

**TİYAMİN ve PİRİDOKSİN ETKİN
MADDELERİNİN FARMASÖTİK
PREPARATLARDA HPLC
YÖNTEMİ İLE ANALİZİ**

Onur ŞENOL

**Analitik Kimya Anabilim Dalı
Tez Yöneticisi :
Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU**

Yüksek Lisans Tezi - 2010

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Temel Eczacılık Bilimleri
Analitik Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Programı

TİYAMİN VE PİRİDOKSİN ETKİN MADDELERİNİN FARMASÖTİK
PREPARATLARDA HPLC YÖNTEMİ İLE ANALİZİ

ONUR ŞENOL

Tez Savunma Tarihi :

Tez Danışmanı

: Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU

Jüri Üyesi

: Doç. Dr. Zuhai GÜVENALP

Jüri Üyesi

: Yrd. Doç. Dr. Fehmi ODABAŞOĞLU

Jüri Üyesi

: Yrd. Doç. Dr. Yeşim AKTAŞ

Jüri Üyesi

: Yrd. Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA

Prof. Dr. İsmail Ceylan
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	I
TEŞEKKÜR	IV
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
TABLolar DİZİNİ	VII
ÖZGEÇMİŞ	VIII
ÖZET	IX
ABSTRACT	X
1. GİRİŞ VE AMAÇ	11
2. GENEL BİLGİLER	13
2.1. Piridoksin	13
2.1.1. Piridoksin Kimyasal Bileşimi	15
2.2. Tiyamin	16
2.2.1. Tiyamin Molekülünün Keşfi	17
2.2.2. Tiyaminin Kimyasal Bileşimi	19
2.2.3. Tiyamin Molekülünün Biyosentezi	20
2.2.4. Tiyamin İçeren Besinler	21
2.3. HPLC ile Yapılan Çalışmalar	21
2.4. Kromatografik Yöntemler	23
2.4.1. Kromatografik Yöntemlerinin Sınıflandırılması	24
2.4.2. Kromatografide Temel Olan Fiziksel ve Kimyasal Olaylar	25
2.4.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	27
2.4.3.1 Sıvı Kromatografisinin Dayandığı Temel Parametreler	28
2.4.3.1.1. Dağılma (Partisyon) Katsayısı	28
2.4.3.1.2. Alıkonma (Retensiyon) Zamanı:	29
2.4.3.1.3. Analitin Göç Hızı, Kapasite Faktörü	31
2.4.3.1.4. Seçicilik Faktörü, Farklı Göç Hızları	31
2.4.3.1.5. Kolon Verimi	32
2.4.3.1.6. Kolon Performansının Optimizasyonu	33
2.4.3.1.7. Kolon Ayırma Gücü (Rezölüsyon)	33

2.4.3.1.8.Kolon Performansına Etki Eden Değişkenler	34
2.4.3.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Cihazı	34
2.4.3.2.1.Pompalar	35
2.4.3.2.2.Enjektörler.....	35
2.4.3.2.3. Kolonlar	36
2.4.3.2.4. Dedektörler	37
2.4.3.2.4.1.UV-Görünür Bölge Dedektörleri	38
2.4.3.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinin Uygulama Alanları	38
2.4.3.3.1. Kimyasal Ayırma.....	39
2.4.3.3.2. Saflaştırma	39
2.4.3.3.3.Kalitatif Analiz	39
2.4.3.3.4. Kantitatif Analiz	40
2.5. Analitik Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)	41
2.5.1. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi.....	42
2.5.2. Doğruluk.....	43
2.5.3 Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik.....	43
2.5.4. Teşhis Limiti.....	43
2.5.5. Miktar Tayin Limiti	44
2.5.6. Kararlılık.....	44
2.5.7. Seçicilik ve Belirleyicilik	45
2.5.8. Sağlamlık	45
3. MATERYAL VE YÖNTEM	46
3.1. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler.....	46
3.2. Cihazlar	46
3.3. Yöntem	46
3.3.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yöntem Şartları	47
3.3.2. Yöntem Geçerlilik Testleri	47
3.3.2.1. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı	47
3.3.2.2.Doğruluk/Kesinlik.....	48
3.3.2.3. Teşhis Limiti (LOD) ve Miktar Tayin Limiti (LOQ).....	48
3.4.Tabletlerin Hazırlanması	48
4. BULGULAR	50
4.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması	50

4.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yöntemi Geliştirme	50
4.2.1. Hareketli Faz Optimizasyonu.....	50
4.2.2. pH Optimizasyonu	53
4.3. HPLC Yönteminin Geçerlilik Testleri	53
4.3.1.Özgünlük (Belirleyicilik)	53
4.3.2. Doğrusallık/Çalışma Aralığı	56
4.3.3.Doğruluk/Kesinlik	57
4.3.4. Teşhis Limiti (LOD) ve Miktar Tayin Limiti (LOQ).....	58
4.3.5. Geri Kazanım	58
4.4 Gerçek Numunelere Uygulama	60
4.4.1. Geliştirilen Yöntemlerin Farmasötik Preparatlara Uygulanması.....	60
4.4.1.1. Benol® Tablet (250 mg Pridoksin + 250 mg Tiyamin/Tablet)	60
5.TARTIŞMA.....	62
6. KAYNAKLAR	66

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimimin ürünü olarak yaptığım bu tezin hazırlanmasında katkıları olan;

Benim en iyi şekilde yetişmem için ilgisini, fikirlerini, sevgisini, yardımlarını esirgemeyen ve bu yolda her türlü fedakârlığı yapmaktan kaçınmayan, 5. Ulusal Analitik Kimya Kongresi Kongre Başkanlığını başarı ile tamamladıktan sonra izin dahi kullanmadan bütün çalışmalarına her noktada büyük destek veren Sayın Hocam Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU'na,

Analitik Kimya Laboratuvarlarında yaptığım çalışmalar esnasında yardımlarını esirgemeyen ana bilim dalımız çalışma arkadaşlarım Araştırma Görevlisi Alptuğ ATİLA, Araştırma Görevlisi Murat ÖZTÜRK ve Yrd. Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA'ya,

Saf su ve pH ölçümlerinde yardımcı olan Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Yrd. Doç. Dr. Fehmi ODABAŞOĞLU ve Araş. Gör. Özlem AYDIN'a Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Yeşim AKTAŞ ve Arş. Gör. Rukiye SEVİNÇ ÖZAKAR'a,

Tez çalışmalarımda bana çeşitli konularda destek olan ve bilgisayar çalışmalarımda yardım eden değerli arkadaşlarım Erkan ER, Salih Burak KÖPRÜLÜ ve Ayhan ŞENDUR'a,

Ayrıca hiçbir zaman fedakârlıktan kaçınmayan sevgili ailem Yücel ŞENOL, Nihal Fikren ŞENOL ve Gülşah ŞENOL'a teşekkürü bir borç bilirim.

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
ThMP	Tiyamin monofosfat
ThDP	Tiyamin difosfat
TPP	Tiyamin pirofosfat
LOD	Duyarlılık Teşhis Limiti
LOQ	Miktar Tayin Limiti

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Piridoksin Kimyasal Yapısı	16
Şekil 2.2. Tiyaminin Kimyasal Yapısı	20
Şekil 2.3. Hareketli ve durgun fazlara göre kromatografik sınıflandırma	25
Şekil 2.4. HPLC Kromatogramı	30
Şekil 2.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi cihazının şematik görünüşü	35
Şekil 4.1. Hareketli faz bileşiminin 70:30 (su-metanol, v/v) olduğu şartlarda piridoksin ve tiyamin karışımı çözeltisinden elde edilen kromatogram	51
Şekil 4.2. Hareketli faz bileşiminin 80:20 (su-metanol, v/v) olduğu şartlarda piridoksin ve tiyamin karışımı çözeltisinden elde edilen kromatogram	52
Şekil 4.3. Hareketli faz bileşiminin 91:9 (su-metanol, v/v) olduğu şartlarda piridoksin ve tiyamin karışımı çözeltisinden elde edilen kromatogram	52
Şekil 4.4. Standart tiyaminin HPLC kromatogramı (5 µg/mL)	54
Şekil 4.5. Standart pridoksinin HPLC kromatogramı (10 µg/mL)	54
Şekil 4.6. 5 µg/mL tiyamin içeren farklı derişimlerinde standart pridoksinin HPLC kromatogramları	55
Şekil 4.7. 5 µg/mL pridoksin içeren farklı derişimlerinde standart tiyaminin HPLC kromatogramları	55
Şekil 4.8. HPLC yöntemi ile pridoksin ve tiyaminin standart çalışma çözeltilerin ortalama kalibrasyon eğrileri: A) Tiyamin B) Pridoksin	56
Şekil 4.9. 5 µg/mL derişimde ilaç çözeltisine eklenen 3 farklı derişimdeki pridoksinin standart çalışma çözeltilerinin kromatogramı	59
Şekil 4.10. 5 µg/mL derişimde ilaç çözeltisine eklenen 3 farklı derişimdeki tiyamin standart çalışma çözeltilerinin kromatogramı	59
Şekil 4.11. Benol® ilaç çözeltisinin HPLC kromatogramı	61

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. Piridoksin ve tiyamin α -T için HPLC-UV yöntem şartları	47
Tablo 4.1. HPLC yöntemi ile pridoksin ve tiyaminin standart çalışma çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri	57
Tablo 4.2. HPLC yöntemiyle pridoksin ve tiyaminin standart çözeltilerinin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)	57
Tablo 4.3. Farmasötik preparatlarda piridoksin ve tiyamin analitik kazanım değerleri (n=3) ...	60
Tablo 4.4. HPLC yöntemiyle 250 mg Pridoksin + 250 mg Tiyamin içeren Benol® tabletin miktar tayini	61

ÖZGEÇMİŞ

ONUR ŞENOL

Adres : ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya ABD.
Gsm : (530) 932 42 24
Ev : (442) 231 52 17
e-mail : onursenol@atauni.edu.tr

Kişisel bilgilerim:

Uyruk : T.C.
Doğum yeri : Erzurum
Doğum Tarihi : 06/05/1983

İş Deneyimlerim:

