 µl'lik enjeksiyon hacmi ve 1 ml dk<sup>-1</sup>'lık akış hızı sistem için en uygun şartlar olarak seçilmiştir. Bu şartlarda alınan kromatogramlardan Sibutramin için alıkonma zamanı (RT) 4,52 dk ve internal standart olan Donepezil için ise (RT) 2,87 dk olarak tespit edilmiştir. Mobil faz için metanol-fosfat tamponu, asetonitril-fosfat tamponu, metanol-asetonitril gibi yüzdesi farklı kombinasyonlar (50:50, 55-45, 60:40, 65-35, 70:30, 75-25, 80:20, 85-15, 90:10 gibi) kullanılarak optimize edilmiştir. Farklı mobil faz denemeleri sonucunda, en uygun izokratik mobil faz karışımı olarak tespit edilen 90:10 oranında metanol:asetonitril karışımı kullanılmıştır. Kolonu temizlemek için önce belli bir süre deiyonize su ile kolon yıkanarak, daha sonra da 70:30 oranında metanol-deiyonize su karışımı ile yıkama periyodu tamamlanmıştır. Hazırlanan mobil faz ve diğer bütün organik çözücüler 0,47 µm'lik (nylon-47 mm) membran filtreden vakum altında süzöldükten sonra kullanılmıştır.

#### **2.2.3.5. Standartların hazırlanması**

Sibutramin stok çözeltisi 100 ml'de 25 mg olacak şekilde, mobil faz karışımı içerisinde (90:10, metanol:asetonitril) 250 µg ml<sup>-1</sup> olarak hazırlanmıştır. Standart çözeltiler ise 5-30 µg ml<sup>-1</sup> konsantrasyon aralığında hazırlanmış ve kalibrasyon eğrisi için bu stoktan 5, 10, 15, 20, 25, 30 µg ml<sup>-1</sup> olacak şekilde kısımlar alınarak mobil faz

ile seyreltilmiştir. Ana stoktan hazırlanan bu standartlar üzerine 1'er ml ( $15 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) internal standart çözeltisi eklenmiş ve her biri 25'er ml'ye tamamlanmıştır.

İnternal standart olarak kullandığımız Donepezil standardından da 37,5 mg tartılarak mobil faz ile 100 ml'ye tamamlanmış,  $375 \mu\text{g ml}^{-1}$  olacak şekilde bir stok hazırlanmıştır. Bu çözeltiden 1 ml alıp 25 ml'ye tamamlayarak  $15 \mu\text{g ml}^{-1}$ 'lik internal standart çözeltisi hazırlanmıştır.

Geri kazanım çalışmaları için aynı Sibutramin stok çözeltisinden yeni standartlar hazırlanmıştır (5-7,5-10-12,5-15-17,5-20-25-30  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). Ana stoktan hazırlanan bu kısımlar üzerine 1'er ml ( $15 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) internal standart çözeltisi eklenmiş ve her biri 25'er ml'ye mobil faz ile tamamlanmıştır.

Hazırlanan bütün standartlar, kullanılıncaya kadar  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabında saklanmış ve kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirilerek vorteks ile 5-10 dk ile karıştırılıp kullanılmaya hazır hale getirilmiştir.

#### **2.2.3.6. Ticari numunelerin hazırlanması**

Reductil (15 mg Sibutramin içeren) ticari kapsülünden  $150 \mu\text{g ml}^{-1}$  olacak şekilde mobil faz ortamında bir stok çözelti hazırlamak için, bu çözelti 5-10 dk vortekslenmiştir. Daha sonra iyice çözünen bu stok çözeltiden alınan belli bir miktar kısım  $15 \mu\text{g ml}^{-1}$  olacak şekilde 25 ml'ye mobil faz ile seyreltilmiş ve aynı şekilde toplam 6 ticari kapsül standardı hazırlanmıştır. Her bir ticari numuneye yine 1'er ml ( $15 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) internal standart çözeltisinden ilave edilmiştir.

#### **2.2.3.7. Standart ekleme yöntemi kullanılarak standartların hazırlanması**

5 ayrı 25 ml'lik balon jöje içerisine Sibutramin stok çözeltisinden 2,5-5,7,5-10 ve  $12,5 \mu\text{g ml}^{-1}$  olacak şekilde ilave edilmiştir. Daha sonra aynı balon jöjelere ticari kapsül stok çözeltisinden 2,5-5,7,5-10 ve  $12,5 \mu\text{g ml}^{-1}$  olacak şekilde ilave edilmiş ve hepsinin toplam 15'er  $\mu\text{g ml}^{-1}$ 'lik standartlar olması sağlanmıştır. Ayrıca yine aynı balon jöjelerin her birine 1'er ml ( $15 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) Donepezil internal standart

çözeltisinden de katılmış ve daha sonra tüm standartlar 25 ml'ye metanol ile seyreltilmiştir.

### **2.2.3.8. Plazma standart numunelerinin hazırlanması**

Sağlıklı gönüllüden alınan dondurulmuş insan plazması numunesi, tezgâh üzerine doğal yoldan oda sıcaklığında çözülmesi için bekletilmiştir. Plazma numuneleri, in vitro olarak standart çözeltilerden plazma üzerine ilave edilmesi (spike) yöntemi ile hazırlanmıştır. 1'er ml insan plazması örneklerinin her birinin üzerine (n=6) 1'er ml de internal standart eklenmiştir. Daha sonra Sibutramin'in standart stok çözeltisinden 5, 10, 15, 20, 25, 30  $\mu\text{g ml}^{-1}$  olacak şekilde kısımlar alınarak plazma numunelerinin üzerine eklenmiş ve metanol ile 25 ml'ye seyreltilmiştir. Bütün plazma numuneleri 5-10 dk vorteks ile karıştırılmıştır. Daha sonrasında bu numunelerden santrifüj tüplerine alınan kısımlar, 5000 devir  $\text{dk}^{-1}$ 'da 20-30 dk santrifüjlenerek proteinlerin çökmesi sağlanmıştır. Böylece kolay bir şekilde ekstraksiyonsuz tüm plazma numuneleri hazırlanmıştır.

Plazmada geri kazanım çalışmaları için; 1'er ml plazma örnekleri üzerine Sibutramin stok çözeltisinden 5-7,5-10-12,5-15-17,5-20-25-30  $\mu\text{g ml}^{-1}$  olacak şekilde ilave edilmiştir. Yine bu standartlar üzerine 1'er ml (15  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) internal standart çözeltisi eklenerek, her biri 25'er ml'ye metanol ile tamamlanmıştır.

### **2.2.3.9. Plazma içeren ticari numunelerin hazırlanması**

1'er ml plazma örnekleri üzerine, Reductil (15 mg Sibutramin içeren) ticari kapsülünden hazırlanan stok çözeltilerden alınan 1'er ml'lik kısımlar eklenmiş ve her bir ticari numuneye yine 1'er ml (15  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) internal standart çözeltisinden ilave edilmiştir. Daha sonra 25 ml'ye metanol ile seyreltilmiş ve aynı şekilde toplam 6 ticari kapsül standardı hazırlanmıştır.

### **2.2.3.10. Plazma içerisinde standart ekleme metodu kullanılarak standartların hazırlanması**

5 ayrı 25 ml'lik balon jöje içerisine, 1'er ml plazma numunesi ve Sibutramin stok çözeltisinden 2,5-5,7,5-10 ve 12,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  olacak şekilde ilave edilmiştir. Daha sonra aynı balon jöjelere ticari kapsül stok çözeltisinden 2,5-5,7,5-10 ve 12,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  olacak şekilde ilave edilmiş ve hepsinin toplam 15'er  $\mu\text{g ml}^{-1}$ 'lik standartlar olması sağlanmıştır. Ayrıca yine aynı balon jöjelerin her birine 1'er ml (15  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) Donepezil internal standart çözeltisinden de katılmış ve daha sonra tüm standartlar 25 ml'ye metanol ile seyreltilmiştir.

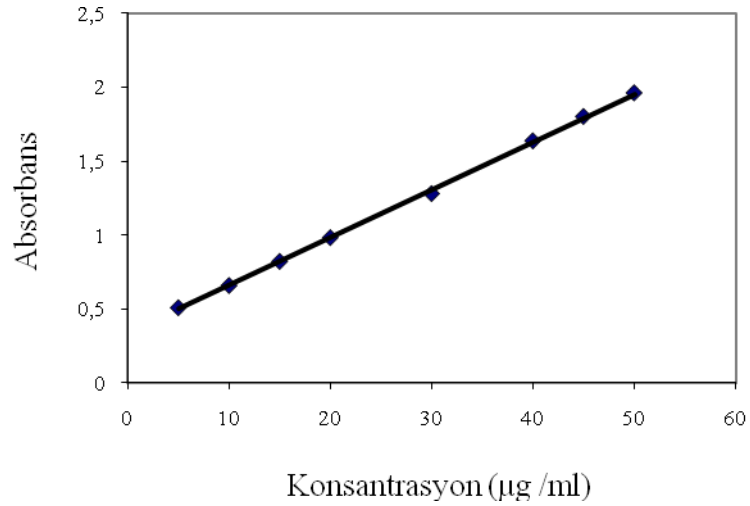
Hazırlanan bütün standartlar, kullanılıncaya kadar +4  $^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabında saklanmış ve kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirilerek vorteks ile 5-10 dk ile karıştırılıp kullanılmaya hazır hale getirilmiştir.

## BÖLÜM 3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### 3.1. Spektrofotometrik Yöntem ile Elde Edilen Bulgular

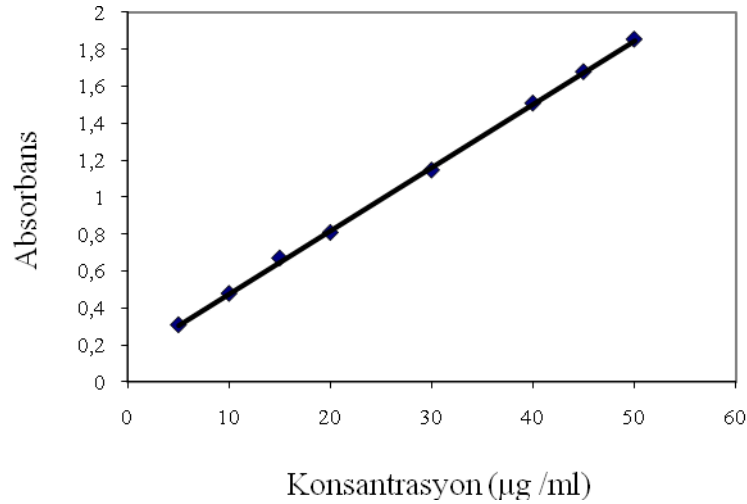
#### 3.1.1. Yöntem validasyonu

Çalışmanın optimum koşulları belirlendikten sonra, maksimum dalga boyu olarak tespit ettiğimiz 224 nm’de Sibutramin standardı için metanol ve su içerisinde ayrı ayrı olmak üzere 5-50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ lik konsantrasyon aralığında kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Bu eğriler, UV spektrumlarında okunan absorbands değerlerine karşı konsantrasyonlar grafik edilerek elde edilmiştir (Şekil 3.1 ve 3.2).



Şekil 3.1. Metanolde hazırlanmış standartlar için elde edilmiş kalibrasyon eğrisi





Şekil 3.2. Suda hazırlanmış standartlar için elde edilmiş kalibrasyon eğrisi

Veriler, en küçük kareler yöntemi kullanılarak lineer regresyon yöntemi ile analiz edilmiş ve elde edilen regresyon katsayılarının, oldukça iyi lineerlikler gösterdikleri tespit edilmiştir. Tablo 3.1’de görüldüğü gibi, kalibrasyon eğrileri için bulunan RSD değerlerinin, metanolde % 0,08-1,45 ve suda % 0,04-0,66 arasında değiştiği ve bu aralıkta tespit edilen RSD değerlerinin her iki çözücü ortamı için  $RSD \leq \% 1,45$  olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, sudaki RSD değerlerinin metanol ortamına göre daha küçük olduğu da görülmüştür. RSD değerlerinin küçük olması tekrarlanabilirlik ve kesinliğin yüksek olduğunu göstermektedir. Bu sebeple, UV çalışmaları için su ortamındaki kesinliğin daha yüksek olduğu söylenebilmektedir.

Tablo 3.1. Sibutramin için metanol ve su ortamında elde edilen kalibrasyon eğrisi parametreleri (n=6)

Çözücü Ortamı	Konsantrasyon Aralığı (µg ml <sup>-1</sup> )	Regresyon Eşitliği	Regresyon Katsayısı (r <sup>2</sup> )	RSD (%)*
Metanol	5-50	y= 0,0324x + 0,3358	r <sup>2</sup> = 0,9995	0,08-1,45
Su	5-50	y= 0,0343x + 0,1347	r <sup>2</sup> = 0,9996	0,04-0,66

\*RSD= Standart sapma / Ortalama değer x 100

Kesinlik tayininde, kalibrasyon eğrisi aralığından seçilen 3 farklı konsantrasyon için

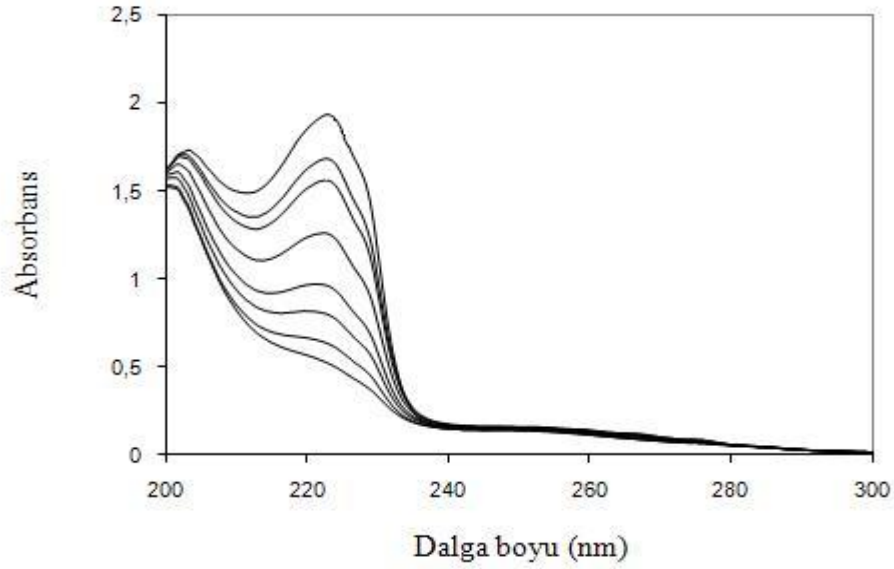
(15, 30 ve 45  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) okunan absorbanlar, 3 gün peş peşe (günler arası) ve bir gün içerisinde belirli aralıklarla 6 kez (gün içi) kaydedilmiştir. Metanol ve su ortamı için Tablo 4.2’de verildiği gibi,  $\bar{X}$ , SD ve RSD değerleri ayrı ayrı hesaplanarak yöntemin kesinliği kontrol edilmiştir.