1- 2006-2007 Staj : Özel Arı Koleji Fen Lisesi
2- 2008-2010 : Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü (Araştırma Görevlisi)

Eğitim:

Nevzat Karabağ Anadolu Öğretmen Lisesi 1997-2001
Orta Doğu Teknik Üniversitesi Kimya Öğretmenliği Bölümü 2001-2007 (Lisans)
Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya A.B.D. 2008-2010 (Yüksek Lisans)

Yabancı dil:

İngilizce /İleri Düzeyde

Bilgisayar Bilgisi:

(Office Programları, Matlab, SPSS, HTML, ASPX)

TİYAMİN VE PİRİDOKSİN ETKİN MADDELERİNİN FARMASÖTİK PREPARATLARDA HPLC YÖNTEMİ İLE ANALİZİ

ÖZET

B₁ (tiyamin) ve B₆ (piridoksin) birçok biyokimyasal reaksiyonda kilit rol oynayan ve sağlıklı yaşamın vazgeçilmez elemanlarından olan B grubu vitaminlerindendir. Sağlık açısından önemli bir yere sahip olan her iki vitaminin farklı ortamlarda analizleri ile takip edilmesi gerekmektedir. Bu sebeple çalışmada piridoksin (B₆) ve tiyaminin (B₁) vitaminlerinin farmasötik preparatlarda miktar analizi için literatürdeki yöntemlere alternatif yeni bir HPLC yöntemi geliştirilip ve yöntem geçerlilik testlerinin yapılması amaçlanmıştır.

Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) çalışmasında, metanol:Su (9:91, v:v; pH:3,5) mobil faz, C18 kolon, 1 ml/dak akış hızı, 10 µL enjeksiyon hacmi, UV dedektör ve 274 nm dalga boyu çalışma parametreleri kullanıldı. Yöntem şartları optimize edildikten sonra geçerlilik testleri (validasyon) yapıldı. Güniçi ve günler arası yapılan çalışmalar ile yöntemin doğruluğu bağıl hatayla, kesinlik bağıl standart sapma (BSS) ile verildi. Bağıl hata ve Bağıl Standart Sapma % 8 den daha küçük olarak tespit edildi. Ayrıca yöntemin teşhis limiti (LOD) 0,5 µg/mL ve miktar tayin limiti ise 1 µg/mL olarak ve farmasötik preparattan analitik geri kazanım değeri de % 85 ile % 102 aralığında belirlendi. Geliştirilip valide edilen yöntem 250 mg Pridoksin + 250 mg Tiyamin içeren Benol tablete başarıyla uygulandı.

Anahtar Kelimeler : Piridoksin, Tiyamin, HPLC, Yöntem geçerlilik Testi

QUANTIFICATION OF PYRIDOXINE AND THIAMINE IN PHARMACEUTICAL PREPARATIONS BY HPLC METHOD

ABSTRACT

Thiamine and pyridoxine which are also called vitamin B1 and B6, play very crucial role in biochemical reactions in human body. In this study, we are going to determine the amounts of these two molecules in pharmaceutical preparations.

According to the the results of the analysis that were done by HPLC method: The Limit of Detection (LOD) value is 0,5 µg/mL and Limit of Quantification value is 1 µg/mL for both Pyridoxine and Thiamine molecules. All of the analysis were done in 274 nm wavelength. Reletavie Standard Deviation (RSD) is also calculated and with respect to the results RSD values are lower than 8 percentages. The results were about %7,93 and lower.

Water - Methanol (91:9) mixture at pH 3.5 was used as mobil phase. Stock solutions are prepared in 0,1 M HCl and then dilution process were done by deiyionized water. The flow rate of the method is 1 mL/min. And analytical recovery values are in between %93- %102

Key Words : Pyridoxine, Thiamine, HPLC, Uv-Visible Spectrophotometry, Analytical Recovery.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Vitaminler genel olarak; vücutta üretilemeyen veya yetersiz üretilen ancak besinler yoluyla alınabilecek, birçok metabolik ve biyokimyasal reaksiyonda rol oynayan sağlıklı yaşamın vazgeçilmez bir parçası olan organik bileşiklerdir. Vitamin Latince yaşam anlamına gelen “vita” sözcüğünden kaynaklanır. Vitaminler yağda ve suda çözünenler olmak üzere iki gruba ayrılırlar. A, E, D ve K vitaminleri yağda çözünen vitaminler olup C vitamini ile B grubu vitaminler ise suda çözünen vitaminlerdir.

B grubu vitaminleri B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₇, B₉ ve B₁₂ olmak üzere en büyük vitamin grubu olarak göze çarpmaktadır. Bu vitaminler vücutta adeta birer savunma silahı gibi çalışarak sinir sistemi ve kan hücrelerinin vücuttaki sentezi ile kardiyovasküler sistem üzerinde ve kanserin önlenmesinde önemli işlevlere sahiptirler.

B grubu vitaminlerinden B₆ (Piridoksin) ve B₁ (Tiyamin), eksikliğinde vücut tarafından en fazla belirti gösterilen maddeler olarak göze çarpmaktadır. Piridoksin, bir diğer adıyla B₆ vitamini, özellikle protein metabolizmasında çok önemli bir koenzimdir ve birçok nörotransmitterin sentezinde rol alır. Vücut için en önemli görevi güçlü bir bağışıklık sisteminin oluşturulmasındadır. Gıdaların hazırlama süreci içerisinde büyük miktarda yitirilebilen bir vitamindir. Vücutta eksikliği kendini uykusuzluk, kansızlık, cilt sorunları gibi problemlerle gösterilebilir. Şeker hastaları, ağır işlerde çalışanlar ve doğum kontrol hapı kullananlar için B₆ vitaminine daha çok ihtiyaçları bulunmaktadır. Vücutta B₁₂ vitaminin emilebilmesi için de B₆ vitaminine ihtiyaç duyulur.

Tiyamin, bir diğer ismiyle B₁ vitamini, karbonhidrat metabolizmasında oldukça önemli bir vitamindir. Alyuvarların oluşumu ve iskelet için de hayati derecede

önemlidir. Eksikliği depresyon, bitkinlik, vücutta su birikimi ve sindirim sistemi problemlerine yol açabilir.

B₁ ve B₆ vitaminleri vücutta depolanamayan vitaminlerdir. Bundan dolayı dışarıdan alınması gerekmektedir. Dışarıdan alınma işlemi, besinler ve ileri eksikliklerde ise farmasötik preparatlarla olmaktadır.

Önemli işlevlere sahip olan B₁ ve B₆ vitaminlerinin değişik ortamlarda analizlerinin gerçekleştirilmesi oldukça önemlidir. Bu çalışmada adı geçen her iki vitaminin farmasötik preparatlarda miktar tayini için literatürdeki yöntemlere alternatif daha hassas ve kolay yeni bir HPLC yönteminin geliştirilmesi ve yöntem geçerlilik testlerinin (validasyon) yapılması amaçlanmıştır.

Sonuç olarak; B vitamini komplekslerinden Piridoksin (B₁) ve Tiyamin (B₆) vitaminleri insan sağlığı açısından oldukça önemli bir yere sahip olduğundan dolayı rutin analizlerinin yapılması gerekmektedir. Bu çalışmada geliştirilen yöntemin ileriki dönemde hayvan ve klinik çalışmalara da uygulanması hedeflenmektedir. Ayrıca B vitaminleri ile ilgili diğer yöntem geliştirme çalışmalarına da yardımcı olacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Piridoksin

Vitamin B kompleksleri suda çözünen vitaminlerdir¹. Hücre çoğalmasından kan hücreleri yapımına kadar birçok metabolik faaliyette işlev görürler¹⁻³. Bu vitamin grubu içerisindeki vitaminlerden bir tanesi de B₆ vitaminidir. B₆ vitamini piridoksin, piridoksal, piridoksamin, piridoksin-5-fosfat, piridoksal-5 fosfat ve piridoksamin-5 fosfat olmak üzere altı temel formda bulunmaktadır. Ayrıca piridoksin β glukozid, depolama formu olarak bitkilerde bulunmaktadır^{4,5}. B₆ vitaminlerinin birçok biyokimyasal fonksiyonu vardır. Özellikle piridoksin sodyum-potasyum dengesinde, alyuvar hücrelerinin üretiminde, homosistein formasyonunu baskılayarak kardiovasküler rahatsızlıkların indirgenmesinde, monoamin, transmitterler, serotonin, dopamin, epinefrin ve norepinefrin üretiminde görevler alır. Ayrıca aromatik amino asit dekarboksilaz enziminin de kofaktörüdür⁶.

Piridoksin eksikliğine en sık beslenme bozuklukları sebebiyle rastlanır. Bunun dışında piridoksin antagonisti olan isoniazidsiklosporin ve penisilamin etkin maddelerini içeren tedavi kürleri de piridoksin eksikliğine sebep olabilmektedir. Bu tedavi kürünü alan hastaların piridoksin kan düzeyleri mutlaka kontrol altında tutulmalıdır. Kan seviyesinde görülen düşüklüklerde hemen müdahale edilerek piridoksin takviyesi yapılması gerekmektedir. Günlük ihtiyaca bakıldığında çocuklarda 0,9-1,6 mg, erişkinlerde ise 2,0-2,2 mg'lık bir pridoksin alımı gerekmektedir³. Piridoksin eksikliği ile ilgili yapılan çalışmalarda yorgunluk iştahsızlık, aşırı stres gibi önemsiz sayılabilecek belirtiler verilse de sideroblastik anemi ve sinir iltihabı gibi önemli belirtiler dikkate değer olarak verilmektedir⁷. Toplumlarda hafif piridoksin

eksikliği oldukça yaygın görülmektedir. Hafif eksikliklerde kişide depresyon görülebilir. Daha ağır eksikliklerde ise sinirler hasara uğrar, periferik nevropati oluşabilir. Piridoksin ya da B₁₂ vitamini eksikliği çok olanlarda anemi durumu gözlenir. Anemi belirtileri uyuşukluk, yorgunluk, çaba harcandığında nefes darlığı, deride ve mukozada solgunluktur. Ağız kenarlarındaki çatlakların folik asit yetersizliğinden ileri geldiği bilinirse de bu, demir, B₂ ya da B₆ yetersizliğinden de olabilir. Piridoksin eksikliği çoğu kez dış belirtiler sonucunda değil, kan testleri sonunda, kişide anemi olduğu anlaşılınca ortaya çıkar⁸⁻¹². Eksikliği megalobastik kansızlığı da meydana getirir^{11,12-14}. Bu hastalığa tropikal bölgelerde çok rastlanır. Bu eksikliğin başlıca nedeni, protein-kalori eksikliğine dayanmaktadır. Normal beslenen insanlarda ancak sindirim bozukluğunda ve gebelikte görülebilir. Sara hastalığında kullanılan ilaçlar verilirken bu vitaminin de verilmesi gerekir. Bazı antibiyotikler bu vitamini yok etmektedir. Bira, şarap, rakı vs. gibi alkollü içecekleri içen kimselerde ve sigara kullananlarda da bu vitamin eksikliği oldukça sık görülmektedir¹⁵.

Piridoksin en fazla yeşil yapraklı sebzeler, bira mayası, karaciğer, böbrek, yumurta, zarı alınmamış tahıllar, ceviz, badem, fındık, fıstık, mercimek, ıspanak, yonca, mavi-yeşil alg (yosun), maydanoz, nane, kuru fasulye (baklagiller) ve tohumlu gıdalarda bulunmaktadır¹⁶.

Yukarıda belirttiğimiz gibi piridoksin kan hücrelerinin yapımında çok önemli işlevlere sahiptir. Buna bağlı olarak belli tedavi kürleri veya uygulanan diyet sebebiyle piridoksin bakımından eksik kalan insanlarda kan hücresi yapımı zarar görür ve buna bağlı olarakta sideroblastik anemi bu hastalarda hızla gelişir. Bu durumdaki hastalara piridoksin kürü uygulanarak piridoksin düzeyleri kontrol altında tutulur. Piridoksin

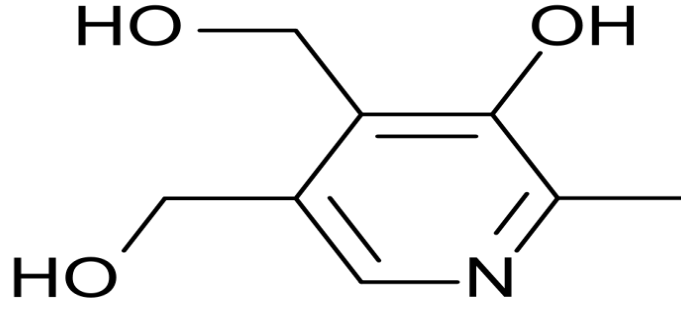
düzeyinin kontrol altında tutulması için de kan seviyelerine bakılması çok önemlidir ve hayati bir önem arz eder.

Özellikle antibiyotik tedavisi uygulanan hastalarda B₆ inhibe olmakta ve bu da sinir iltihabı anemi dilde ve ağız çevresinde yaralar depresyon hali gibi çeşitli şikâyetler ortaya çıkarmaktadır. Özellikle anemi ve sinirsel hastalıklar ciddi bir önem arz etmekte ve metabolizmanın dengesi bozulmaktadır. Bu yüzden hamilelikte ve bir takım ilaç tedavileri esnasında piridoksin etkin maddelerinin eksikliğin oluşturduğu şikâyetleri azaltmada en önemli durum bu maddelerin eksikliğin belirlenmesi kan düzeylerinin tespit edilmesi ve buna uygun takviyenin yapılmasıdır^{15,16}.

Piridoksin tayininde HPLC, HPTLC, spektrofotometri ve florimetri yöntemleri ile analiz yapılabilmektedir¹⁻⁴.

2.1.1. Piridoksin Kimyasal Bileşimi

Piridoksin molekülü bir pirimidin halkasına bağlı hidroksi ve hidroksimetil substitüentlerinden oluşan bir yapıdır¹. Genel formülü C₈H₁₁NO₃'dür. IUPAC'a göre 2-metil-3-hidroksi-4,5-bis (hidroksi-metil) piridin olarak isimlendirilmektedir (Şekil 2.1.). Asidik sulu ortamlarda çözünür. Erime noktası 159-162 °C'dir. Molekül ağırlığı 169,18 g/mol'dür².



Şekil 2.1. Piridoksin Kimyasal Yapısı

2.2. Tiyamin

B vitamin komplekslerinden bir diğeri de B₁ olarak da isimlendirilen tiyamin formudur. İçeriğindeki sülfür dolayısıyla tiyovitamin olarak adlandırılır. Eksikliğinde nörolojik detrimental etkilere sebebiyet verdiği için ilk olarak aneurin diye isimlendirilmiştir. Fakat dünyada kabul gören jenerik isimlendirmesi B₁'dir. Tiyamin molekülünün fosfat türevleri bir çok hücre içi reaksiyonlarda rol oynamaktadır. En iyi bilinen tiyamin formu olan tiyamin pirofosfat (TPP) bir koenzim olarak şeker ve aminoasit yıkımında önemli rol oynamaktadır. Ayrıca diğeri bir fosfat türevi olan ThDP ise alkol fermantasyonunun ilk ayağında reaksiyona müdahil olmaktadır. Bütün canlı organizmalar biyokimyasal faaliyetlerde tiyamini kullanmaktadırlar. Buna karşın, tiyamin molekülü yalnızca bakteriler, mantarlar ve bitkiler tarafından sentezlenmektedir. Hayvanlar ve insanlar bu maddeyi besin yoluyla dışarıdan almaktadırlar. Zaten bu sebepten dolayı tiyamin vitamin grubu içerisinde yer almaktadır. Yeterli derecede tiyamin alınmaması durumunda kuşlarda polineuritis adı verilen bir hastalık oluşur. Memelilerde de bu hastalığa benzer ve beriberi adı verilen bir sinir sistemi hastalığı meydana gelmektedir. Buna ek olarak yetersiz tiyamin alımı önlem alınmadığı ve tedavi kürü uygulanmadığı takdirde kardiyovasküler sistemde

ölümcül hasarlara da neden olabilmektedir¹⁷. Bu iki ciddi rahatsızlık haricinde tiyamin eksikliği halsizlik, kilo kaybı, asabiyet, zihin karışıklığı¹⁸ gibi belirtiler de vermektedir. Tiyamin eksikliğinin sebebiyet verdiği düşünülen ve bu yönde çeşitli bulgular elde edilen bazı belirtiler de vardır. Bununla beraber yeni tiyamin türevlerinin keşfi de tiyamin üzerine birçok araştırma yapılması gerekliliğini ortaya koymuştur¹⁹.

2.2.1. Tiyamin Molekülünün Keşfi

Tiyamin suda çözünen vitaminler içerisinde ilk keşfedilen moleküldür²⁰. Bu yönde yapılan bütün çalışmalara ilham kaynağı olan ve vitamin kimyasına liderlik eden önemli bir moleküldür.

Çin’de bulunan eski tabletlerde beriberi (tiyamin eksikliğinden kaynaklanan nörolojik bir rahatsızlık) hastalığı milattan 2700 yıl önce tanımlanmıştır. Fakat o dönemlerde hastalığın sebebini teşhis edebilmek sahip olunan imkânlar nedeniyle mümkün değildi. 1884 yılında Kanehiro Takaki beriberi hastalığına dair ortaya konan bütün teorileri reddederek beriberi hastalığının temel sebebinin protein ve azot eksikliğinden kaynaklandığını belirtmiştir.

Daha sonra 1897 yılında Hollandalı bir askeri doktor olan Christian Eijkmann önemli bir keşif yaptı. Yaptığı çalışmada kabuğu soyulmuş pirinç tüketen tavukların beriberi hastalığına yakalandığını buna karşın kabuklu pirinçleri tüketen tavuklarda ise beriberi hastalığına çok nadir rastlandığını gösterdi. Bununla birlikte beriberi hastalığına yakalanmış tavuklara kabuklu pirinç verdiğinde hastalıkta önemli iyileşmeler olduğunu deneyleriyle göstermişlerdir²¹. Bu deneylerden yola çıkarak pirinç kabuklarında bulunan bir maddenin bu hastalığa karşı iyi geldiğini ortaya koydu. Eijkmann bu önemli

çalışmasıyla 1929 Nobel ödülüne de layık görüldü. Gerrit Grijns 1901 yılında yaptığı çalışmayla, vücut için gerekli bir maddenin pirinç kabuğunda bulunduğunu ve soyulmuş pirinçlerde yıkanarak bu maddenin yok olduğunu ve bunun da beriberiye yol açtığını ve tüm biyokimyasal mekanizmasını çözümleyerek literatüre büyük bir katkı sağlamıştır²². Ancak 1911 yılına kadar bu maddenin izolasyonu ve nasıl bir madde olduğu konusunda herhangi bir bilgi kaydedilmemiştir.

1911 yılında Casimir Funk isimli bilim adamı pirinçten ilk defa antiüretik bir maddeyi izole etmeyi başarmıştır. Hollandalı kimyagerler Barend Coenraad Petrus Jansen ve William Fredrick Donath bu maddenin aktif ajanının izolasyonunu ve kristalizasyonunu 1926 yılında başarılı bir şekilde gerçekleştirmişlerdir²³. Bu yapı yine aynı gruptan Robert Runnels Williams tarafından 1934 yılında analitik açıdan incelendi teşhis ve tayini gerçekleştirildi. 1936 yılında ise bu madde ilk olarak tiyamin olarak laboratuvar koşulları altında sentezlendi²⁴.