Tablo 3.2. Sibutramin için gün-içi ve günler arası kesinlik değerleri (n=6)

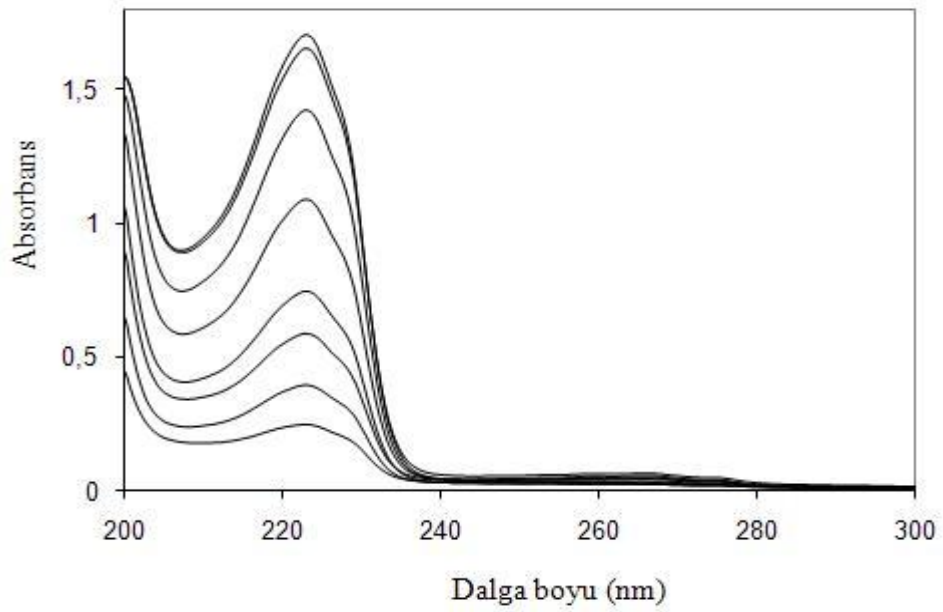
Kesinlik		Gün-içi			Günler-arası		
Ortam	Konsantrasyon ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Absorbans, Ortalama Değer ( $\bar{X}$ )	Standart Sapma (SD)	RSD (%)	Absorbans, Ortalama Değer ( $\bar{X}$ )	Standart Sapma (SD)	RSD (%)
Metanol	15	0,8217	$3 \cdot 10^{-4}$	0,04	0,8256	$1 \cdot 10^{-2}$	1,47
	30	1,2794	$1 \cdot 10^{-4}$	0,12	1,2973	$1 \cdot 10^{-2}$	1,11
	45	1,8003	$3 \cdot 10^{-4}$	0,19	1,8262	$5 \cdot 10^{-3}$	0,27
Su	15	0,6683	$3 \cdot 10^{-4}$	0,05	0,6748	$1 \cdot 10^{-2}$	1,56
	30	1,1447	$5 \cdot 10^{-4}$	0,48	1,1739	$1 \cdot 10^{-2}$	1,16
	45	1,6777	$2 \cdot 10^{-4}$	0,10	1,6840	$8 \cdot 10^{-2}$	0,47

Metanol içinde alınan ölçümlerden, gün-içi RSD’lerin % 0,04-0,19 arasında, günler arası RSD’lerin % 0,27-1,47 arasında ve su içinde ise gün içi RSD’lerin % 0,05-0,48, günler-arası RSD’lerin de % 0,47-1,56 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Hesaplanan bu değerlerden metanol için tayin edilebilen en düşük derişim, yani miktar tayin limiti olan LOQ değeri,  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$  ve tespit sınırı olan LOD ise  $1,2 \mu\text{g mL}^{-1}$  olarak bulunmuştur. Su için elde edilen LOQ değeri ise  $3,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  ve LOD değeri ise  $1,1 \mu\text{g mL}^{-1}$  olarak tespit edilmiştir. Her iki çözücü ortamı için gün-içi ve günler-arası RSD değerlerinin oldukça iyi kesinlikler verdiği olduğu ortaya çıkmıştır. Kesinlik tayini için gün-içi ve günler-arası ölçümlerdeki RSD’lerin < % 10 ve LOQ’nin de < % 20 olması ve ayrıca doğruluk için günler-arası ortalama değer  $\bar{X}$ , gerçek değerinin  $\pm$  % 15 içinde ve LOQ’nin de  $\pm$  % 20’den fazla sapmaması

koşulunu sağladığı tespit edilmiştir. Duyarlılık için ise, günler-arası RSD değerleri içinde, LOQ'in  $< \% 20$  olduğu ve değerlerin kendi aralarında tekrarlanabilirliği sağladığı da tespit edilmiştir.



Şekil 3.3. Sibutramin için metanol içerisinde alınmış UV spektrumları (5, 10, 15, 20, 30, 40, 45 ve 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ )



Şekil 3.4. Sibutramin için su içerisinde alınmış UV spektrumları (5, 10, 15, 20, 30, 40, 45 ve 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ )

### 3.1.2. Yöntem geliştirme

2 nm'lik bant genişliğinde, 200-400 nm dalga boyu aralığı taratılarak metanol ve su ortamında ayrı ayrı Sibutramin'in UV absorpsiyon spektrumları belirlenmiştir. Bu şartlarda her iki çözücü için de, iyi belirlenen tek bir maksimum absorbans piki gözlemlenmiş ve bütün spektrumlar alınırken maksimum dalga boylarında çok fazla kayma görülmemiştir. İki ayrı çözücü için en yüksek absorbansı gösteren konsantrasyonlardaki dalga boyları,  $\lambda_{\max}$  olarak kabul edilmiş ve buna göre bütün absorbans ölçümleri, metanol ve su için 224 nm dalga boyunda alınmıştır.

### 3.1.3. Ticari preparatlarda miktar tayini

Tablo 3.3'de, etken maddesi Sibutramin Hidroklorür Monohidrat olan 15 mg'lık Reductil adındaki ticari kapsülden metanol ve su ortamında hazırlanan standartlardan elde edilen geri kazanım ve bağıl hata verileri kaydedilmiştir. Tablo'ya bakıldığında metanol ve su ortamlarının her ikisinde de elde edilen geri kazanımların oldukça iyi sonuçlar verdikleri görülmektedir. Tablo 3.4'de ise iki çözücü ortamı için student-t testi ile kıyaslanmış ve elde edilen istatistiksel verilerden hesaplanan t değerinin tablodan bulunan t değerinden daha büyük olduğu, böylece her iki çözücü ortamı arasında fark olduğu ortaya çıkmıştır.

Tablo 3.3. Metanol ve su ortamında Sibutramin içeren ticari kapsüllerden elde edilen geri kazanım değerleri (n=6)

Bilinen Ortalama Kons. ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Metanol			Su		
	Bulunan Ortalama Kons. ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Doğruluk Bağıl hata* (%)	Geri Kazanım** (%)	Bulunan Ortalama Kons. ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Doğruluk Bağıl hata* (%)	Geri Kazanım** (%)
15	14,34	-4,39	95,60	14,33	-4,46	95,54
30	29,66	-1,13	98,86	28,43	-5,22	94,78
45	44,40	-1,32	98,67	44,07	-2,04	97,95

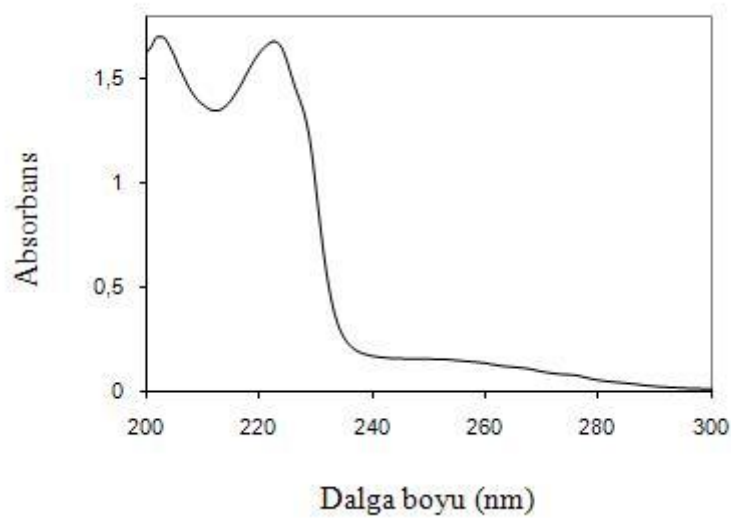
\*Bağıl Hata =  $\frac{\text{Bulunan miktar} - \text{Bilinen miktar}}{\text{Bilinen miktar}} \times 100$  \*\*Geri kazanım =  $\frac{\text{Bulunan miktar}}{\text{Bilinen miktar}} \times 100$

Tablo 3.4. Metanol ve su ortamında Sibutramin içeren ticari preparatlar için elde edilen istatistiksel değerlendirmeler ( $\alpha=0,05$ , % 95 güvenle) (n=6)

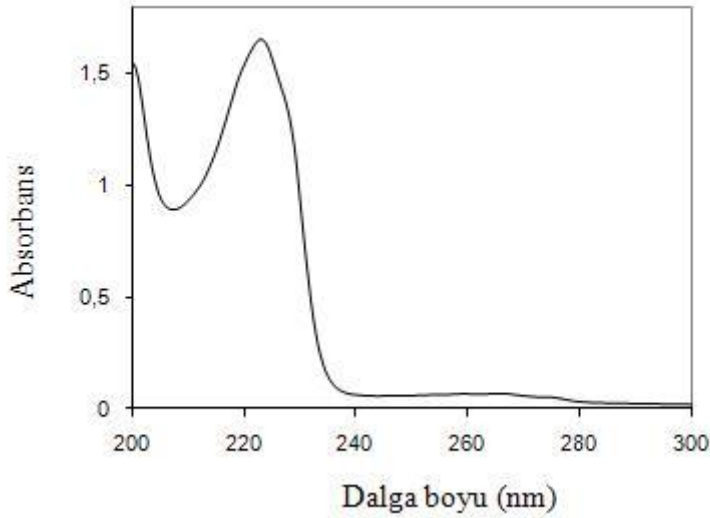
İstatistiksel Değerler	Metanol	Su	t-testi	
			t <sub>tablo</sub>	t <sub>hesaplanan</sub>
Deneme Sayısı (n)	6	6		
Ortalama Verim ( $\bar{X}$ , %)	0,7856	0,6385	2,23	3,14
Standart sapma (SD)	0,0105	0,0076		
Bağıl Standart sapma (RSD, %)	1,3401	1,1871		
Standart Hata*	0,0043	0,0031		

\*Standart hata = Standart sapma /  $\sqrt{n}$

Şekil 3.5 ve 3.6'da metanol ve su ortamında 45  $\mu\text{g ml}^{-1}$ 'lik ticari sibutramin numunesinin UV spektrumları görülmektedir.



Şekil 3.5. Metanol içerisinde 45  $\mu\text{g ml}^{-1}$ 'lik ticari sibutramin numunesinin UV spektrumu



Şekil 3.6. Su içerisinde  $45 \mu\text{g ml}^{-1}$ 'lik ticari sibutramin numunesinin UV spektrumu

### 3.1.4. Çözücülerin etkisi

Metanol ve su olmak üzere iki farklı çözücü ile çalışıldığından, her ikisi içinde tüm spektrumların yaklaşık  $224 \text{ nm}$ 'de maksimum dalga boyları gösterdikleri gözlenmiştir. Su, metanole göre daha polar bir çözücü olduğundan dolayı ayrıntılı yapılar gözükmemiş ve daha geniş spektrumlar vermiştir. Metanolün polaritesi sudan daha düşük ve dipol-dipol ve dielektrik etkileşimleri olmadığından dolayı, ince yapılar daha ayrıntılı görülebilmektedir.

## 3.2. Türev Spektroskopisinden Elde Edilen Sonuçlar

### 3.2.1. Yöntemin validasyonu

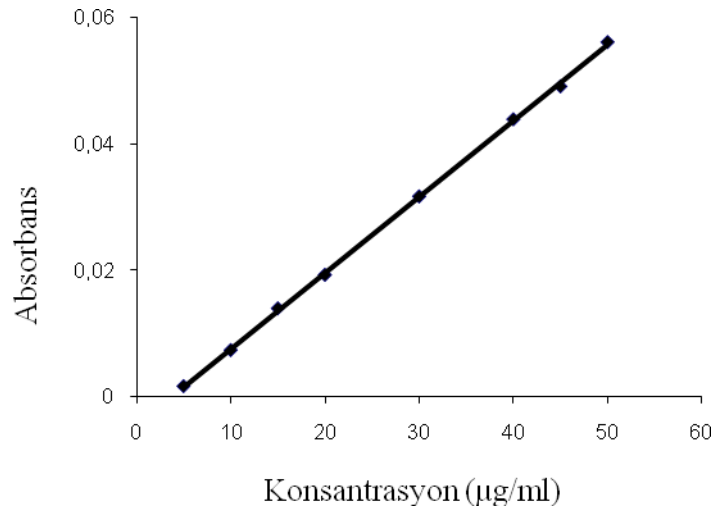
Sibutraminin birinci ve ikinci türev UV spektrumlarının standart kalibrasyon eğrileri, her iki çözücü ortamı için konsantrasyonlara karşı bulunan türev absorbans değerleri işaretlenerek elde edilmiştir. Sonuçlar, lineer regresyon yöntemi ile analiz edilmiş ve bütün kalibrasyon eğrileri,  $5-50 \mu\text{g ml}^{-1}$ 'lik konsantrasyon aralığı içerisinde, oldukça iyi bir lineerlikler göstermiştir. Metanol ortamında birinci ve ikinci türev için çizilen kalibrasyon eğrilerinden elde edilen regresyon eşitlikleri, regresyon katsayıları ve RSD değerleri Tablo 3.5'de verilmiştir.