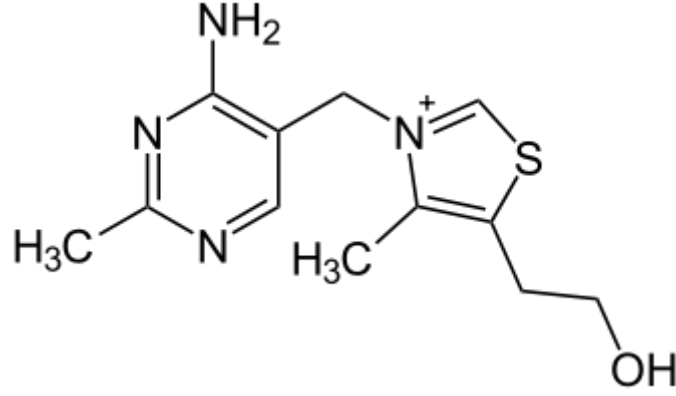
Bileşik ilk olarak aneurin (antinörotik vitamin) olarak sir Rudolph Peters tarafından isimlendirildi. Rudolph Peters, soyulmuş ve yıkanmış pirinçler ile beslediği güvercinlerde vitamin eksikliği oluşturarak çalışmalarını gerçekleştirmiştir. Bu beslenme sonrasında güvercinler başlarını omuzlarının arasına sokmaya ve buna benzer bazı karakteristik belirtiler sergilemeye başlamışlardır. Opistotonos adı verilen duruma gelen güvercinlerin birkaç gün sonra da öldüklerini ve tedavi uygulanan hayvanlarda ise çok kısa sürede iyileşmeler olduğu gözlemlenmiştir. Bu radikal değişimlere rağmen tedavi öncesi ve sonrası beyin yapıları incelendiğinde güvercinlerin beyinde hiçbir morfolojik farklılık gözlemlenmemiştir²⁵.

Lochman ve Schuster 1937 yılında difosfat tiyamin türevi olan ThDP pürüvatın oksidatif dekarboksilasyonu reaksiyonunda kofaktör olduğunu ortaya koydu (reaksiyon pürüvat hidrojenasyonu olarak da bilinmektedir)²⁶. Bu çalışma sayesinde tiyaminin hücre içindeki fonksiyonu da belirlenmiştir. Pürüvat dehidrojenaz enzimi tiyaminin kofaktör olarak yer aldığı birçok mekanizmadan sadece bir tanesidir.

1958 yılında Ronald Breslow ThDP'nin tüm mekanizmalarını ortaya koymuştur. 2 pozisyonundaki proton substitüsyonunu açığa çıkararak reaksiyonun nasıl ilerlediğini göstermiştir.

2.2.2. Tiyaminin Kimyasal Bileşimi

Tiyamin renksiz bir moleküldür. Molekül formülü $C_{12}H_{17}N_4OS$ 'dir. IUPAC'a göre 2-[3-[(4-amino- 2-metil- primidin- 5-yl) methyl]- 4-metil- tiazol- 5-yl] etanol olarak isimlendirilmektedir. Yapısında bir primidin halkası ve metilen köprüsüyle birleşmiş bir tiyazol halkası mevcuttur (Şekil 2.2.). Tiyamin suda, metanolde ve gliserinde çözünür. Aseton, eter, kloroform ve benzen gibi organik çözücülerde ise çözünmez. Asidik ortamlarda stabilitesi yüksektir fakat alkalın ortamda çok çabuk bozunur. Isıya, Ultraviyole ışın ve gamma X-ray ışınlarına da hassasiyeti olan bir moleküldür²⁷⁻³⁰.



Şekil 2.2. Tiyaminin Kimyasal Yapısı

2.2.3. Tiyamin Molekülünün Biyosentezi

Tiyamin molekülünün sentezi bakteriler, protozoalar, bitkiler ve mantarlarda gerçekleşir^{31,32}. Tiyazol ve primidin ayrı ayrı sentezlenir ve daha sonra ThDP yi oluşturmak üzere tiyamin fosfataz enzimi yoluyla bu iki halka birleştirilir. Biyosentez işleminde izlenen yol organizmadan organizmaya farklılık gösterir. E. Coli ve diğer enterobakterilerde ThMP fosforilasyona uğrayarak ThDPye dönüşürken, birçok bakteride ve ökaryotik hücrede ThMP hidroliz olarak tiyamine dönüşür.

Biyosentetik mekanizma ‘riboswitch’lerle ayarlanır. Ortamda yeterli tiyamin varsa tiyamin mRNA’ya bağlanır ve tiyamin üretici enzimlerin inhibisyonuna sebep olur. Eğer ortamda yeterli tiyamin yoksa mRNA’ya da bağlanacak tiyamin olmaz ve enzimler aktive olarak tiyamin sentezine hücre içerisinde başlanır. Hücre içi tiyamin döngüsü bu şekilde cereyan eder. TPP riboswitchleri hem prokaryotik hem de ökaryotik hücrelerde aynı anda teşhis edilebilen tek riboswitchlerdir³³.

2.2.4. Tiyamin İçeren Besinler

Tiyamin birçok besin içerisinde düşük derişimlerde bulunur. Domuz eti ve maya tiyamince en zengin besinler olarak göze çarpar. Buna rağmen, lifli tahıllar domuz eti ve mayaya göre tiyamin tedavisinde daha çok başvurulmuş besinlerdir. Bunun sebebi ise tahıllara dünyanın her yerinde daha kolay ve ucuz olarak ulaşılabilmesinden ileri gelmektedir. Tahılların özellikle kabuklarında yüksek miktarda tiyamin bulunmaktadır. İşlenmiş ve kabukları soyulmuş tahıllarda ise çok düşük derişimlerde tiyamin bulunmaktadır. Örneğin 100 gram kabuklu unda 0,55 mg tiyamin bulunurken işlenmiş beyaz unda bu değer 0,06 mg'dır. Amerika ve Avrupa Birliği ülkelerinde beyaz un piyasaya sürülmeden önce tiyamin, demir niyasin ve riboflavince zenginleştirilmektedir. Asparagus, portakal, ciğer, ayçekirdeği ve patates tiyamince zengin olan diğer besinlerdir.¹⁸.

Günlük alınması gereken Tiyamin miktarı yetişkin insanlar için 1,4 mg olarak belirlenmiştir. Fakat gönüllüler üzerinde yapılan testlerde günde 50 mg tiyamin alınması zeka düzeyinde kayda değer gelişmeler artışlara sebebiyet vermiştir³⁴. Besinlerden veya besin destek ürünleri yoluyla alınan tiyaminin aşırı alımına ait herhangi bir rahatsızlık yada semptom rapor edilmemiştir. Bu yüzden tiyamin alımına dair bir üst limit (Tolerable Upper Intake UL) değeri yoktur.

2.3. HPLC ile Yapılan Çalışmalar

Dinç ve ark.³⁵; mobil faz olarak 0,1 M (NH₄)₂CO₃-Su-Metanol (5/15/80: h/h), 254 nm dalga boyu, C₁₈ kolon, klorfeniramin maleat iç standart çalışma parametrelerini kullanarak HPLC ile farmasötik preparatlarda pridoksin ve tiyamin analizini

gerçekleştirmişlerdir. Aynı zamanda türev-oran spektroskopi ve matriks rezolasyon yöntemini geliştirilerek bu iki etken maddenin analizini gerçekleştirmişlerdir.

Ndaw ve ark.³⁶; HPLC ile besinlerdeki tiyamin ve piridoksin miktarlarını belirlemeye çalışmışlardır. Mobil faz olarak pH 3,5'e ayarladıkları Metanol-Su (40/60:h/h) ve C₁₈ kolonunu kullanmışlardır.

Markopoulou ve ark.³⁷; multivitamin tabletlerinde piridoksin tiyamin ve siyanokobalamin miktarını HPLC ile belirlemişlerdir. Çalışmada, gradient elüsyon, mobil faz olarak % 0,015 trietilamin içeren pH 2,7'ye ayarlanmış Su- Asetonitril, 280 nm dalga boyu çalışma parametreleri kullanılmıştır.

Höller ve ark.³⁸; folik asit, nikotinamid, nikotinic asit, riboflavin, ribofilavin-5'-fosfat, piridoksin ve tiyaminin tabletlerde ters faz HPLC yöntemiyle analizini gerçekleştirmişlerdir. Yapılan analizlerde vitaminler birbirlerinden ayrılmış fakat farklı dalga boylarında ölçümler yapılarak hassasiyet artırılmaya çalışılmıştır. Bu çalışmada pH'ı ise 2,8'e ayarlanmış fosfat tamponu ve metanol (80/20: h/h) mobil fazı kullanılmıştır. Analizde, 17-25 dakikalar arasında 254 nm dalga boyu kullanılarak tiyamin analizi, 10-17 dakikalar arasında da 280 nm dalga boyu kullanılarak piridoksin analizi yapılmıştır.

Marszall ve ark.³⁹; kolorimetrik ve UV dedektörlü HPLC yöntemiyle tiyamin hidroklorür, piridoksin hidroklorür ve siyanokobalaminin farmasötik preparatlarda miktar analizini gerçekleştirmişlerdir. Analizde pH'sı 3,55'e ayarlanmış 0,05 M fosfat tamponu ve % 10 metanol (0,018 M trietilamin) mobil fazı ve C₁₈ kolon kullanmışlardır. Tiyamin ve piridoksin için LOD değerleri sırasıyla 9,2 ve 2,7 ng/mL olarak belirlenmiştir.

Morten Kall⁴⁰, yapmış olduğu çalışmada besin örneklerinde piridoksin seviyesini floresans dedektörlü HPLC yöntemiyle belirlemeye çalışmıştır. C18 hypersil kolon, % 93 HCl tamponu ve % 7'lik asetonitril mobil fazı, 1 mL/dak akış hız ve 50 µL enjeksiyon hacmi çalışma parametrelerini kullanmışlardır. Örneklerin bozulmaması için 5°C'de vialler karanlık bir ortamda tutulmuştur.

Batifoulier ve ark.⁴¹; yapmış oldukları çalışmada fare dokularında tiyamin miktarını HPLC yöntemiyle belirlemeye çalışmışlardır. Bu çalışmada C16 kolon, pH 6'ya ayarlanmış potasyum tamponu ve metanol (80/20) mobil fazı, 20 µL enjeksiyon hacmi ve 1 mL/dak akış hızı parametrelerini kullanmışlardır. Tiyamin için alıkonma zamanı 6 dakika olarak belirlenmiştir.

2.4. Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, karmaşık karışımlardaki kimyasal bileşimlerin ayrılması tanınması ve tayini için yaygın olarak kullanılan analitik bir yöntemdir. Diğer ayırma yöntemlerinden hiç birisi kromatografi kadar etkili olmayıp uygulamada yaygın olarak kullanılmaz. Bu nedenle de kromatografik yöntemler daha çok araştırma amacıyla kullanılır. Bu sebeple çok geniş ve verimli bir alandır. Bu alandaki araştırmalardan dolayı şimdiye kadar 12 bilim adamına Nobel ödülü verilmiştir. Hiçbir araştırma alanında bu kadar çok Nobel ödülü verilmemiştir.

Çok değişik sistem ve tekniğe uygulandığı için, kromatografi teriminin tam olarak tanımını yapmak oldukça zordur. Bununla birlikte, bu yöntemlerin tümünde ortak olarak bir sabit faz ve bir de hareketli faz vardır. Akış halinde gaz veya sıvı bir fazla birlikte karışımdaki bileşenler, sabit faz üzerinden geçirilirler; geçirilme esnasında

bileşenlerin göç hızlarına bağlı olarak ayırma işlemi gerçekleşir. Bu bilgiler ışığında genel bir tanım yapmağa çalışırsak; kimyasal maddeler sabit bir ortama ilave edip bunların belli bir hareketli faz yardımıyla yüzey adsorpsiyonu, dağılma, iyon değiştirme ve elenme özelliklerine bağlı olarak, sabit ortamdan ayrılma yöntemlerine kromatografi denir.

2.4.1. Kromatografik Yöntemlerinin Sınıflandırılması

Kromatografik yöntemler kolon ve düzlemsel olarak ikiye ayrılabilir. Kolon kromatografisinde sabit faz dar bir kolonda (boru) tutulur, hareketli faz ise yer çekimi veya basınç etkisiyle kolondan geçirilir. Düzlemsel kromatografide ise, sabit faz düz bir yüzeyde veya bir kağıdın gözeneklerinde tutulur. Bu durumda hareketli faz, sabit faz üzerinde kılcal veya yer çekim etkisiyle hareket eder. Bunun dışında kromatografik yöntemler ayırma işlemlerinin farklılığına göre çok daha değişik şekillerde sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırmalar aşağıdaki şekilde verilebilir.

1. Teorik Sınıflandırma

- a-** Paylaşım Kromatografisi
- b-** Adsorpsiyon Kromatografisi
- c-** Boyutlandırma (Jel Filtrasyon ve Jel Geçirgenlik) Kromatografisi
- d-** İyon Değişim Kromatografisi

2. Pratik Sınıflandırma

- a-** Kağıt Kromatografisi

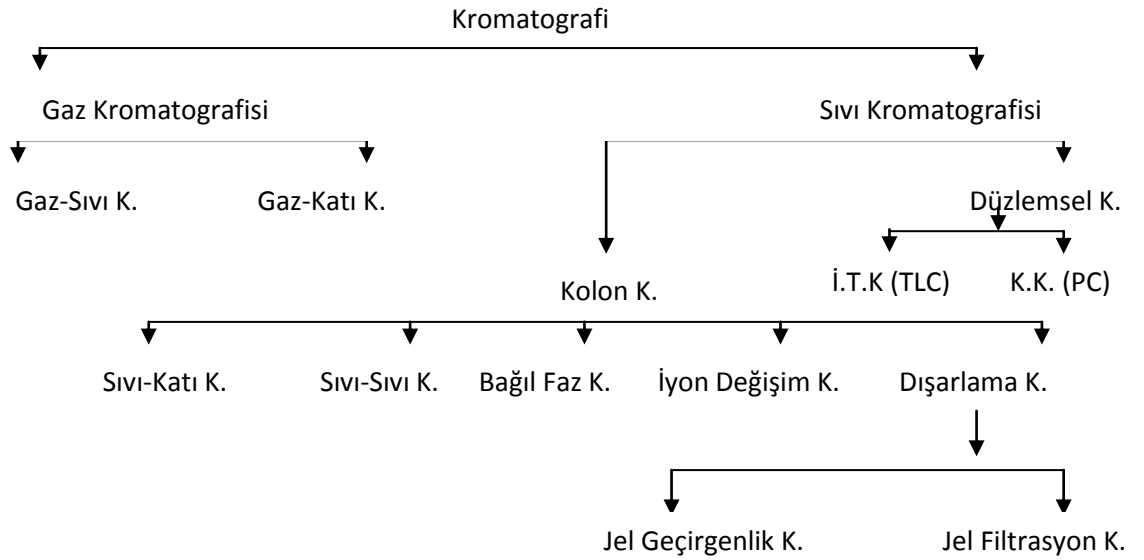
b- İnce Tabaka Kromatografisi

c- Kolon Kromatografisi

d- Gaz Kromatografisi

e- Sıvı Kromatografisi

3. Hareketli ve Durgun Fazlara Göre Sınıflandırma



Şekil 2.3. Hareketli ve durgun fazlara göre kromatografik sınıflandırma

2.4.2. Kromatografide Temel Olan Fiziksel ve Kimyasal Olaylar

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

1. Dağılma Kromatografisi: Dört ayrı tip sıvı kromatografi içinde en yaygın kullanılanıdır. Dağılma çözünen maddenin hareketli faz ile katı faz üzerinde adsorplanmış sıvı fazdaki çözünürlüğüne veya hareketli faz gaz ise uçuculuğuna dayanan bir olaydır. Sıvı-sıvı ve bağlı-sıvı faz kromatografisi olmak üzere iki alt sınıfa ayrılabilir. Bu teknikler arasındaki fark, destek katısına durgun fazın tutunma farkına dayanır. Sıvı-Sıvı kromatografisinde, sıvı bir sabit faz dolgu maddesinin yüzeyine fiziksel absorpsiyonla tutturulmuştur. Bağlı-sıvı faz kromatografisinde ise katı destek yüzeye bağlı organik sıvı türler kimyasal olarak tutturulmuştur. Dağılma kromatografisinde hareketli ve sabit fazların bağl polarlıklarına bağl olarak iki kısma ayrılmaktadır. Sabit faz oldukça polar ve hareketli fazda apolar ise buna Normal-Faz Kromatografisi, sabit faz apolar (çoğu zaman bir hidrokarbon) hareketli faz ise nispeten polar (su, asetonitril, metanol) ise buna da Ters-Faz Kromatografisi denir.

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

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

kuvvetli bir baz olan tersiyer amin grupları ($-N(CH_3)_3^+OH^-$) veya daha zayıf bir baz olan primer amin gruplarını ($-NH_3^+OH^-$) içermektedir.

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

2.4.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Tanecik büyüklüğü ve polaritesi gibi özellikleri farklı bir katı destek maddesine sahip bir kolon içerisinde hareket kabiliyetlerine bağlı olarak bir karışımdaki maddeleri birbirinden ayırmak mümkün olabilmektedir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisinde (HPLC) hareketli faz sıvı, sabit faz ise katı veya katı destek maddesi üzerine tutturulmuş sıvı fazdır. Uygun akış hızları elde edebilmek ve iyi bir ayırım sağlayabilmek için hareketli faza uygun bir basınç uygulanır.

Yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi bütün analitik ayırma teknikleri arasında en yaygın kullanılanıdır. Yöntemin bu kadar yaygın olmasının sebepleri, duyarlılığı, doğru kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan

türlerin veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen türlerin ayrılmasına uygun olması ve hepsinden de önemlisi sanayinin, birçok bilim dalının ve halkın birinci derece ilgilendiği maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir. Bu gibi maddelere örnek olarak; amino asitler, proteinler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, ilaçlar, terpenoidler, pestisitler, antibiyotikler, steroidler, metal-organik türler, çeşitli organik bileşikler sayılabilir. Kısacası, uygun dedektör, uygun kolon ve uygun hareketli faz olduğu sürece bütün kimyasal maddelerin ayrılmasında ve analizinde HPLC kullanılabilir.

2.4.3.1 Sıvı Kromatografisinin Dayandığı Temel Parametreler

Sıvı kromatografisinin dayandığı temeller aşağıda anlatılmıştır.

2.4.3.1.1. Dağılma (Partisyon) Katsayısı

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

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

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

$$K = C_s / C_m$$

şekilde gösterilir. Burada C_s , analitin durgun faz içindeki molar derişimi C_m ise analitin hareketli faz içindeki molar derişimidir. İdeal olarak çözünen madde derişimlerinin geniş aralıkta dağılma oranı sabittir, diğer bir deyişle C_s doğrudan C_m ile orantılıdır⁴².

2.4.3.1.2. Alıkonma (Retensiyon) Zamanı:

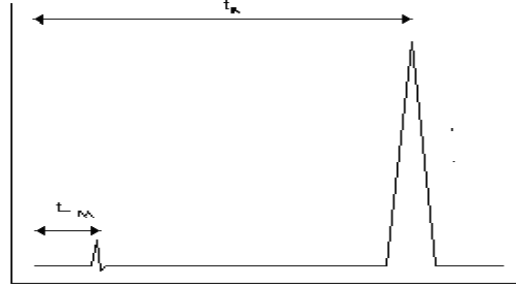
Şekil 2.3.'de tek bir analit içeren numune için tipik bir kromatogram verilmiştir. Numune enjeksiyonundan sonra gelen bu pik için pik süresi bazen ölü zaman olarak adlandırılır ve t_m ile gösterilir. Ölü zaman, hareketli fazın ortalama göç hızını verir ve analit piklerinin tanınmasında önemli rol oynar. Numune içinde veya hareketli fazda çoğu zaman kolonda tutulmayan bir tür olabilir. Yoksa bile diğer piklerin tanınmasına yardımcı olmak için böyle bir tür ortama katılabilir. Şekilde sağ taraftaki pik bir analit türüne aittir. Numunenin enjeksiyonu ile bu pikin dedektöre ulaşması için geçen süreye alıkonma (tutulma) zamanı denir ve t_R simgesiyle gösterilir.