Tablo 3.5. Metanol ortamında Sibutramin numuneleri için Türev Spektroskopisinden elde edilen kalibrasyon eğrisi parametreleri (5-50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  aralığında) (n=6)

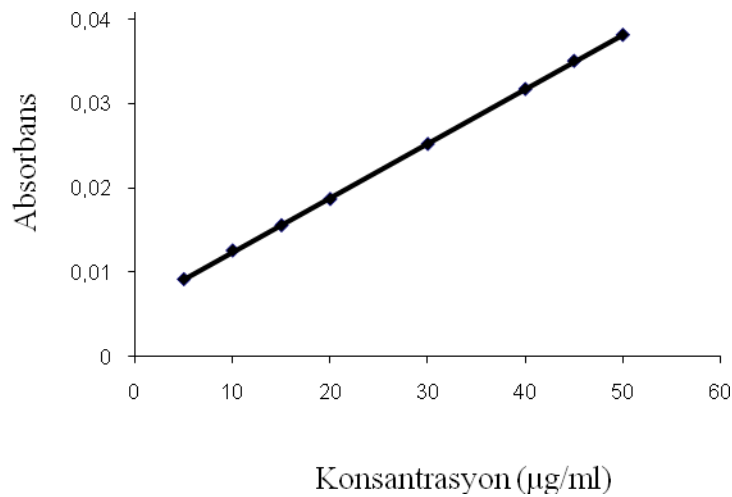
Parametreler	Minimum pik değeri ( $\lambda$ , nm)	Regresyon Eşitliği	Regresyon Katsayısı ( $r^2$ )	RSD (%)
Birinci Türev	230	$y=0,0047x+0,0076$	0,9996	0,12 – 2,30
İkinci Türev	232	$y=0,0013x-0,0025$	0,9996	0,26 – 6,82
Parametreler	Maksimum pik değeri ( $\lambda$ , nm)	Regresyon Eşitliği	Regresyon Katsayısı ( $r^2$ )	RSD (%)
Birinci Türev	217	$y=0,0012x-0,0045$	0,9997	1,24 – 2,80
İkinci Türev	223	$y=0,0006x+0,0059$	0,9999	0,90 – 3,00

Tablo 3.5’de görüldüğü gibi, bu iki türev spektrofotometrik yöntemde de, oldukça büyük regresyon katsayıları ( $r^2 > 0,9900$ ) ve % 0,12-6,82 arasında değişen oldukça iyi RSD değerleri elde edilmiştir. Kalibrasyon eğrileri karşılaştırılarak, regresyon katsayısı en büyük olan ve dolayısı ile kalibrasyon eğrisinin eğimi de daha büyük olan değerler (yani 217 ve 223 nm’deki değerler) daha hassas olacaklarından tercih edilmişlerdir. Metanol ortamında, birinci türev spektrofotometrisi için hassasiyetin daha fazla olduğu 217 nm’de LOQ değeri 3,16  $\mu\text{g ml}^{-1}$  ve LOD değeri ise 0,95  $\mu\text{g ml}^{-1}$  olarak tespit edilmiştir. İkinci türev spektrofotometrisi için de hassasiyetin daha fazla olduğu 223 nm’de LOQ değeri 1,82  $\mu\text{g ml}^{-1}$  ve LOD değeri ise 0,54  $\mu\text{g ml}^{-1}$  olarak tespit edilmiştir.

Şekil 3.7 ve 3.8’de metanol ortamında sırasıyla birinci ve ikinci türev spektrumlarından elde edilen kalibrasyon eğrileri görülmektedir.



Şekil 3.7. Metanol içerisinde birinci türev 217 nm dalga boyu için elde edilmiş kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.8. Metanol içerisinde ikinci türev 223 nm dalga boyu için elde edilmiş kalibrasyon eğrisi

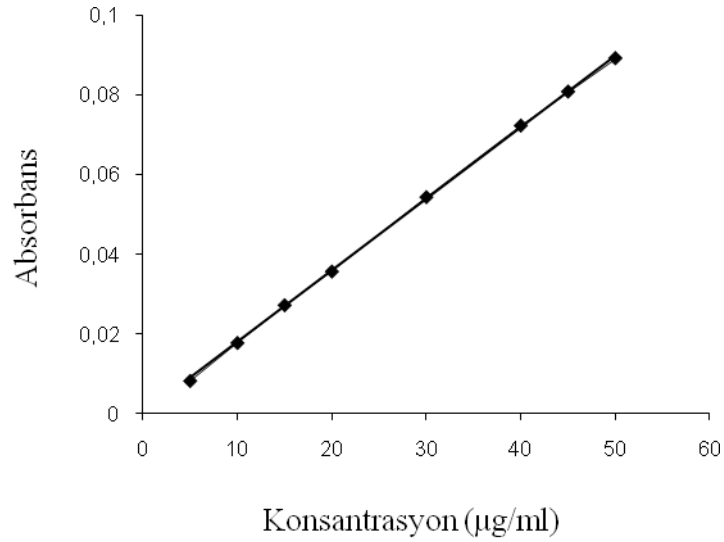
Tablo 3.6'da su ortamında birinci ve ikinci türev çalışmaları için çizilen kalibrasyon eğrilerinden elde edilen regresyon eşitlikleri, regresyon katsayıları ve RSD değerleri verilmiştir. % 0,30-6,07 arasında değişen oldukça iyi RSD değerleri bulunmuş ve böylelikle RSD'lerin < % 10 olması şartı da sağlanmıştır. Kalibrasyon eğrileri karşılaştırılarak, regresyon katsayısı en büyük olan ve dolayısı ile kalibrasyon eğrisinin eğimi de daha büyük olan değerler (yani 217 ve 223 nm'deki değerler) daha hassas olacaklarından tercih edilmişlerdir. Su ortamında, birinci türev



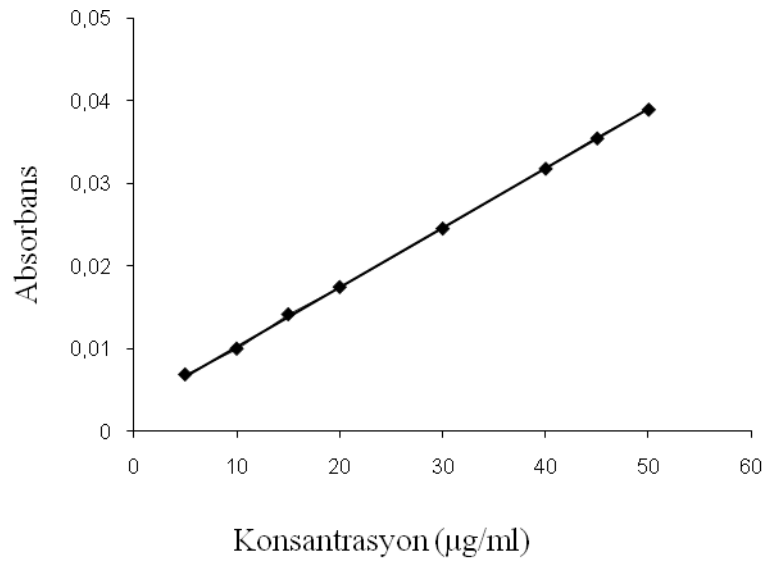
spektrofotometrisi için hassasiyetin daha fazla olduğu 217 nm’de LOQ değeri 2,69  $\mu\text{g ml}^{-1}$  ve LOD değeri ise 0,81  $\mu\text{g ml}^{-1}$  olarak bulunmuştur. İkinci türev spektrofotometrisi için de hassasiyetin daha fazla olduğu 223 nm’de, LOQ değeri 2,58  $\mu\text{g ml}^{-1}$  ve LOD değeri ise 0,77  $\mu\text{g ml}^{-1}$  olarak bulunmuştur.

Tablo 3.6. Su ortamında Sibutramin numuneleri için Türev Spektroskopisinden elde edilen kalibrasyon eğrisi parametreleri (5-50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  aralığında) (n=6)

Parametreler	Minimum pik değeri ( $\lambda$ , nm)	Regresyon Eşitliği	Regresyon Katsayısı ( $r^2$ )	RSD (%)
Birinci Türev	230	$y=0,0047x+0,0006$	0,9996	0,30 – 2,63
İkinci Türev	232	$y=0,0012x+0,0002$	0,9996	0,65 – 6,07
Parametreler	Maksimum pik değeri ( $\lambda$ , nm)	Regresyon Eşitliği	Regresyon Katsayısı ( $r^2$ )	RSD (%)
Birinci Türev	217	$y=0,0018x-0,0001$	0,9998	0,55 – 2,29
İkinci Türev	223	$y=0,0007x+0,0031$	0,9998	0,36 – 1,98



Şekil 3.9. Su içerisinde birinci türev 217 nm dalga boyu için elde edilmiş kalibrasyon eğrisi

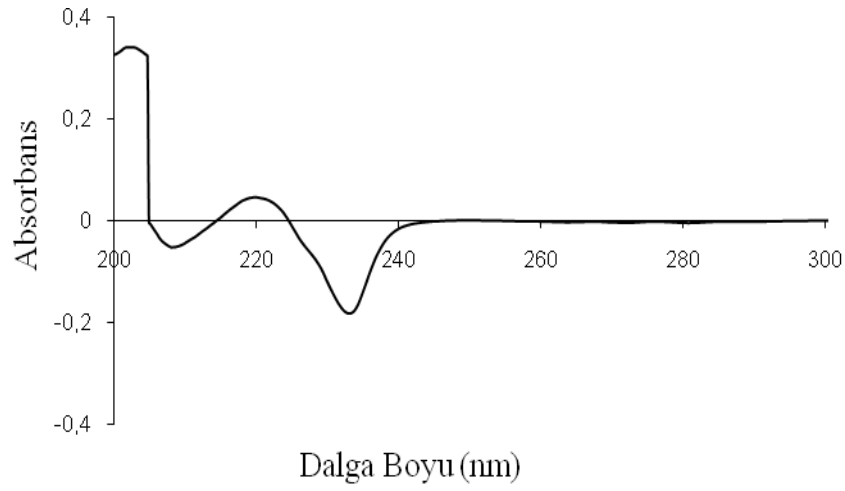


Şekil 3.10. Su içerisinde ikinci türev 223 nm dalga boyu için elde edilmiş kalibrasyon eğrisi

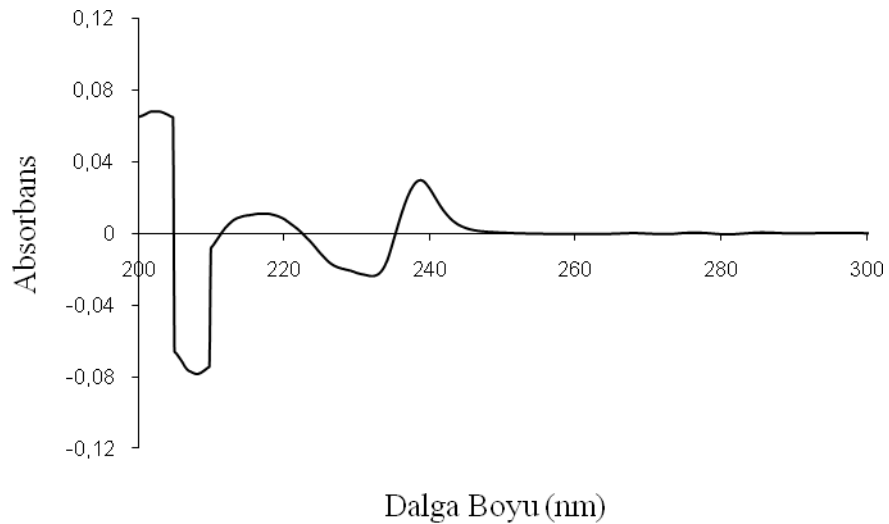
Şekil 3.9 ve 3.10'da su ortamında sırasıyla birinci ve ikinci türev spektrumlarından elde edilen kalibrasyon eğrileri görülmektedir.

Şekil 3.11'de metanol içinde  $45 \mu\text{g ml}^{-1}$ 'lik konsantrasyonda elde edilen birinci türev eğrisinde, 217 nm'de maksimum bir pik değeri, 230 nm'de minimum bir pik değeri ve Şekil 3.12'de metanol içinde yine  $45 \mu\text{g ml}^{-1}$ 'lik konsantrasyonda elde edilen ikinci türev eğrisinde de, 223 nm'de maksimum pik değeri, 232 nm'de ise bir minimum pik değeri gözlemlenmiştir. Yine Şekil 3.13'de su içinde  $45 \mu\text{g ml}^{-1}$ 'lik

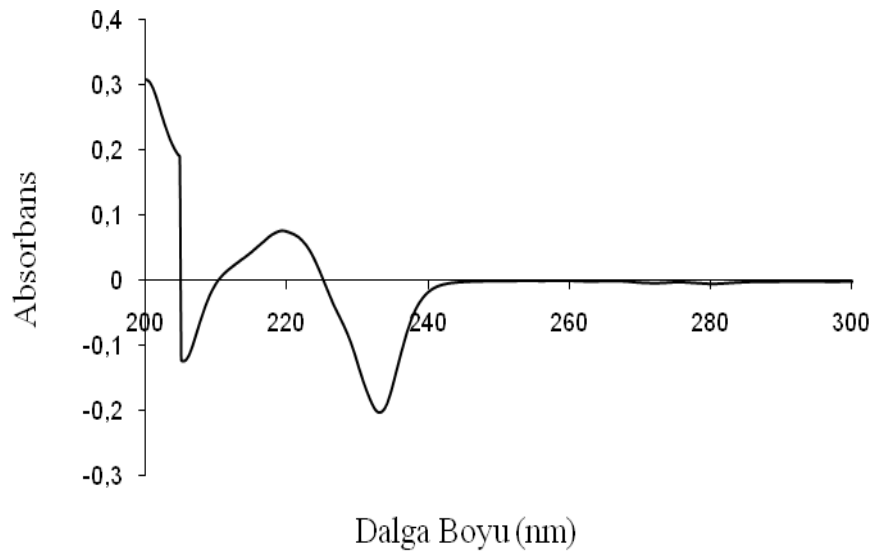
konsantrasyonda elde edilen birinci türev eğrisinde, 217 nm'de maksimum bir pik değeri, 230 nm'de minimum bir pik değeri ve yine Şekil 3.14'de su içerisinde  $45 \mu\text{g ml}^{-1}$  lik konsantrasyonda elde edilen ikinci türev eğrisinde de, 223 nm'de maksimum pik değeri, 232 nm'de ise bir minimum pik değeri gözlemlenmiştir.