Analitin kolon içerisinde hareketi esnasında ortalama göç hızı V ;

$$V = L / t_R$$

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

$$U = L / t_M$$



Şekil 2.4. HPLC Kromatogramı

Bir çözünen maddenin göç hızı ile dağılma oranı arasındaki ilişkiyi bulmak için, hızı hareketli faz hızının bir oranı şeklinde yazılabilir;

$$V = U \times \text{çözünenin hareketli fazda geçirdiği zaman kesri}$$

Bu kesir, aynı zamanda, her hangi bir anda hareketli fazda bulunan çözünen maddenin ortalama mol sayısının kolondaki toplam çözünen maddenin mol sayısına bölünmesiyle de elde edilebilir;

$$V = U \times \text{hareketli fazda çözünenin mol sayısı} / \text{çözünenin toplam mol sayısı}$$

hareketli fazdaki çözünen toplam mol sayısı, molar derişim C_M ile hacmi V_M 'nin çarpımına eşittir. Benzer şekilde, sabit fazdaki çözünen maddenin mol sayısı da, çözünenin sabit fazdaki derişimi C_S ile hacmi V_S 'nin çarpımıyla elde edilir. Bu değerlerin formülde yerine yazılıp denklemin düzenlenmesi ile aşağıdaki denklem elde edilir⁴³;

$$V = U \times [1 / (1 + K \times V_S / V_M)]$$

V_M : Hareketli fazın hacmi, V_S : Sabit fazın hacmi

2.4.3.1.3. Analitin Göç Hızı, Kapasite Faktörü

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

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

t_R ve t_M değerleri kromatogramlardan kolayca bulunur. Bir çözünen madde için kapasite faktörü birden çok küçük ise, ayrılma hızlı gerçekleşir ve alıkonma zamanının doğru olarak belirlenmesi zor olur. Öte yandan kapasite faktörü 20-30 gibi bir sayıdan daha büyük olursa ayrılma zamanı gereksiz bir şekilde uzun olur. İdeal bir ayırma da kapasite faktörü değerinin 1 ile 5 arasında olması gerekmektedir. Kapasite faktörü hareketli faz ve sabit faz bileşimlerinin değiştirilmesiyle ayarlanabilir. Her maddenin kendine özgü bir kapasite faktör değeri vardır⁴³.

2.4.3.1.4. Seçicilik Faktörü, Farklı Göç Hızları

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

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

$$\alpha = K_B / K_A$$

K_A = Daha az kuvvetle tutunan veya daha hızlı olarak kolondan elue edilen A maddesi için dağılma katsayısı;

K_B = Daha kuvvetli tutunan B maddesi için dağılma katsayısı

Bu eşitlik ile α daima birden büyüktür. Deneysel bir kromatogramdan α 'yı belirlemek için aşağıdaki eşitlik kullanılmaktadır;

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

2.4.3.1.5. Kolon Verimi

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

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

Bu ikisi arasındaki bağıntı aşağıdaki eşitlikle verilir;

$$N = L / H$$

L: Kolon dolgusunun uzunluğu (cm)

Bir kolonda tabaka yüksekliğinin azalması ve teorik tabaka sayısının artmasıyla kolon verimliliği artar. Hareketli ve sabit fazların bileşimi, kolon dolgu maddesinin tanecik büyüklüğü ve kolon çapına bağlı olarak kolonun tipi kolon verimliliğine etki etmektedir. Kolon dolgu maddesinin tanecik çapı küçüldükçe kolon tabaka sayısı artmakta bu da kolon verimliliğini artırmaktadır⁴³.

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

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

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

W: Pik taban genişliği

Teorik tabaka sayısı N ve tabaka yüksekliliği H, literatürlerde ve kromatografik cihaz üreticileri tarafından, kolon performansının bir ölçümü olarak kullanılır⁴⁴.

2.4.3.1.6. Kolon Performansının Optimizasyonu

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

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

2.4.3.1.7. Kolon Ayırma Gücü (Rezolüsyon)

Bir kolonun ayırma gücü (rezolüsyon) R_s değeri, kolonun iki analiti birbirinden ayırabilmesinin kantitatif bir ölçüsüdür. Kolonun ayırma gücü;

$$R_S = \Delta Z / (W_A/2 + W_B/2) = 2\Delta Z / (W_A + W_B) = 2[(t_R)_B - (t_R)_A] / (W_A + W_B)$$

şeklinde verilir. Bu denklem; R_S Ayırma gücünü; k' kapasite faktörünü; α seçicilik faktörünü ve N tabaka sayısı terimleriyle ilişkili olarak aşağıdaki eşitlikle ifade edilir;

$$R_S = 1/4 \times (N)^{1/2} \times [(\alpha-1) / \alpha] \times [k'_B / k'_{(A+1)}]$$

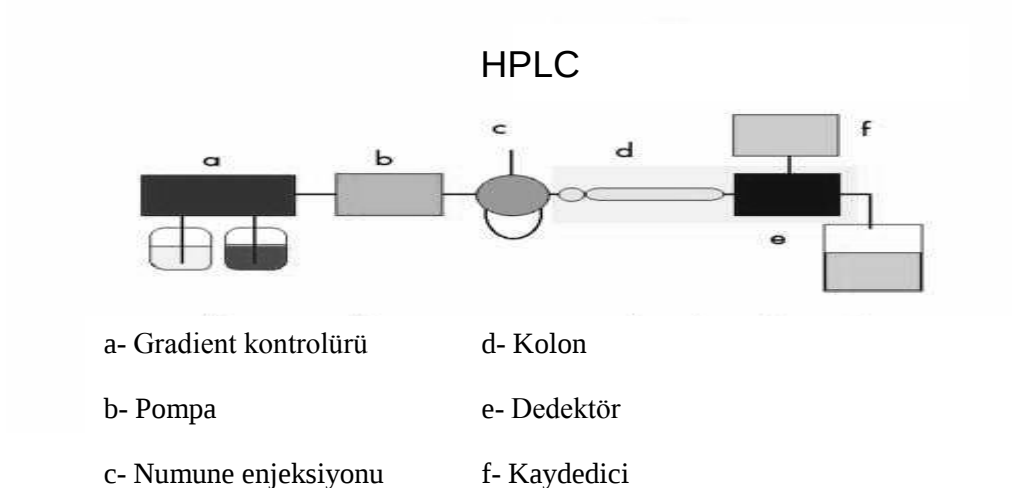
İyi bir ayırım sağlayabilmek için rezölüsyon değerinin 1'den büyük olması gereklidir⁴³.

2.4.3.1.8. Kolon Performansına Etki Eden Değişkenler

İstenilen ayırmayı sağlamak için optimum koşullar araştırılırken α , k' ve N (veya H) gibi temel parametrelerin az ya da çok birbirinden bağımsız olarak ayarlanabileceği unutulmamalıdır. Böylece α ve k' , en kolay sıcaklık ve hareketli fazın bileşimindeki oynamalar ya da değişik bir kolon dolgusu kullanılarak değiştirilebilir. Her hangi bir çalışmada, teorik tabaka sayısı, kolon boyunun değiştirilmesi, tabaka yüksekliği, hareketli fazın akış hızı, dolgu maddesi tane büyüklüğü, hareketli fazın viskozitesi ve sabit fazı oluşturan absorbe edilmiş sıvı filmin kalınlığı gibi parametreler değiştirilerek iyi bir ayırım gerçekleştirilebilir.

2.4.3.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Cihazı

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazı, kendine özgü işlevlere sahip olan pompa, enjektör, kolon, dedektör, ve kaydedici olmak üzere beş ana bölümden oluşan bir sistemdir (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi cihazının şematik görünüşü

2.4.3.2.1.Pompalar

Pompalar, HPLC sisteminde sıkıca doldurulmuş kolon içinden hareketli fazın akışını sağlayan aletlerdir. Her birinin kendine göre üstünlük ve sakıncaları bulunan pistonlu, sürgülü ve pnömatik olmak üzere üç tip pompa vardır. İyi bir ayırım sağlayabilmek için pompalar aşağıda verilen özelliklere sahip olmaları gerekmektedir;

1. 6000 psi'ye kadar basınç üretmek
2. Puls içermeyen basınç çıkışı
3. 0,1-10 ml/dak aralığında akış hızı
4. % 0,5 ve daha iyi akış tekrarlanabilirliği sağlamak
5. Korozyona dayanıklı parçalara sahip olmak

2.4.3.2.2.Enjektörler

İlk ve en basit numune verme sistemi şırınga ile enjeksiyondur. Bu amaçla 100 atm basınca kadar dayanıklı mikro şırıngalar kullanılır. Bu tekniğin avantajı basitliğidir.

Ne yazık ki, şırınga ile enjeksiyonun tekrarlanabilirliği nadiren % 2-3'den daha iyidir. Genellikle tekrarlanabilirlik kötüdür.

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

2.4.3.2.3. Kolonlar

Kolon, sistemin en önemli kısımlarından biri olup normal olarak düzgün iç çaplı paslanmaz çelik borulardan imal edilir. Ancak bazen kalın cidarlı cam borularda kullanılır. Cam kolonların çalışma basınçları 600 psi ile sınırlıdır. Analitik amaçlar için kullanılan kolonlar 5-150 cm uzunluğunda ve iç çapları 4-10 mm arasında değişmektedir. Dolgu maddesinin taneciklerinin çapı ise 5-10 µm ile 35-125 µm arasında değişmektedir ve sistemin performansını büyük ölçüde belirleyen etkindir. Günümüzde, 25 cm uzunluğunda, 4,6 mm iç çapında ve 5 µm tanecik büyüklüğüne sahip dolgu maddesi doldurulmuş kolonlar çok fazla tercih edilmektedirler. Bu tip kolonlar bir metresinde 40000-60000 kadar tabaka bulunur. Son yıllarda çok az miktarda çözücü ile hızlı bir şekilde ayırım yapılabilen mikro kolonlarda geniş bir şekilde kullanılmaktadır. Preparatif çalışmalarda kullanılan kolonların çapları daha geniş olabilmektedir.