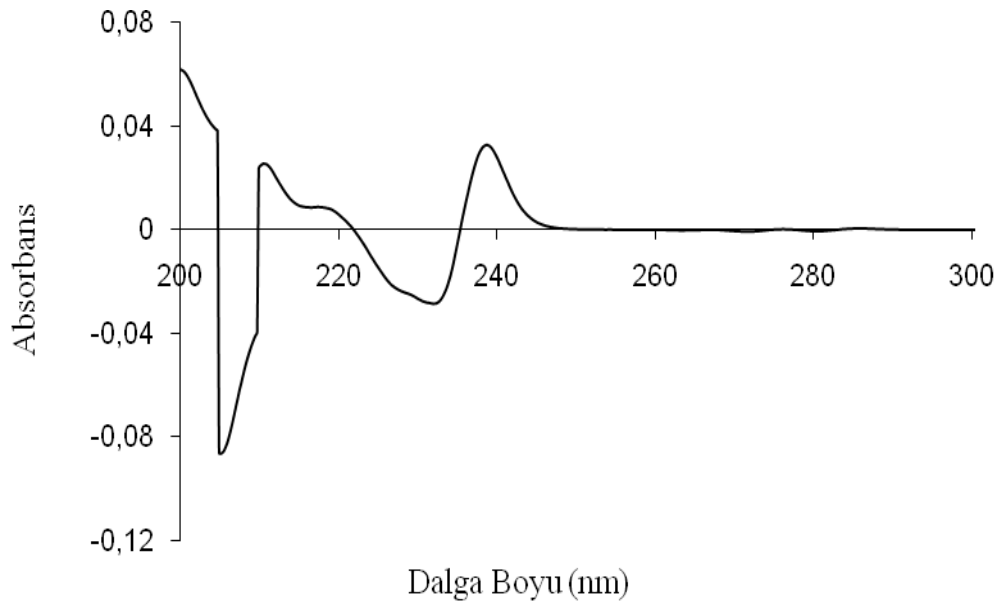
Şekil 3.11. Metanol ortamında sibutramin standartları için alınmış 1. türev spektrumu ( $45 \mu\text{g ml}^{-1}$ )



Şekil 3.12. Metanol ortamında sibutramin standartları için alınmış 2. türev spektrumu ( $45 \mu\text{g ml}^{-1}$ )



Şekil 3.13. Su ortamında sibutramin standartları için alınmış 1.türev spektrumu ( $45 \mu\text{g ml}^{-1}$ )



Şekil 3.14. Su ortamında sibutramin standartları için alınmış 2.türev spektrumu ( $45 \mu\text{g ml}^{-1}$ )

Metanol ve su ortamında,  $15$ ,  $30$  ve  $45 \mu\text{g ml}^{-1}$ 'lik Sibutramin konsantrasyonları, 3 farklı günde ve bir gün içinde 6 kez analiz edilerek gün-içi ve günler-arası kesinlik, doğruluk ve tekrarlanabilirlik değerleri de belirlenmiştir. Birinci ve ikinci türevler için elde edilen veriler, Tablo 3.7, 3.8, 3.9 ve 3.10'da görülmektedir. Elde edilen

bütün veriler, geliştirilen yöntemin iyi bir tekrarlanabilirliğe sahip olduğunu ve her iki çözücü ortamı için elde edilen RSD değerleri arasında farklar olduğunu göstermiştir. Hem metanol hem de su için bulunan tüm RSD değerlerinin % 3,63'den daha düşük olduğu ve bu tablolardan genellikle su içerisindeki RSD kesinlik değerlerinin metanol içerisindeki RSD değerlerinden daha küçük olduğu da tespit edilmiştir.

Tablo 3.7. Metanol ve su ortamında, Sibutramin için 217 nm'de Birinci Türev UV Spektroskopisi yönteminden elde edilen gün-içi ve günler-arası kesinlik değerleri (n=6)

Birinci Türev		Gün-içi			Günler-arası		
Ortam	Konsantrasyon ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Ortalama Absorbans Değeri (X)	Standart Sapma (SD)	RSD (%)	Ortalama Absorbans Değeri (X)	Standart Sapma (SD)	RSD (%)
Metanol	15	0,0139	$3 \cdot 10^{-4}$	2,27	0,0131	$4 \cdot 10^{-4}$	3,63
	30	0,0316	$7 \cdot 10^{-4}$	2,28	0,0315	$5 \cdot 10^{-4}$	1,60
	45	0,0489	$6 \cdot 10^{-4}$	1,24	0,0483	$4 \cdot 10^{-4}$	1,03
Su	15	0,0272	$6 \cdot 10^{-4}$	2,19	0,0279	$9 \cdot 10^{-4}$	3,30
	30	0,0543	$9 \cdot 10^{-4}$	1,71	0,0547	$9 \cdot 10^{-4}$	1,55
	45	0,0807	$4 \cdot 10^{-4}$	0,56	0,5579	$8 \cdot 10^{-4}$	0,83

Tablo 3.8. Metanol ve su ortamında, Sibutraminin 230 nm'de Birinci Türev UV Spektroskopisi yönteminden elde edilen gün-içi ve günler-arası kesinlik değerleri (n=6)

Birinci Türev		Gün-içi			Günler-arası		
Ortam	Konsantrasyon ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Ortalama Absorbans Değeri (X)	Standart Sapma (SD)	RSD (%)	Ortalama Absorbans Değeri (X)	Standart Sapma (SD)	RSD (%)
Metanol	15	0,0784	$1 \cdot 10^{-4}$	0,90	0,7845	$7 \cdot 10^{-4}$	0,94
	30	0,1470	$3 \cdot 10^{-3}$	1,83	0,1468	$7 \cdot 10^{-2}$	1,96
	45	0,2205	$2 \cdot 10^{-3}$	1,00	0,2145	$2 \cdot 10^{-3}$	0,97
Su	15	0,06715	$9 \cdot 10^{-4}$	0,81	0,0668	$6 \cdot 10^{-4}$	0,90
	30	0,1396	$2 \cdot 10^{-4}$	0,17	0,1314	$3 \cdot 10^{-3}$	1,77
	45	0,2117	$6 \cdot 10^{-4}$	0,31	0,2123	$4 \cdot 10^{-3}$	1,03

Tablo 3.9. Metanol ve su ortamında, Sibutraminin 223 nm'de İkinci Türev UV Spektroskopisi yönteminden elde edilen gün-içi ve günler-arası kesinlik değerleri (n=6)

İkinci Türev		Gün-içi			Günler-arası		
Ortam	Konsantrasyon ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Ortalama Absorbans Değeri (X)	Standart Sapma (SD)	RSD (%)	Ortalama Absorbans Değeri (X)	Standart Sapma (SD)	RSD (%)
Metanol	15	0,0155	$2 \cdot 10^{-4}$	1,63	0,0151	$3 \cdot 10^{-5}$	0,17
	30	0,0252	$4 \cdot 10^{-4}$	1,77	0,0250	$1 \cdot 10^{-4}$	0,69
	45	0,0350	$3 \cdot 10^{-4}$	0,95	0,0341	$1 \cdot 10^{-4}$	0,49
Su	15	0,0141	$2 \cdot 10^{-4}$	1,88	0,0140	$7 \cdot 10^{-5}$	0,53
	30	0,0245	$2 \cdot 10^{-4}$	1,16	0,0244	$2 \cdot 10^{-4}$	0,99
	45	0,03548	$2 \cdot 10^{-2}$	0,81	0,0352	$3 \cdot 10^{-4}$	0,30

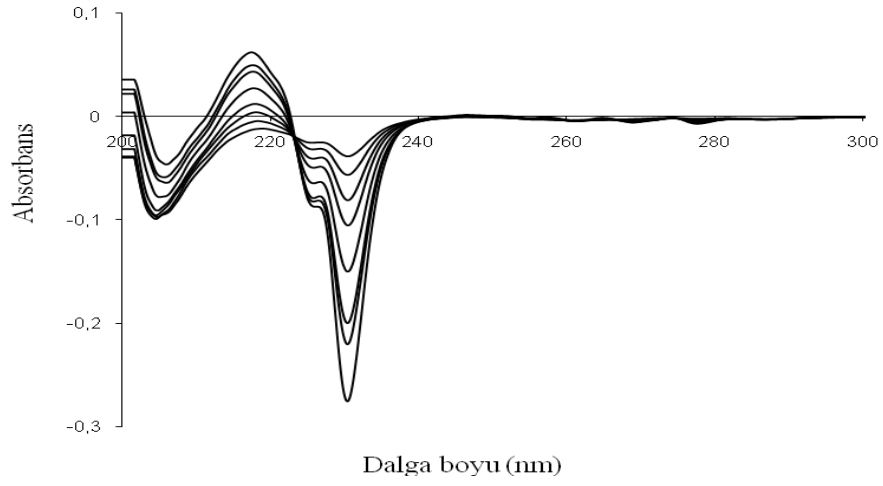
Tablo 3.10. Metanol ve su ortamında, Sibutraminin 232 nm'de İkinci Türev UV Spektroskopisi yönteminden elde edilen gün-içi ve günler-arası kesinlik değerleri (n=6)

İkinci Türev		Gün-içi			Günler-arası		
Ortam	Konsantrasyon ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Ortalama Absorbans Değeri (X)	Standart Sapma (SD)	RSD (%)	Ortalama Absorbans Değeri (X)	Standart Sapma (SD)	RSD (%)
Metanol	15	0,0175	$4.10^{-4}$	2,69	0,0173	$2.10^{-4}$	1,66
	30	0,0358	$9.10^{-5}$	0,26	0,0353	$2.10^{-4}$	0,83
	45	0,0561	$3.10^{-4}$	0,68	0,0566	$2.10^{-4}$	0,48
Su	15	0,0168	$2.10^{-4}$	1,35	0,0167	$2.10^{-4}$	1,65
	30	0,0347	$2.10^{-4}$	0,65	0,0347	$3.10^{-4}$	1,00
	45	0,0522	$9.10^{-4}$	0,37	0,0539	$7.10^{-4}$	0,46

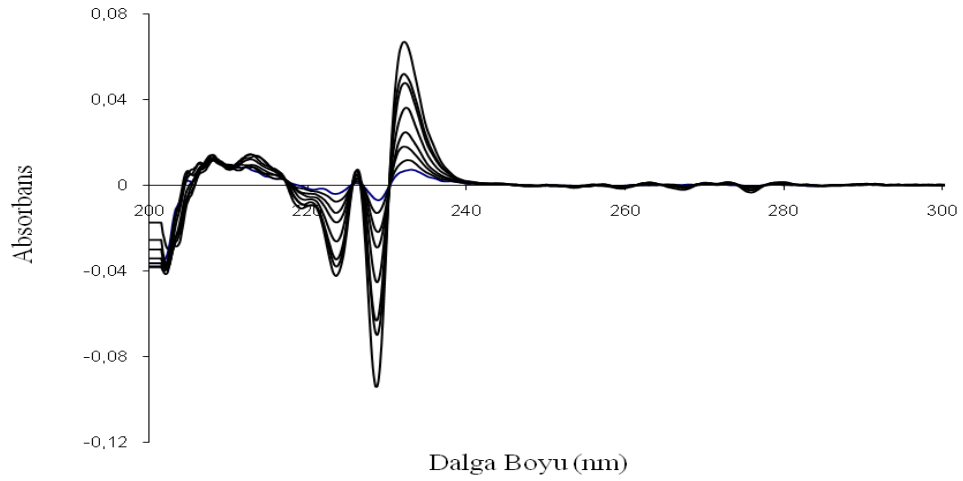
### 3.2.2. Yöntem geliştirme

Sibutraminin bütün UV absorpsiyon türev spektrumları (1. ve 2. Türev) 200-400 nm dalga boyu aralığı ve 2 nm'lik bant genişliği yerine, 5 nm'lik bant genişliğinde alınmış ve hem metanol ve hem de su ortamında iyi belirlenmiş tek bir maksimum pik gözlemlenmiştir. Her iki çözücü ortamı için bütün spektrumların maksimum dalga boyunda (224 nm) hemen hemen hiçbir kayma görülmemiştir. Sibutramin için türev spektroskopisiyle miktar tayini yapılmasının tercih edilmesinin sebebi ise, pik şekillerinin iyi belirlenmesi ve olası safsızlıkların giderilmesi içindir.