Sıvı kromatografisinde kullanılan en yaygın kolon dolgu maddeleri silisyum dioksittir. Mikrondan 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 reçinelerde kolon dolgu maddesi olarak kullanılabilir.

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

Analitik kolonların ömrünü uzatmak için analitik kolondan önce emniyet (klavuz, ön ya da guard) kolon denilen kolonlar kullanılır. Bu kolonların görevi hem hareketli faz hem de numune içerisinde bulunan toz parçacıklarını veya yabancı maddeleri tutarak uzaklaştırmaktır. Ayrıca bu kolonlar hareketli fazı sabit faz ile doyurularak sıvı-sıvı kromatografisinde sabit fazın sürüklenme ile kaybı minimuma indirilir. Emniyet kolonunun dolgusunun bileşimi ile analitik kolonunki benzer olmalıdır. Ancak, basınç düşmelerini azaltmak için, emniyet kolonun dolgu maddesinin parçacık boyutu analitik kolonunkinden genellikle daha büyüktür.

2.4.3.2.4. Dedektörler

Işık enerjisini elektrik enerjisine dönüştüren cihazlara dedektör denir. Kolondan gelen maddenin belirlenmesine kullanılmaktadır. HPLC’de UV-Görünür Bölge Dedektörü, Diyodu Array Dedektör, Floresans Dedektör, Elektrokimyasal Dedektör,

Refraktifindeks (RI) Dedektörü, Amperometrik Dedektör ve Kütle Dedektörü analitin ve çözücü ortamının çeşitli özelliklerine göre cevap veren dedektörler kullanılmaktadır.

2.4.3.2.4.1.UV-Görünür Bölge Dedektörleri

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

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

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

2.4.3.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinin Uygulama Alanları

HPLC, yapıları benzer kimyasal türlerin ayrılması ve saflaştırılması işlemlerinde, kalitatif ve kantitatif analizlerinde oldukça yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir.

2.4.3.3.1. Kimyasal Ayırma

Belirli bir bileşiğin, sabit ve hareketli faz üstünde, ayırt edici bir hareket sabitesinin olduğu göz önünde bulundurularak yapılan ayırmadır. Kiral bazlı ayırımları yapmak da mümkündür.

2.4.3.3.2. Saflaştırma

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

2.4.3.3.3. Kalitatif Analiz

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

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

2.4.3.3.4. Kantitatif Analiz

HPLC'nin yaygın bir şekilde kullanılması kısmen hızına, basitliğine ve ayırmalarda oldukça başarılı oluşuna ayrıca ayrılan türlerin kantitatif olarak belirlenmesine bağlıdır. Kantitatif analiz analit pikinin pik yüksekliği veya pik alanı ölçümleri esas alınarak yapılmaktadır. Pik alanı derişim ile doğrusal olarak değişmektedir. Pik yüksekliğini ölçmek için pikin iki yanındaki zemin çizgisi bir doğru ile birleştirilir ve dorudan pikin yüksekliği düşey olarak belirlenir. HPLC çalışmasında pikin şeklini etkileyecek kolon şartları değişmediği sürece pik yüksekliğinde bir değişme gözlenmez ve tekrarlanabilir sonuçlar alınabilir. Ancak şartlardaki ufak değişiklikler olduğunda pik şeklinde de değişmeler meydana gelir ve pik yüksekliği ölçümlerinde tekrarlanabilir sonuçlar elde edilemez. Dikkat edilmesi gereken parametreler, kolon sıcaklığı, hareketli faz akış hızı ve numune enjeksiyon hızıdır. Bunlara ek olarak kolonun aşırı yüklenilmesinden kaçınılması gerekmektedir. Numune enjeksiyon hızının etkisi, kromatogramda erken gelen pikler için özellikle önemlidir. Şırınga ile yapılan enjeksiyonlarda % 5 ile % 10'a varan bağıl hatalar sıkça görülebilir.

Pik alanı, pik yüksekliğini etkileyen değişkenlerin etkilerinden bağımsızdır. Bu bakımdan analitik parametre olarak alan ölçümü pik yüksekliğinden daha yaygın olarak kullanılır. Öte yandan pik alanının ölçülmesi daha kolay olup özellikle de dar piklerde daha doğru ölçümler yapılabilmektedir. Modern kromatografi cihazlarının çoğunda bağıl pik alanlarının tekrarlanabilir şekilde ölçülmesini sağlayan elektronik integratörler vardır.

Kromatografide kantitatif analizi gerçekleştirebilmek için kalibrasyon eğrisinin türetilmesi gerekmektedir. Kalibrasyon eğrisinin türetilmesinde analizi yapılacak analitin saflık derecesi bilinen standart maddesinden veya kimyasal yapısına benzer bir maddeden, yöntemin doğrusal olduğu aralıkta bir seri standart çözeltiler hazırlanır ve kromatogramları alınır. Pik yüksekliği veya pik alan değerleri derişime karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edilir. Böyle bir grafik, sıfır noktasından geçen bir doğru şeklinde olmalıdır. Kalibrasyon eğrisinden doğrunun denklemi, korelasyon katsayısı ve istatistiksel parametreler belirlenir. Bilinmeyen numunenin analizinden cihazdan elde edilen veriler kalibrasyon eğrisi yardımıyla değerlendirilerek bilinmeyen numune analizi gerçekleştirilir. Kalibrasyon standartlarına dayalı analizlerde en önemli hata kaynağı, genellikle numune hacmindeki belirsizliktir; enjeksiyon hızı da bazen bir etken olabilir.

2.5. Analitik Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)

USP XXIII/NF’de verilen tanıma göre validasyon, bir analiz yönteminin performans özelliklerini istenilen analitik uygulamada, belirlenen gerekli şartlarda sağladığını göstermek için yapılan işlemlerin tümüdür. Analitik yöntemin kabul edilebilirliğini göstermek için kullanılan analitik parametreler;

1. Doğrusallık (Linearity)
2. Doğruluk (Accuracy)
3. Kesinlik (Precision)
4. Tekrarlanabilirlik (Reproducibility)
5. Seçicilik (Selectivity) ve Belirleyicilik (Specificity)
6. Teşhis Limiti (Limit of Dedetection, LOD)

7. Miktar Tayin Limiti (Limit of Quantitation, LOQ)

8. Kararlılık (Stability)

9. Sağlamlık (Robustness)

İn-vivo ortamlardaki miktar tayininde; farmakokinetik parametrelerin doğru kesin bir şekilde hesaplanması, biyoyararlanım ve atılım çalışmalarında ilaç ve metabolitin plazma ve idrar gibi fizyolojik sıvılardaki derişiminin doğru bir şekilde saptanmasına bağlıdır. Güvenilir sonuçların elde edebilmesi, iyi bir şekilde tanımlanmış ve tam olarak valide edilmiş analitik yöntemlerin kullanılmasına bağlıdır.

2.5.1. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi

Analitik bir işlemin doğrusallığı, örnek içindeki analitin derişimiyle doğrudan orantılı test sonuçlarının belli bir aralıkta elde edilebilmesi yeteneğidir. En düşük derişimden en yüksek derişime doğru bir seri standart çözeltiler hazırlanarak yöntemin doğrusal olduğu aralık belirlendikten sonra çözeltilerin derişimine karşı ölçüm yapılan cihazın verdiği cevap grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi türetilir. Ağırlıklı ve ağırlıksız en küçük kareler yöntemi esas alınarak kalibrasyon eğrisinin regrasyon analizi yapılarak standart eğrinin doğru denklemi elde edilir. Kalibrasyon doğrusunun eğimi, doğrusallığın matematiksel bir ölçüsüdür.

2.5.2. Doğruluk

Doğruluk bilinen derişimlere sahip bir seri örneğin analizi ve bulunan değerin gerçek değere olan yakınlığı olarak ifade edilir. Bu da bağıl ve mutlak hata ile verilir.

2.5.3 Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik

Analitik bir işlemin kesinliği önceden belirlenmiş şartlar altında aynı homojen örnekten birçok örnekleme yapılarak elde edilen bir seri ölçüm sonuçlarının arasındaki uygunluğun yaklaşıklığını ifade etmektedir. Kesinlik, homojen ve orjinal örnekler üzerinde belirlenmelidir. Bir analitik işlemin kesinliği genellikle bir seri ölçüm sonucunun varyansı, bağıl standart sapması veya varyasyon katsayısı olarak ifade edilir. Kesinlik 3 basamak olarak düşünülmektedir. Bunlar

- **Tekrarlanabilirlik (Repeatability):** Aynı çalışma şartlarında kısa bir zaman aralığından sonra kesinlik değerinin göstergesidir.
- **Ara Kesinlik (Intermediate Precision):** Laboratuvarlar arasındaki farkları (gün değişikliği, analizci değişikliği, cihaz değişikliği gibi...)
- **Yenilenebilirlik (Reproducibility) :** Laboratuvarlar arasındaki kesinliği ifade eder (laboratuvarlar arasında yapılan işbirlikli çalışmalar, yöntem standardizasyonu gibi...) ayrıca yöntem farklı yerleşimlerde kullanıldığında bu parametreyle verilir.

2.5.4. Teşhis Limiti

Bir analitik işlemin teşhis limiti, bir örnekteki incelenen bileşiğin belirlenebilen en düşük miktarıdır. Ancak burada belirlenen derişim kantitatif tayin için tam olarak

kesinlik ifade eden bir değer değildir. Tipik olarak kromatografik çalışmalarda pik boyunun gürültü boyuna oranının (sinyal/ gürültü) 3 olduğu derişim teşhis limiti olarak belirlenmektedir.

2.5.5. Miktar Tayin Limiti

Belirlenen deney koşulları altında analitik yöntemle uygun doğruluk ve kesinlik ile analiz edilebildiği en düşük derişimdir. Bir sınır değeri olup, bu derişimin altındaki derişimlerde istenilen doğrulukta madde analiz edilemez. Gözlenebilme Sınırı değişik şekillerde belirlenebilmektedir. HPLC çalışmalarında genellikle alınan kromatogramlarda pik boyunun gürültü boyuna oranının (sinyal/gürültü (S/G)) 10 olduğu derişim Miktar Tayin Limiti olarak belirlenmektedir.