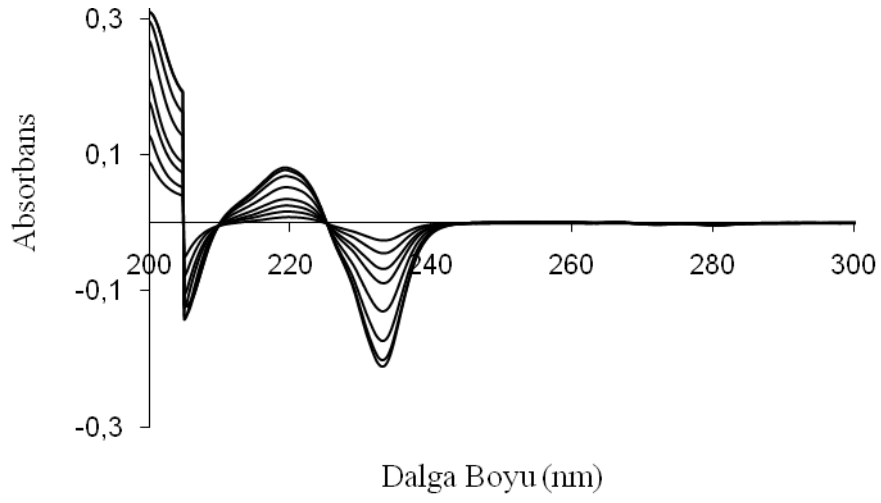




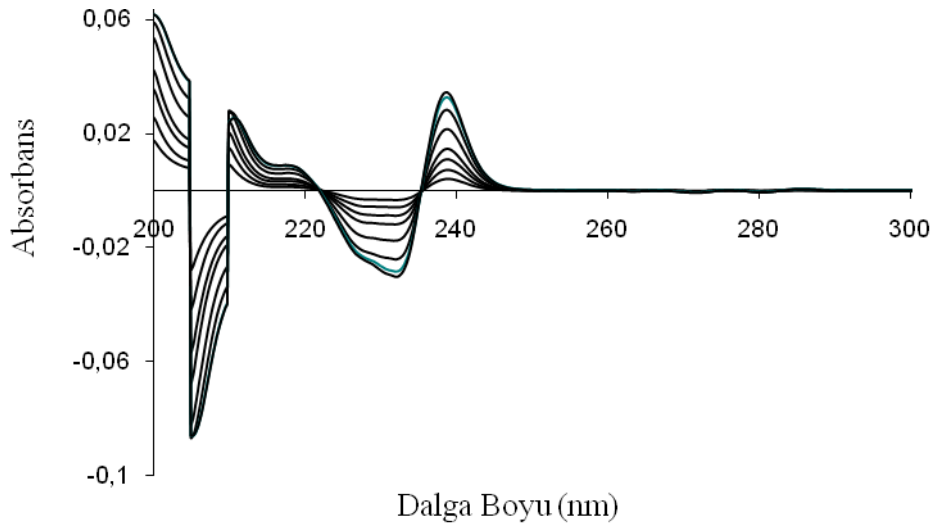
Şekil 3.15. Sibutramin için metanol içerisinde alınmış 1.Türev UV spektrumları (5, 10, 15, 20, 30, 40, 45 ve 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ )



Şekil 3.16. Sibutramin için metanol içerisinde alınmış 2.Türev UV spektrumları (5, 10, 15, 20, 30, 40, 45 ve 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ )



Şekil 3.17. Sibutramin için su içerisinde alınmış 1.Türev UV spektrumları (5, 10, 15, 20, 30, 40, 45 ve 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ )



Şekil 3.18. Sibutramin için su içerisinde alınmış 2.Türev UV spektrumları (5, 10, 15, 20, 30, 40, 45 ve 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ )

### 3.2.3. Ticari preparatlarda miktar tayini

Tablo 3.11 ve 3.12’de, etken maddesi Sibutramin Hidroklorür Monohidrat olan 15 mg’lık Reductil adındaki ticari kapsüller eklenen numuneler için maksimum ve minimum dalga boylarında (217 ve 230 nm’de), metanol ve su ortamında hazırlanan standartlarla 1. ve 2. Türev UV-spektroskopik yöntemden elde edilen bağıl hata ve geri kazanımlar verilmiştir. Tablolara bakıldığında, genellikle su ortamında elde edilen ortalama geri kazanımların, metanol ortamında elde edilenlerden daha büyük olduğu görülmektedir. Ayrıca veriler t- testi ile değerlendirilmiş ve her iki çözücü ortamı için elde edilen veriler arasında farklılıklar olduğu da tespit edilmiştir (Bkz. Tablo 3.13 ve 3.14).

Tablo 3.11. Ticari kapsüllerden eklenen numuneler için 1.Türev UV-spektroskopik yöntemden elde edilen geri kazanım değerleri (n=6)

217 nm	Metanol			Su		
Bilinen Ortalama Kons. ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Bulunan Ortalama Kons. ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Doğruluk Bağıl hata (%)	Geri Kazanım (%)	Bulunan Ortalama Kons. ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Doğruluk Bağıl hata (%)	Geri Kazanım (%)
15	13,06	-12,95	87,05	13,93	-7,27	92,85
30	26,17	-12,66	87,24	27,67	-7,79	92,25
45	43,99	-2,24	97,76	40,93	-8,99	90,96
230 nm	Metanol			Su		
Bilinen Ortalama Kons. ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Bulunan Ortalama Kons. ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Doğruluk Bağıl hata (%)	Geri Kazanım (%)	Bulunan Ortalama Kons. ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Doğruluk Bağıl hata (%)	Geri Kazanım (%)
15	14,10	-5,99	94,03	16,10	7,37	107,32
30	28,97	-3,40	96,58	30,19	0,63	100,63
45	41,78	-7,17	92,85	44,53	-1,03	98,96

Ayrıca elde edilen tüm % RSD değerlerine baktığımızda, genellikle su ortamında elde edilen kesinlik (% RSD) değerlerinin metanol ortamında elde edilenlerden daha küçük dolayısıyla daha kesin olduğu görülmektedir.

Tablo 3.12. Ticari kapsüllerden eklenen numuneler için 2.Türev UV-spektroskopik yöntemden elde edilen geri kazanım değerleri (n=6)

223 nm	Metanol			Su		
Bilinen Ortalama Kons. ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Bulunan Ortalama Kons. ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Doğruluk Bağıl hata (%)	Geri Kazanım (%)	Bulunan Ortalama Kons. ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Doğruluk Bağıl hata (%)	Geri Kazanım (%)
15	12,95	-13,66	86,34	13,67	-8,70	91,15
30	24,68	-17,73	82,27	25,19	-16,02	83,98
45	38,51	-14,62	85,57	40,01	-10,94	88,92
232 nm	Metanol			Su		
Bilinen Ortalama Kons. ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Bulunan Ortalama Kons. ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Doğruluk Bağıl hata (%)	Geri Kazanım (%)	Bulunan Ortalama Kons. ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Doğruluk Bağıl hata (%)	Geri Kazanım (%)
15	12,68	-15,35	84,56	12,33	-17,94	82,18
30	25,17	-16,20	83,89	25,50	-14,98	85,01
45	36,97	-17,98	82,16	41,96	-6,74	93,26

Tablo 3.11 ve 3.12’de görüldüğü gibi yapılan analizler sonucu, % 82,16-107,32 arasında değişen geri kazanım yüzdelerine sahip değerler bulunmuştur.

Tablo 3.13. Metanol ve su ortamında 217 nm’de Sibutramin içeren ticari preparatlar için 1.türev spektroskopi ile elde edilen istatistiksel veriler ( $\alpha=0,05$ , % 95 güvenle) (n=6)

İstatistiksel Değerler	Metanol	Su	t-testi	
			$t_{\text{tablo}}$	$t_{\text{hesaplanan}}$
Deneme Sayısı (n)	6	6		
Ortalama Verim <sup>1</sup> ( $\bar{X}$ , %)	0,0122	0,0253	2,23	3,16
Standart sapma (SD)	0,0003	0,0003		
Bağıl Standart sapma (RSD, %)	2,35	1,05		
Standart Hata	0,0001	0,0001		

Tablo 3.14. Metanol ve su ortamında 223 nm’de Sibutramin içeren ticari preparatlar için 2. türev spektroskopisi ile elde edilen istatistiksel veriler ( $\alpha=0,05$ , % 95 güvenle) (n=6)

İstatistiksel Değerler	Metanol	Su	t-testi	
			t <sub>tablo</sub>	t <sub>hesaplanan</sub>
Deneme Sayısı (n)	6	6		
Ortalama Verim <sup>1</sup> ( $\bar{X}$ , %)	0,0115	0,0129	2,23	2,96
Standart sapma (SD)	0,0003	0,0002		
Bağıl Standart sapma (RSD, %)	3,01	1,80		
Standart Hata (%)	1,0.10 <sup>-4</sup>	9,4.10 <sup>-5</sup>		

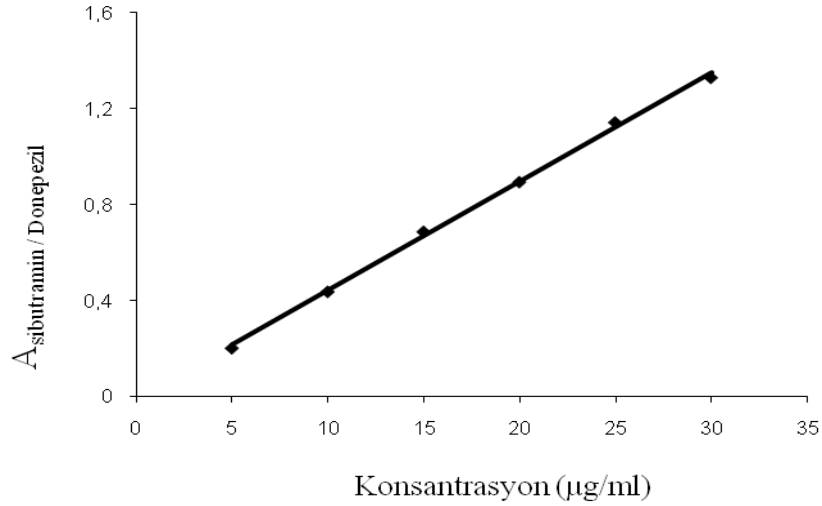
Tablo 3.13 ve 3.14’de görüldüğü gibi, metanol ve su ortamına sibutramin içeren ticari kapsülden ilave edilmiş ve 1.türev ve 2.türev spektroskopisi ile elde edilen geri kazanım değerlerine istatistiksel t-testi uygulanmıştır. Metanol ortamında, birinci türev spektrofotometrisi için hassasiyet 217 nm’de, ikinci türev spektrofotometrisi için de hassasiyet (kalibrasyon eğrisinin eğimi de daha büyük olduğundan) 223 nm’de daha fazla olduğundan istatistiksel t-testi sadece bu dalga boylarında yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara baktığımızda, metanol ve su ortamındaki sonuçların birbirinden oldukça farklı olduğu sonucu çıkarılmıştır.

### 3.3. HPLC Yöntemi ile Elde Edilen Bulgular

#### 3.3.1. Yöntemin validasyonu

Bu çalışmada, doğrudan kalibrasyon yönteminin yanı sıra, internal (iç) standart yöntemi ve standart ekleme yöntemleri de kalibrasyon yöntemleri olarak kullanılmıştır. Sibutraminin 5-30  $\mu\text{g ml}^{-1}$  konsantrasyon aralığında, 6 farklı standart çözeltisi kullanılarak, her bir standarda 1’er ml (15  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) Donepezil internal standart ilavesiyle tüm standart çözeltileri mobil faz karışımı içerisinde (90:10, metanol:asetonitril) hazırlanmış ve HPLC ile analiz edilmiştir. Sibutramin/Donepezil pik eğrileri altında kalan alan oranlarına karşı, standart konsantrasyonları grafik

edilerek, kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Bu yöntem ile LOQ 4,45 ve LOD ise  $1,33 \mu\text{g ml}^{-1}$  olarak bulunmuştur.



Şekil 3.19. Sibutramin / İnternal standart miktarları için hazırlanmış kalibrasyon eğrisi

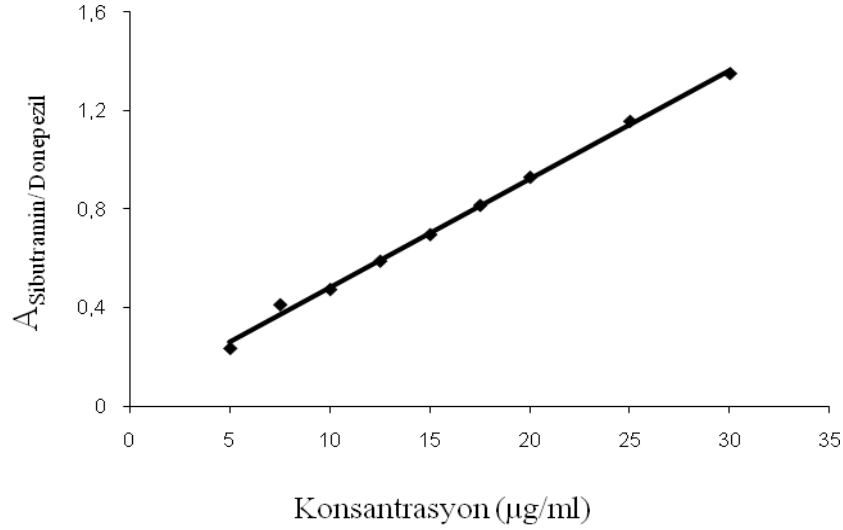
Bu eğrilerden standart çözeltiler için regresyon analizi ile elde edilen doğru denklemleri ve regresyon katsayıları hesaplanıp, oldukça iyi lineerlikler sağladıkları görülmüştür (Bakınız Tablo 4.15).

Tablo 3.15. İnternal standart analiz yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisi değerleri (1 ml internal standart çözeltisi ilavesiyle)

Standart çözelti konsantrasyonları (µg/ml)	Sibutramin/Donepezil alanları	Regresyon Eşitliği	Regresyon Katsayısı (r <sup>2</sup> )	Standart Sapma (SD)
5	0,2037	y=0,0455x – 0,012	0,9985	0,0202
10	0,4387			
15	0,6886			
20	0,8955			
25	1,1439			
30	1,3301			

Ayrıca, Sibutraminin  $5\text{-}30 \mu\text{g ml}^{-1}$  konsantrasyon aralığında, 9 farklı standart kullanarak da, her bir standarda 1'er ml Donepezil internal standart ilavesiyle tüm geri kazanım standart çözeltileri, mobil faz karışımı içerisinde (90:10,

metanol:asetonitril) hazırlanmış ve HPLC ile analiz edilmiştir. Sibutramin/Donepezil pik eğrileri altında kalan alan oranlarına karşı, geri kazanım konsantrasyonları grafik edilerek, yeni bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Bu yöntem ile LOQ 4,43 ve LOD ise  $1,33 \mu\text{g ml}^{-1}$  olarak bulunmuştur.



Şekil 3.20. Sibutramin / İnternal standart geri kazanım miktarları için hazırlanmış kalibrasyon eğrisi

Bu eğrilerden standart geri kazanım çözeltileri için regresyon analizi ile elde edilen doğru denklemleri ve regresyon katsayıları hesaplanıp, oldukça iyi lineerlikler sağladıkları görülmüştür (Bkz. Tablo 3.16).

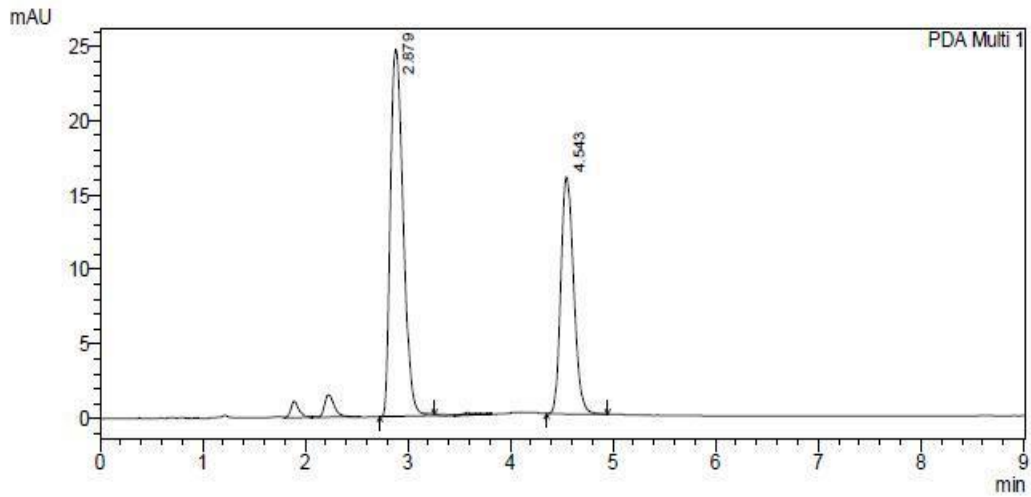
Tablo 3.16. İnternal standart analiz yöntemi ile elde edilen geri kazanım kalibrasyon eğrisi değerleri (1 ml internal standart çözeltisi ilavesiyle)

Standart çözelti konsantrasyonları ( $\mu\text{g/ml}$ )	Sibutramin/Donepezil Alanları	Regresyon Eşitliği	Regresyon Katsayısı ( $r^2$ )	Standart Sapma (SD)
5	0,2328	$y = 0,0440x + 0,0405$	0,9973	0,0195
7,5	0,4099			
10	0,4717			
12,5	0,5866			
15	0,6942			
17,5	0,8128			
20	0,9269			
25	1,1537			
30	1,3472			

Tablo 3.17’de görüldüğü üzere, 5-30  $\mu\text{g ml}^{-1}$  aralığındaki 9 farklı konsantrasyonda internal standart ilave edilmiş standartlardan oldukça iyi geri kazanımlar elde edilmiştir.

Tablo 3.17. İnternal Standart Analiz Yöntemi ile elde edilen geri kazanım değerleri (1 ml internal standart çözeltisi ilavesiyle)

Katılan Kons. ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Bulunan Kons. ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Doğruluk Bağıl hata (%)	Geri Kazanım (%)
5	5,65	13,00	113,04
7,5	8,61	14,80	114,84
10	10,66	6,60	106,61
12,5	13,06	4,48	104,46
15	14,85	-1,00	99,03
17,5	17,59	0,51	100,50
20	20,04	0,20	100,18
25	24,47	-2,12	97,88
30	30,74	2,47	102,46



Şekil 3.21. Metanol çözücü ortamında geri kazanım standartlarından 30  $\mu\text{g ml}^{-1}$  e ait kromatogram (15  $\mu\text{g ml}^{-1}$  Donepezil ilavesiyle)



### 3.3.2. Yöntem geliştirme

Kromatografik ayırımın iyileştirilmesi için kromatografik koşulların optimizasyonuna gerek duyulmaktadır. Bu maksatla, çeşitli ön denemeler yapılmış ve geliştirilen yöntem için en uygun şartlar belirlenmiştir. DAD dedektörün oldukça yüksek etkili tarama avantajlarından faydalanarak, bütün UV bölge taratılıp, Sibutraminin maksimum absorbans gösterdiği 224 nm dalga boyunda hem Sibutramin hem de internal standart için en uygun kromatogramlar alınmıştır. HPLC-DAD sisteminde, optimum koşullar belirlendikten sonra, standartların ayrı ayrı kromatogramları alınmıştır.

Alıkonma zamanı (RT) oldukça geç gelince, akış hızı arttırılmıştır. Bu durumda da pikler genişlemiş ve RT azalmıştır. Daha sonra en uygun akış hızınının 1 ml/dk olması uygun görülmüştür. Pik yükseklikleri akış hızından etkilenmemiş, fakat pik alanları etkilenmiştir. Enjeksiyon hacmi olarak 15 µl'den daha fazla miktarda çözücü sisteme enjekte edildiğinde, pikler genişlemiş ve dik pikler vermemiştir. Konsantrasyon arttıkça pik şeklinden etkilenmeyen RT'ler de sola doğru az bir miktar kayma gözlemlenmiştir.

Mobil faz kombinasyonu 50:50 (metanol-asetonitril) olduğunda, pikler yayvan, silik ve çok geç gelmiştir. Yani, metanol azaldıkça, pik görünürlüğü kaybolmuştur. Mobil faz kombinasyonu 60:40 alındığında ise pikler yine yayvan gelmiştir. Çeşitli tampon çözelti (0,002-0,005 M'lık fosfat tamponu) ve pH kombinasyonları (pH 3-6 arasında) denenmesine rağmen düzgün pik şekilleri görülmemiştir. Kolonda tıkanmalara sebep olabileceğinden, çok yüksek konsantrasyonlarda tampon çözelti hazırlanmasından özellikle kaçınılmıştır. Metanol-su ve asetonitril-su karışımları denendiğinde ise düzgün bir pik şekline rastlanılmamıştır. En uygun mobil faz kombinasyonu olarak 90:10 oranındaki karışım, daha dik pik, daha uygun RT ve oldukça düzgün bir baseline verdiği için tercih edilmiştir. Standartlar için metanol-asetonitril çözücü ortamındaki pikler, sadece metanol içerisinde hazırlanan insan plazmasındakilerden daha düzgün gelmiştir. Kolon fırın sıcaklığı ise 25 °C olarak alınmıştır.

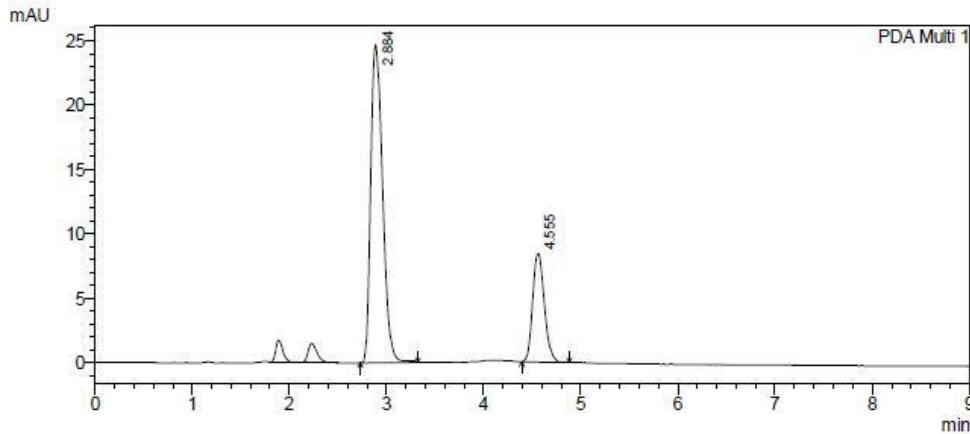
Doğrudan kalibrasyon yönteminin yanı sıra, internal (iç) standart yöntemi ve standart ekleme yöntemleri de kalibrasyon yöntemleri olarak kullanılmıştır. İnternal standart analiz yönteminde, standart ve numune çözeltilerinin her birine dikkatle 1'er ml internal standart çözeltiden eklenmiş ve yüksek kesinlikler elde edilmiştir. Böylelikle numune enjeksiyonu, akış hızı ve kolon şartlarındaki değişmelerle oluşan belirsizlikler en aza indirilmiştir.

### 3.3.3. Ticari preparatlarda miktar tayini

Ticari kapsül numuneleri, etken maddesi Sibutramin Hidroklorür Monohidrat olan 15 mg'lık Reductil ticari kapsülünden mobil faz içerisinde 15  $\mu\text{g ml}^{-1}$  olacak şekilde, içerisine 1'er ml internal standart ilave edilerek (6 kez tekrar edilerek) hazırlanmıştır. Elde edilen kesinlik ve tekrarlanabilirlik değerleri olan SD, RSD ve % Geri kazanımlar Tablo 3.18'de özetlenmiştir.

Tablo 3.18. Ticari kapsülden elde edilen değerler (1 ml internal standart çözeltisi ilavesiyle)

<b>Sibutramin/Donepezil Alanları (15 <math>\mu\text{g ml}^{-1}</math>)</b>	
	0,705874
	0,840733
	0,731905
	0,712523
	0,696156
	0,682371
<b>Ortalama Alan</b>	0,7282
<b>Standart Sapma (SD)</b>	0,058
<b>Bağıl Standart Sapma (% RSD)</b>	7,90
<b>Bulunan Konsantrasyon (<math>\mu\text{g ml}^{-1}</math>)</b>	15,43
<b>Geri Kazanım (%)</b>	102,87



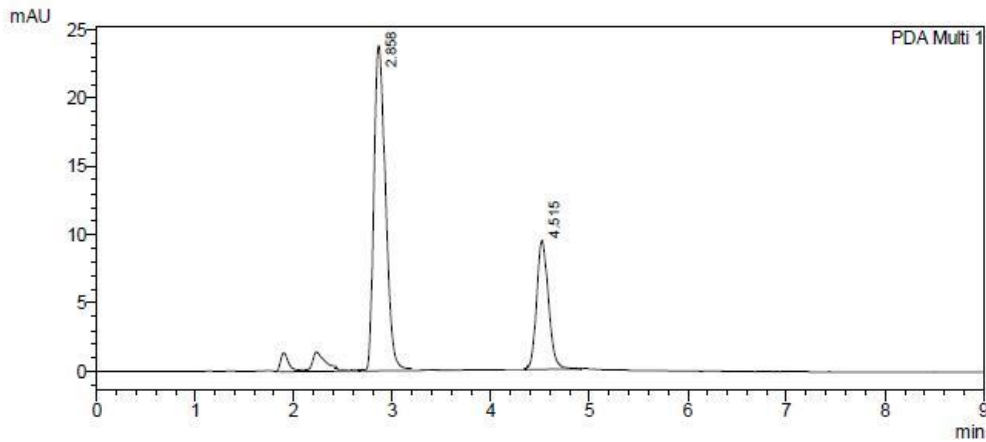
Şekil 3.22. Ticari kapsülden elde edilen  $15 \mu\text{g ml}^{-1}$  'lik kromatogram

### 3.3.4. Standart ekleme yöntemi ile elde edilen sonuçlar

Sibutramin stok çözeltisinden 2,5-5,7,5-10 ve  $12,5 \mu\text{g ml}^{-1}$  olacak şekilde 5 ayrı miktar alınarak, ticari kapsül stok çözeltisinden de 2,5-5,7,5-10 ve  $12,5 \mu\text{g ml}^{-1}$  olacak şekilde üzerlerine ilave edilmiş ve hepsinin toplam  $15 \mu\text{g ml}^{-1}$ 'lik standartlar olması sağlanmıştır. Ayrıca yine aynı numunelerin her birine 1'er ml ( $15 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) internal standart çözeltisinden de ilave edilmiştir. Katılan Sibutramin standartları ile birlikte katılan kapsül standartlarından elde edilen geri kazanım, SD ve RSD değerleri Tablo 3.19'da görülmektedir.

Tablo 3.19. Standart ekleme yöntemi ile elde edilen değerler (1 ml internal standart çözeltisi ilavesiyle)

	<b>Katılan Sibutramin Standardı Kons. (<math>\mu\text{g ml}^{-1}</math>)</b>	<b>Katılan Kapsül Kons. (<math>\mu\text{g ml}^{-1}</math>)</b>	<b>Bulunan Toplam Kons. (<math>\mu\text{g ml}^{-1}</math>)</b>	<b>Geri Kazanım (%)</b>
	2,5	12,5	15,38	102,54
	5	10	15,17	101,10
	7,5	7,5	15,23	101,54
	10	5	15,39	102,60
	12,5	2,5	15,61	104,08
<b>Ortalama Geri Kazanım (%)</b>				102,37
<b>Bulunan Ortalama Kons. (<math>\mu\text{g ml}^{-1}</math>)</b>				15,36
<b>Standart Sapma (SD)</b>				0,049
<b>Bağıl Standart Sapma (% RSD)</b>				6,98



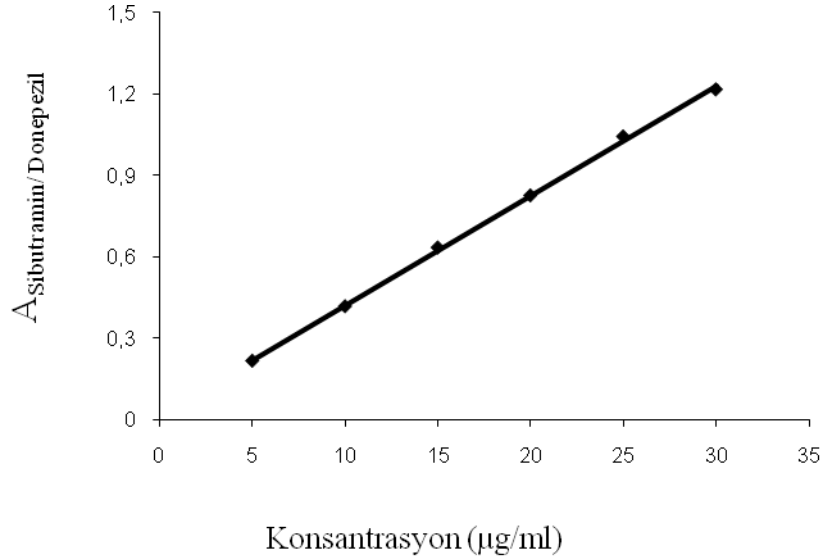
Şekil 3.23. Standart ekleme yönteminden elde edilen  $15 \mu\text{g ml}^{-1}$  'lik kromatogram

### 3.4. Plazma Ortamında Elde Edilen Bulgular

#### 3.4.1. Yöntemin validasyonu

5-30  $\mu\text{g ml}^{-1}$  konsantrasyon aralığında, 6 farklı standart kullanılarak, insan plazmasında (in vitro olarak) her bir standarda 1'er ml Donepezil internal standart ilavesiyle tüm Sibutramin standart çözeltileri metanol içerisinde hazırlanmış (spike

yöntemi ile) ve HPLC ile analiz edilmiştir. Sibutramin/Donepezil pik eğrileri altında kalan alan oranlarına karşı, konsantrasyonlar grafik edilerek, kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Bu yöntem ile LOQ 4,21 ve LOD ise 1,26  $\mu\text{g ml}^{-1}$  olarak bulunmuştur.

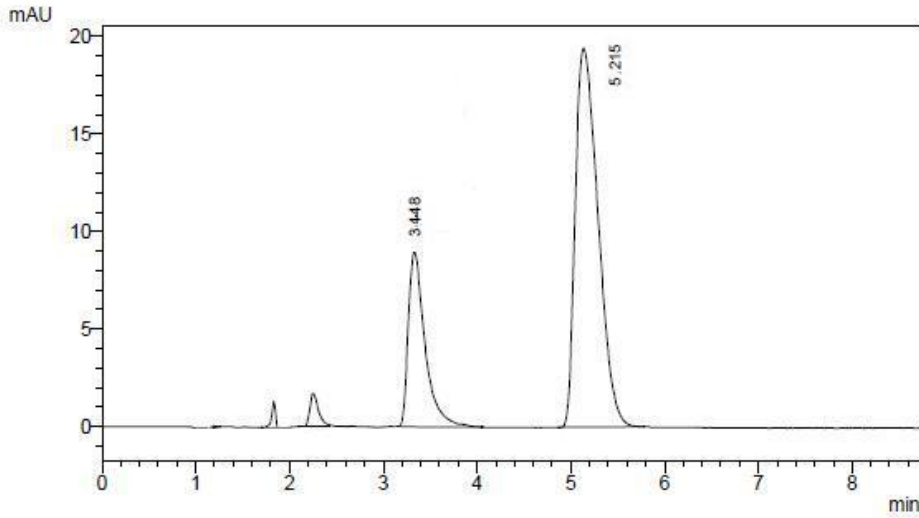


Şekil 3.24. İnsan plazmasında metanol çözücü ortamında Sibutramin standartlarından hazırlanmış kalibrasyon eğrisi

Plazmada Sibutramin standart çözeltileri için regresyon analizi ile elde edilen bu eğrilerden, doğru denklemleri ve regresyon katsayıları bulunup hesaplanmış ve oldukça iyi sonuçlar elde edilmiştir (Bkz. Tablo 4.20).

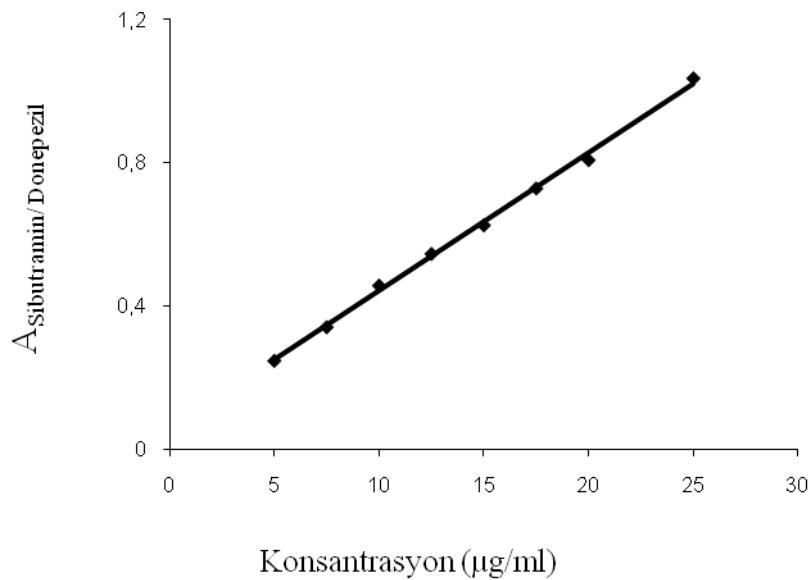
Tablo 3.20. İnsan plazmasında internal standart analiz yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisi değerleri (1 ml internal standart çözeltisi ilavesiyle)

Standart çözelti konsantrasyonları ( $\mu\text{g/ml}$ )	Sibutramin/Donepezil alanı	Regresyon Eşitliği	Regresyon Katsayısı ( $r^2$ )	Standart Sapma (SD)
5	0,2158	$y=0,0405x + 0,0176$	0,09992	0,0170
10	0,4170			
15	0,6339			
20	0,8263			
25	1,0440			
30	1,2156			



Şekil 3.25. Plazmada hazırlanmış kalibrasyon eğrisinden elde edilen kromatogram ( $15 \mu\text{g ml}^{-1}$ )

$5\text{-}30 \mu\text{g ml}^{-1}$  konsantrasyon aralığında, 9 farklı standart kullanılarak, insan plazmasında her bir standarda 1'er ml Donepezil internal standart ilavesiyle Sibutraminin tüm geri kazanım standart çözeltileri metanol içerisinde hazırlanmış ve HPLC ile analiz edilmiştir. Sibutramin/Donepezil pik eğrileri altında kalan alan oranlarına karşı, konsantrasyonlar grafik edilerek, kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Bu yöntem ile LOQ  $3,29$  ve LOD ise  $0,99 \mu\text{g ml}^{-1}$  olarak bulunmuştur.



Şekil 3.26. İnsan plazmasında geri kazanımlar için Sibutramin standartlarından hazırlanmış kalibrasyon eğrisi

Bu eğrilerden standart geri kazanım çözeltileri için regresyon analizi ile elde edilen doğru denklemleri ve regresyon katsayıları hesaplanıp oldukça iyi lineerlikler sağladıkları görülmüştür (Bkz. Tablo 3.21).

Tablo 3.21. İnsan plazmasında internal standart analiz yöntemi ile elde edilen geri kazanım kalibrasyon eğrisi değerleri (1 ml internal standart çözeltisi ilavesiyle)

Standart çözelti konsantrasyonları ( $\mu\text{g/ml}$ )	Sibutramin/Donepezil Alanları	Regresyon Eşitliği	Regresyon Katsayısı ( $r^2$ )	Standart Sapma (SD)
5	0,2473	$y = 0,0385x + 0,0566$	0,9978	0,0129
7,5	0,3411			
10	0,4569			
12,5	0,5453			
15	0,6249			
17,5	0,7276			
20	0,8067			
25	1,0343			
30	1,2343			

Tablo 3.22'de de görüldüğü üzere, 5-30  $\mu\text{g ml}^{-1}$  aralığındaki 9 farklı konsantrasyonda internal standart ilave edilmiş Sibutramin standartlarından oldukça iyi geri kazanımlar (% 91,31-114,81) elde edilmiştir.

Tablo 3.22. Plazmada internal standart analiz yöntemi ile elde edilen geri kazanım değerleri (1 ml internal standart çözeltisi ilavesiyle)

<b>Katılan Kons. (<math>\mu\text{g ml}^{-1}</math>)</b>	<b>Bulunan Kons. (<math>\mu\text{g ml}^{-1}</math>)</b>	<b>Doğruluk Bağıl hata (%)</b>	<b>Geri Kazanım (%)</b>
5	5,74	14,80	114,81
7,5	8,36	11,47	111,53
10	10,56	5,60	105,58
12,5	13,07	4,56	104,57
15	13,70	-8,67	91,31
17,5	16,26	-7,09	92,94
20	20,01	0,05	100,03
25	24,02	-3,92	96,08
30	28,13	-6,23	93,75

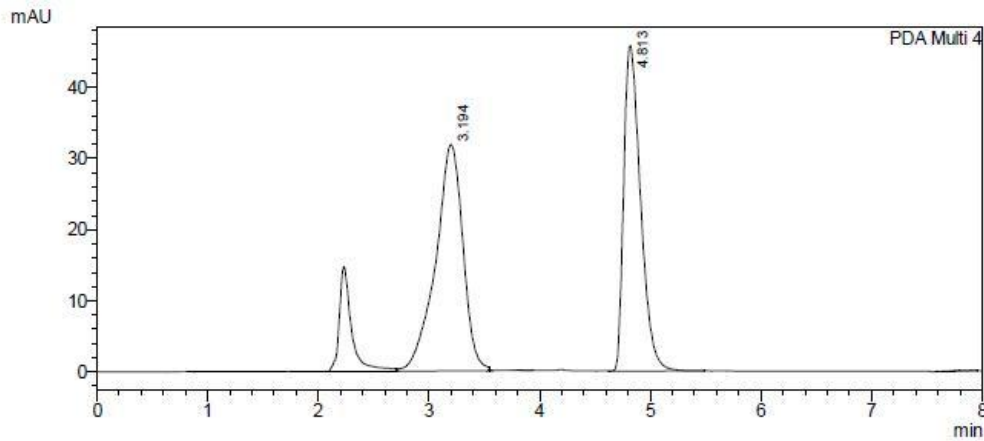
### 3.4.2. Ticari preparatlarda miktar tayini

Ticari kapsül numuneleri, etken maddesi Sibutramin Hidroklorür Monohidrat olan 15 mg'lık Reductil ticari kapsülünden plazma içerisinde  $15 \mu\text{g ml}^{-1}$  olacak şekilde içerisine 1'er ml internal standart ilave edilerek (6 kez tekrar edilerek) hazırlanmıştır. Elde edilen kesinlik ve tekrarlanabilirlik değerleri olan SD, RSD ve % Geri kazanım olarak Tablo 3.23'de özetlenmiştir.



Tablo 3.23. Plazmada ticari kapsülden elde edilen değerler (1 ml internal standart çözeltisi ilavesiyle)

<b>Sibutramin/Donepezil Alanları (15 µg ml<sup>-1</sup>)</b>	
	0,6593
	0,6523
	0,6676
	0,6537
	0,6439
	0,6631
<b>Ortalama Alan</b>	0,6566
<b>Standart Sapma (SD)</b>	0,0085
<b>Bağıl Standart Sapma (% RSD)</b>	1,29
<b>Bulunan Konsantrasyon (µg ml<sup>-1</sup>)</b>	14,32
<b>Geri Kazanım (%)</b>	95,48

Şekil 3.27. Plazmada ticari kapsülden elde edilen 15 µg ml<sup>-1</sup>'lik kromatogram

### 3.4.3. Standart ekleme yöntemi ile elde edilen sonuçlar

Plazma içerisinde, Sibutramin stok çözeltisinden 2,5-5,7,5-10 ve 12,5 µg ml<sup>-1</sup> olacak şekilde 5 ayrı miktar alınarak, ticari kapsül stok çözeltisinden de 2,5-5,7,5-10 ve 12,5 µg ml<sup>-1</sup> olacak şekilde üzerlerine ilave edilmiş ve hepsinin toplam 15'er µg ml<sup>-1</sup>'lik

standartlar olması sağlanmıştır. Ayrıca yine aynı numunelerin her birine 1'er ml ( $15 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) internal standart çözeltisinden de ilave edilmiştir. Katılan sibutramin standartları ile birlikte katılan kapsül standartlarından elde edilen geri kazanım, SD ve RSD değerleri Tablo 3.24'de görülmektedir. Tablo 3.25'de ise  $15 \mu\text{g ml}^{-1}$ 'lik ticari kapsülden mobil faz çözücü ortamında ve plazmada hazırlanmış 6 farklı numunenin istatistiksel olarak student-t testi ile karşılaştırmaları yapılmıştır. t-testine göre iki yöntem arasında oldukça önemli bir fark yoktur.

Ayrıca Tablo 3.26'da görüldüğü üzere, UV ve HPLC yöntemleriyle ticari preparatlar için ( $15 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) elde edilen veriler t-testi ile kıyaslanmıştır.  $t_{\text{tablo}}$  değeri,  $t_{\text{hesaplanan}}$  değerinden büyük olduğu için iki yöntem arasında önemli bir fark olmadığı sonucuna varılmıştır ( $\alpha=0,05$ , % 95 güvenle) ( $n=6$ ).

Tablo 3.24. Plazmada standart ekleme yöntemi ile elde edilen değerler (1 ml internal standart çözeltisi ilavesiyle)

	<b>Katılan Sibutramin Standardı Kons. (<math>\mu\text{g ml}^{-1}</math>)</b>	<b>Katılan Kapsül Kons. (<math>\mu\text{g ml}^{-1}</math>)</b>	<b>Bulunan Toplam Kons. (<math>\mu\text{g ml}^{-1}</math>)</b>	<b>Geri Kazanım (%)</b>
	2,5	12,5	13,79	91,96
	5	10	15,04	100,25
	7,5	7,5	14,50	96,65
	10	5	16,15	107,68
	12,5	2,5	14,96	99,76
<b>Ortalama Geri Kazanım (%)</b>				99,26
<b>Bulunan Ortalama Kons. (<math>\mu\text{g ml}^{-1}</math>)</b>				14,89
<b>Standart Sapma (SD)</b>				0,0382
<b>Bağıl Standart Sapma (% RSD)</b>				5,61

Tablo 3.25. Mobil faz ve plazma ortamında hazırlanmış ticari preparatlar için ( $15 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) elde edilen istatistiksel veriler ( $\alpha=0,05$ , % 95 güvenle) ( $n=6$ )

İstatistiksel Değerler	Mobil faz çözücü ortamında	Plazmada
Deneme Sayısı (n)	6	6
Ortalama ( $\bar{X}$ , %)	0,7283	0,6566
Standart sapma (SD)	0,0525	0,0077
Bağıl Standart sapma (RSD, %)	7,21	1,18
Standart Hata	0,0214	0,0032
t-testi $t_{\text{hesaplanan}} (t_{\text{tablo}})$	2,18 (2,23)	

Tablo 3.26. UV ve HPLC yöntemleriyle ticari preparatlar için ( $15 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) elde edilen istatistiksel veriler ( $\alpha=0,05$ , % 95 güvenle) ( $n=6$ )

İstatistiksel Değerler	UV	HPLC
Deneme Sayısı (n)	6	6
Ortalama ( $\bar{X}$ , %)	0,7856	0,7283
Standart sapma (SD)	0,0105	0,0525
Bağıl Standart sapma (RSD, %)	1,34	7,2
Standart Hata	0,0043	0,0214
t-testi $t_{\text{hesaplanan}} (t_{\text{tablo}})$	1,91 (2,23)	

#### 3.4.4. HPLC-DAD yöntemi için elde edilen deneysel parametreler

1 ml/dk akış hızında, Sibutramin ve Donepezil için piklerin alıkonma fonksiyonu olan kapasite faktörü,  $k_S'$ ; 1,824 ve  $k_D'$ ; 0,243, seçicilik katsayısı,  $\alpha$ : 3,97, kolon verimliliğinin göstergesi olan toplam teorik plaka sayısı, N: 2663, kolonun ayırma gücü olan rezolüsyon,  $R_s$ : 3,07 ve tabaka yüksekliği, H:  $5,63 \cdot 10^{-3}$  cm olarak tespit edilmiştir.

## BÖLÜM 4. SONUÇLAR

Yapılan literatür araştırmaları sonucunda; iştah azaltıcı bir madde olan Sibutraminin miktar analizine yönelik, UV-spektroskopisi ile ticari kapsüllerde [22, 23, 43, 44], UV dedektörlü HPLC ile tabletlerde ve fare serumunda [28, 31, 33], kiral kromatografi ile Sibutramin enantiyomerleri için [35], Tandem Mass Spektroskopisi ile insan plazmasında [30], LC-ESI-MS ile insan plazmasında [26, 32], LC-ESI-TMS ile insan plazmasındaki Sibutraminin metabolitleri için [27, 29] ve idrarda GC-MS ile ana metabolitler için [24] gibi çeşitli yöntemler geliştirilmesi ile ilgili çalışmalara ulaşılmıştır.

Bu çalışmada ise, Sibutramin etken maddesinin farklı iki çözücü ortamındaki (metanol ve su) kapsül dozaj şekillerindeki miktarlarını belirlemek için yeni geliştirilen (Reductil kapsül, 15 mg) UV ve Türev spektroskopisi yöntemleri ile yanı sıra hem ticari kapsüllerde hem de insan plazmasındaki (in-vitro olarak) miktarlarını belirlemek için yeni geliştirilen DAD dedektörlü ters-faz HPLC yöntemleri, literatürde mevcut bulunan bazı zaman alıcı klasik yöntemlere uygulanabilmedeki kullanım kolaylığı açısından birer alternatif oluşturmuştur.

Literatürde mevcut bulunan insan plazmasında Sibutraminin miktar tayinine yönelik, UV dedektörlü Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemlerine rağmen geliştirilmiş olan bu yeni alternatif yöntem ile herhangi bir ekstraksiyon işlemine gerek kalmadan oldukça yüksek geri kazanımlar elde edilerek, daha basit, daha hassas ve daha kısa zamanda analizler gerçekleştirilebilmiştir. Ayrıca bu yeni alternatif ters-faz HPLC yöntemi için, sabit dalga boylu değil değişken taramalı dalga boylarında incelemeye müsait bir UV-Vis dedektör kullanımı (DAD dedektör), tüm standartlara bir internal standart katılması ve rutin klinik kullanımda kantitatif maksatlı plazma çalışmalarında da kolaylıkla kullanılabilen olması, bu yeni yöntemin avantajları arasında sayılabilir.

Geliştirilen yöntemlerin plazma düzeylerinin istatistiksel olarak karşılaştırılarak değerlendirilmesi için de, spesifiklik, hassaslık, kesinlik, doğruluk, lineerlik ve tekrarlanabilirlik gibi bütün validasyon parametreleri uygulanarak, biyoanalitik yöntem validasyonu yapılmış ve ayrıca istatistiksel student t-testi kullanılarak yöntemler biyoistatistik yönünden de değerlendirilmiştir.

Sibutramin için yapılmış Türev Spektrofotometrisi ile miktar tayini yöntemi ise literatürde bir ilktir. Türevlendirme ile spektrumlar daha ayrıntılı net bir görünüm kazanmış ve böylelikle numune matrisinden ileri gelen ve bozucu etki gösteren bantlar elimine edilmiştir. Kullanılan iki farklı çözücü ortamından birisi olan su içerisinde alınan % geri kazanım ve RSD değerleri (kesinlik) genel olarak metanol içerisinde elde edilenlerden daha iyi sonuçlar vermiştir. Tüm geri kazanım sonuçlarına bakılarak, geliştirilen kantitatif analiz yöntemlerinin hem farmasötik preparatlara hem de insan plazmasına kolayca uygulanabilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Ayrıca geliştirilen yöntemler, teknolojik ve bilimsel yönden hem ticari ilaçta hem de kandaki Sibutramin ilaç düzeylerinin başarı ile belirlenmesi açısından sadece amaçlanan bileşeni tayin edebilme yeteneğinde ve özgün niteliktedir. Bu çalışmanın sonuçlarının üniversitemiz bilimsel platformuna katkıda bulunması ve bu araştırmanın literatüre kazandırılması, yanı sıra geliştirilen bu yöntemlerin klinik kullanımlarda, ilaç endüstrisi ve sağlık otoriteleri için uygun alternatifler olması düşünülmektedir. Ayrıca, gelecek vadeden bu yöntemler, hem numunelerin yerinde analizi için rutin analizlerde kullanılması, hem de az masraf ve analiz kolaylığı da sağlaması açısından tercih edilen yöntemler olacaktır.

## KAYNAKLAR

- [1] <http://www.obezitecerrahisi.com>, 27 Mayıs 2010.
- [2] <http://www.genetikbilimi.com/genbilim/obezitenedir.htm>, 05 Mayıs 2010.
- [3] <http://www.tip2000.com/abone/konular/obezite.asp>, 25 Mayıs 2010.
- [4] ALTUNKAYNAK, B., ÖZBEK, E., Obezite nedenleri ve tedavi seçenekleri. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.D, Dicle Tıp Dergisi, Erzurum, 2007; 34(2):144-149.
- [5] AKTAŞ, A., Tıp 2 diyabetik hastalarda kapsamlı diyabet tedavisi eğitimi ve uygulamalarının glisemik kontrolün sağlanmasına etkileri. T.C. Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Aile Hekimliği Koordinatörlüğü, İstanbul, 2008.
- [6] GÜLÇELİK, N., GÜRLEK A., USMAN A., Obezitenin medikal tedavisi. Hacettepe Tıp Dergisi, 2007; 38:212-217.
- [7] <http://tr.wikipedia.org/wiki/Sibutramin>, 24 Mayıs 2010.
- [8] [http://www.gidaraporu.com/kilo-vermede-herbal-ilaclarda-tehlike\\_p.htm](http://www.gidaraporu.com/kilo-vermede-herbal-ilaclarda-tehlike_p.htm), 25 Mayıs 2010.
- [9] [http://tr.wikipedia.org/wiki/Plasebo\\_etkisi](http://tr.wikipedia.org/wiki/Plasebo_etkisi), 02 Haziran 2010.
- [10] <http://www.1ilac.com/ilaclar/Abbott/REDUCTIL.kapsul.htm>, 26 Mayıs 2010.
- [11] [http://www.chemicalregister.com/Sibutramine\\_Hydrochloride\\_Monohydrate/Suppliers/pid51273.htm](http://www.chemicalregister.com/Sibutramine_Hydrochloride_Monohydrate/Suppliers/pid51273.htm), 01 Haziran 2010.
- [12] MYCEK, M.J., HARVEY, R.A. and CHAMPE, P.C., Farmakoloji. Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul, 1998; 2. Baskı, 25.
- [13] AĞABEYOĞLU, İ., Temel farmakokinetik ve biyofarmasötik ders notları. Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Ankara, 2001; 55.
- [14] KAYAALP, S.O., Tıbbi Farmakoloji. Hacettepe-TAŞ yayını, Ankara, Eylül 2002; 10. Baskı, 80.

- [15] ANONİM, Biyoyararlanım ve biyoşdeğerlik genel ilkeler, I. Ulusal Biyoyararlanım ve Biyoşdeğerlik Sempozyumu. Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Şafak Matbaacılık, FATUM, Ankara, 9-10 Mayıs 1994; 240.
- [16] ŞENYUVA, H.Z. ve ÖZDEN, T., Yüksek performanslı sıvı kromatografisine giriş. Seminer dersi notları. TÜBİTAK-ATAL Lab., Ankara, 31 Ekim-1 Kasım 2001;75.
- [17] ANONİM, Biyoyararlanım ve biyoşdeğerlik yasal yönü, II. Ulusal Biyoyararlanım ve Biyoşdeğerlik Sempozyumu. Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Şafak Matbaacılık, FATUM, Ankara, 17-18 Nisan 1995;179.
- [18] SKOOG, D.A., HOLLER, F.J. and NEİMAN, T.A., Principles of Instrumental Analysis. Saunders College Publishing, Fifth Edition, 13-E1, USA, 1998.
- [19] ANONYMUS, Guidance for industry bioanalytical methods validation for human studies. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Rockville, 1998;13.
- [20] <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>, 28 Mayıs 2010.
- [21] MEHTA, A.C., The validation criteria for analytical methods used in pharmacy practice research. Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics, 1989;14: 465-473.
- [22] MALUF, D.F., FARAGO, P.V., BARREİRA, S.M.W., PEDRESO, C.F., PONTAROLO, R., Validation of an analytical method for determination of sibutramine hydrochloride monohydrate in capsules by UV-Vis spectrophotometry. Latin American Journal of Pharmacy, 2007;26(6): 909-912.
- [23] DIEFENBACH, I.C.F., FRİEDRİCH, M., BİTTENCOURT, C.F., SANTOS, M.R., ESCARRONE, A.L.V., Development and validation of an analytical methodology for determination of sibutramine in capsules. Latin American Journal of Pharmacy, 2008; 27(4): 612-617.
- [24] ROSSİ, S., COLAMONİCİ, C. ve BOTRE, F., Detection of sibutramine administration: a gas chromatography/mass spectrometry study of the main urinary metabolites. Rapid Commun, Mass Spectrom, 2007; 21:79-88.
- [25] ROSSİ, S., COLAMONİCİ, C. ve BOTRE, F., Parallel analysis of stimulants in saliva and urine by gas chromatography/mass spectrometry: perspectives for in competition anti doping analysis. Analytica Chimica Acta, 2008; 606: 217-222.



- [26] DING, L., HAO, X., HUANG, X., ZHANG, S., Simultaneous determination of sibutramine and its N-desmethyl metabolites in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry method and clinical applications. *Analytica Chimica Acta*, 2003; 492: 241-248.
- [27] CHEN, J., LU W., ZHANG, Q., JIANG, X., Determination of the active meof sibutramine by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2003;785:197-203.
- [28] SEGALL, A.I., COLLADA, E.A., RICCI, R.A., ve PIZZORNO M.T., Reversed-Phase HPLC determination of sibutramine hydrochloride in the presence of its oxidatively-induced degradation products. *Journal Of Liquid Chromatography & Related Tecnologies*. 2003;26(6): 977-986.
- [29] JAİN, D.S., SUBBAĀAH, G., SANYAL, M., SHRIVASTAV, P.S., PAL U., GHATALĪYA, S., KAKAD, A., PATEL, H., SHAH, S., Liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry validated method for the simultaneous quantification of sibutramine and its primary and secondary amine metabolites in human plasma and its application to a bioequivalence study. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2006;20:3509-3521.
- [30] BHATT, J., SHAH, B., KAMLĪ, S., SUBBAĀAH, G., SĪNGH, S., AMETA, S., Rapid and sensitive method for the determination of sibutramine active metabolites in human plasma by reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectroscopy. *Journal of Chromatographic Science*, 2007; 45(2): 91-96.
- [31] CHANDORKAR, J.G., KOTWAL, V.B., DHANDE, N.S., PACHPOR, M.P., PANDE, V.V., Development and validation of high performance liquid chromatography method for analysis of sibutramine hydrochloride and its impurity. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2008;21(2):121-124.
- [32] HUANG, Z.Q., XĪAO, S., LUO, D., CHEN, B., YAO, S.Z., Simultaneous determination of sibutramine and N-di-desmethylsibutramine in dietary supplements for weight control by HPLC-ESI-MS. *Journal of Chromatographic Science*, 2008;46(8):707-711.
- [33] UM, S.Y., KĪM, K.B., KĪM, S.H., JU, Y.C., LEE, H.S., OH, H.Y., CHOĪ, K.H., CHUNG, M.W., Determination of the active metabolites of sibutramine in rat serum using column-switching HPLC. *Journal of Separation Science*, 2008;31:2820-2826.

- [34] SUTHAR, A.P., DUBEY, S.A., ve PATEL, S.R., A validated specific reverse phase liquid chromatographic method for the estimation of sibutramine hydrochloride monohydrate in bulk drug and capsule dosage forms. *International Journal of ChemTech Research*, 2009;1(4): 793-801.
- [35] RADHAKRISHNA, T., LAKSHMI NARAYANA, CH., SREENIVAS RAO, D., VYAS K., REDDY, G.OM., LC method for the determination of assay and purity of sibutramine hydrochloride and its enantiomers by chiral chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2000; 22:627-639.
- [36] [http://www.profdrmehtyaman.com/ders\\_notlari/ens\\_dersnotu.pdf](http://www.profdrmehtyaman.com/ders_notlari/ens_dersnotu.pdf), 27 Mayıs 2010.
- [37] [www.kimyaevi.org](http://www.kimyaevi.org), 07 Mayıs 2010.
- [38] Analitik Kimya II Laboratuvar Aletli Analiz Deneyleri. Hacettepe Üniv., Ecz.Fak., Analitik Kimya A.B.D., Ankara, 2005.
- [39] ÖZEN, G., Farmasötik kremlerde UV türev spektrofotometrisi ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemleri ile izokonazol nitrat ve Diflukortolon Valerat miktar tayini. Analitik Kimya Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, T.C. Gazi Üniversitesi, Ankara, Ocak 2009.
- [40] GÜNDÜZ, T., İnrümentel analiz. Gazi Kitabevi, Ankara, 2002: 6. Baskı, 1357.
- [41] SKOOG, D.A., WEST, D.M. and HOLLER, F.J., *Fundamentals of Analytical chemistry*. saunders college publishing, seventh edition, USA,1996;476.
- [42] SKOOG, D.A., WEST, D.M., HOLLER, F.J., *Analitik kimya temelleri*. 2, Bilim yayıncılık, Ankara, 1999; 7. baskı.
- [43] QUİN, Z.H., TAN, R., PU, L.J., Fading spectrophotometric method for determination of sibutramine hydrochloride with Congo red and its reaction mechanism. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2006;34(3):403-406.
- [44] VALARMATHI, R., KARPAGAM, K.S.S., REVATHI, R., Spectrophotometric determination of sibutramine hydrochloride using folin-ciocalteu reagent, *The Indian Pharmacist*, 2004;25(3):71-72.

## ÖZGEÇMİŞ

Gökçe KILIÇARSLAN, 26.11.82'de İstanbul' da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Sakarya'da tamamladı. 2001 yılında Hacı Zehra Akkoç Kız Lisesi Yabancı dil Ağırlıklı Bölümünden mezun oldu. 2002 yılında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Kimya Bölümüne girdi ve 2006 yılında mezun oldu. 2007-2008 yılları arasında Sakarya Üniversitesi Kimya Öğretmenliği Bölümünde Tezsiz Yüksek Lisans Yaptı. 2009 yılında 8 ay kadar özel bir laboratuarda Kalite Yöneticiliği yaptı.