2.5.6. Kararlılık

Saklanan örneklerde analiz süresince analitin bozunmadan kararlı kaldığı süredir. Saf analit ve/veya analit çözeltisinin normal laboratuvar şartlarında nem, sıcaklık, ışık, hava ve örneklerin dondurulup eritilmesi gibi etkilere maruz bırakılarak bozunmadan kararlı kaldığı süre tespit edilmeli ve elde edilen bilgiler aynı zamanda literatür bilgisi ile de desteklenmelidir. Çalışma süreleri de bu kararlı kaldığı sürelere göre belirlenmesi gerekmektedir. Kararlılık alışmaları derişimi bilinen çözelti ile yapılmalıdır.

2.5.7. Seçicilik ve Belirleyicilik

Olması beklenen bileşenler varlığında incelenenin tam olarak değerlendirilebilmesi yeteneğidir. Bunlar kirlilikler, parçalanma ürünleri ve diğer interferanslar olabilir. ICH (International Conference on Harmonization)'na göre; belirleyicilik tek bir analit için cevabı sağlayan yöntem için ve seçicilik ise birden fazla analit için cevabı sağlayan yöntem için kullanılır.

2.5.8. Sağlamlık

Bir analitik yöntem için sağlamlık, yöntem parametrelerindeki küçük ancak önemli değişikliklerde etkilenmeden kalma kapasitesinin bir ölçüsüdür ve yöntemin normal kullanımı sırasında güvenilirliğinin bir göstergesidir. USP (United State Pharmacopoeia)'e göre çeşitli koşullar altında elde edilmiş sonuçların, laboratuvar dan laboratuvara ve analizciden analizciye göre yenilenebilirlik derecesi olarak belirtmektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

Çalışmamızda kullanılan standart maddeler; piridoksin (B6 Vitamini) ve tiyamin (B1 vitamini) Sigma'dan (USA) temin edildi. Milli-Q saflıkta su kullanılmış olup kimyasal çözücü olarak kullanılan; analitiksel saflıkta HCl ve HPLC saflıkta metanol Merck'ten (Almanya) temin edildi.

Çalışma sırasında kullanılan otomatik pipetler (10-100 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL ve 1000-5000 µL), kuvartz küvet (USA) ve oto örnekleyici vial kitleri (Agilent, 1,8 mL screw cap), mezür, deney tüpü, balon joje Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Laboratuvar'ından temin edildi.

3.2. Cihazlar

Terazi (Bosch S 2000), karıştırıcı vorteks (IKA), pH metre (Schott), etüv (Memmert), vakum pompası (Phenomenex), ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) Sistemi (Yüksek Performanslı Sıvı Komatografi (Agilent Technologies), UV Dedektör (Agilent Technologies), Degazer (Agilent Technologies), Pompa (Agilent Technologies), Kolon (C₁₈, 5 µm, 250 x 4,6 mm) (USA), Otoörnekleyici (Agilent Technologies) ve Bilgisayar (HP).

3.3. Yöntem

Uygulanan yöntem hakkında gerekli bilgiler verilmektedir.

3.3.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yöntem Şartları

HPLC çalışmasında, piridoksin ve tiyamin için uygulanan kromatografik yöntem şartları Tablo 3.1.'de verildi.

Tablo 3.1. Piridoksin ve tiyamin α -T için HPLC-UV yöntem şartları

Yöntem Şartları	Piridoksin ve Tiyamin
Kolon	C ₁₈ (250x4,6 mm,5 μ m)
Dedektör	UV
Dalga Boyu	274 nm
Hareketli Faz	Metanol:Su (9:91, v/v; pH:3,5)
Kolon Sıcaklığı	Değişken
Kolon Akış Hızı	1mL/dak.
Enjeksiyon Hacmi	10 μ L

3.3.2. Yöntem Geçerlilik Testleri

Analitik alanda farklı amaçlara göre düzenlenen kurallar dünyanın farklı bölgeleri ve farklı amaçlara göre farklılıklar göstermektedir. Bu çalışmada, tiyamin ve piridoksinin analizinde kullanılan HPLC yönteminin geçerlilik testi, ICH (The International Conference on Harmonization) rehberinde kabul edilen analitiksel yöntem geçerlilik testi esas alınarak gerçekleştirildi.

3.3.2.1. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı

Yöntemin doğrusallığı, 1-40 μ g/mL derişim aralığında beş standardın her derişimdeki tekrarlanan analizleri ile belirlendi. Çalışma aralığı ise kabul edilebilir doğruluk, kesinlik ve doğrusallığın elde edildiği derişim aralığı olarak seçildi. Belirtilen derişim aralığında çözeltinin derişimine karşı elde edilen pik alanları grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde

edildi (n=6). Kalibrasyon eğrisinin regresyon analizi yapılarak standart eğrinin doğru denklemi ve korelasyon katsayısı elde edildi.

3.3.2.2.Doğruluk/Kesinlik

Pridoksin ve tiyaminin kalibrasyon eğrileri içinde yer alan üç farklı derişimde (2,5, 10 ve 30 µg/mL) çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin günüçi (aynı yöntem ve aynı labaratuvar şartlarında 1 günde 6 kez) ve günler arası (aynı yöntemle farklı 3 günde 6 kez) analizleri ile doğruluk ve kesinlik değerleri elde edildi. Analiz sonuçlarının ortalaması ve standart sapmaları belirlendi. Doğruluk bağıl hatayla ((bulunan-eklenen)/eklenen x 100) ve kesinlik bağıl standart sapma (% BSS) (SS/ortalama x 100) ile verildi.

Analitik geri kazanım ise, katım tekniği ile analiz sonucunda bulunan değer in gerçek değere oranı olarak ifade edildi.

3.3.2.3. Teşhis Limiti (LOD) ve Miktar Tayin Limiti (LOQ)

Pridoksin ve tiyaminin kromatogramlarında sinyal/gürültü (S/G) oranı 3 olduğu derişim teşhis limiti (LOD) ve 10 olan derişimde miktar tayin limiti (LOQ) değerleri olarak belirlendi. Kalibrasyon eğrisinin en düşük değeri olan 1 µg/mL'den daha küçük derişimlerde bir seri standart çözelti hazırlanarak tespit edildi.

3.4.Tabletlerin Hazırlanması

8 adet pridoksin ve tiamin içeren Benol® tableti alındı ve tartıldı daha sonra bu tabletler toz haline gelinceye kadar öğütüldü ve harmanlandı. Bu karışımdan 1 Tablet

ağırlığı piridoksin ve tiyamin olacak şekilde belirli bir miktarı alınarak 100 mL'lik balon jojeye koyuldu. 0,1 M HCl çözeltisinde çözüldü ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı. Elde edilen süspansiyon süzüldü ve gerekli derişimde çözeltileri hazırlanıp analizleri yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Tiyamin ve pridoksinin stok çözeltileri, her biri 200 µg/mL derişimde olacak şekilde 0,1M HCl çözeltisiyle hazırlandı ve bu çözeltiler Milli-Q saflıkta su ile seyreltilerek 1, 5, 15, 25 ve 40 µg/mL derişimlerinde standart çalışma çözeltileri hazırlandı.

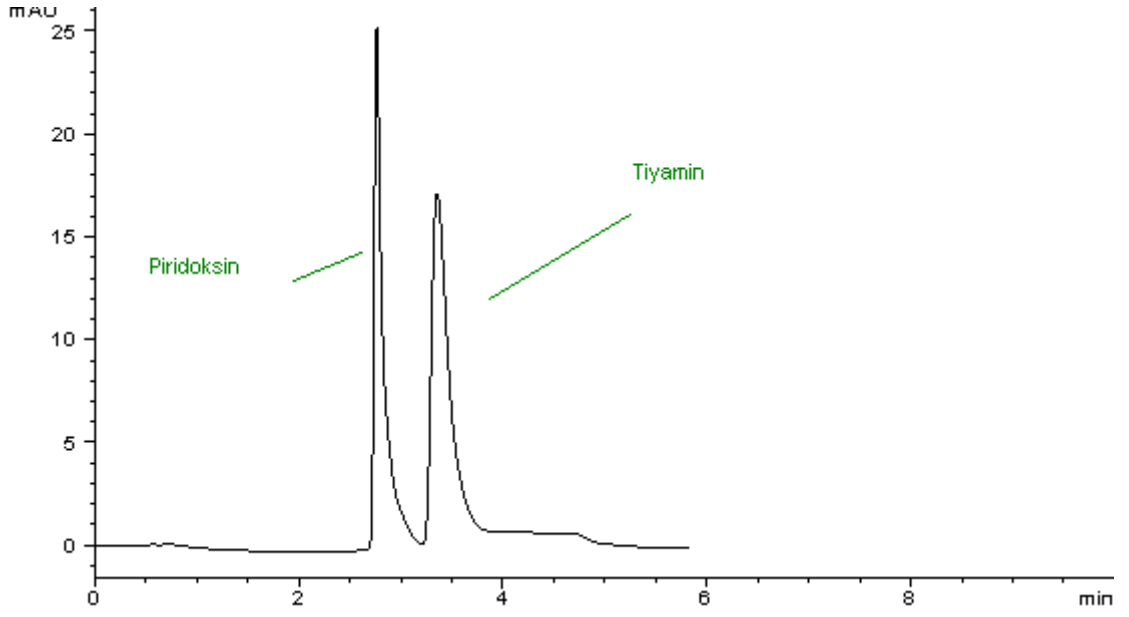
4.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yöntemi Geliştirme

Sıvı kromatografik bir yöntemin geliştirilmesinde üzerinde durulacak en önemli husus, yeterli ayırmaya ulaşıldığının belirlenmesidir. Kromatografik sistemin seçiciliğı, kromatografik sistemde çözünen, mobil faz bileşenleri ve durgun faz arasındaki bütün etkileşimleri yansıtır. Bu etkileşimler, sıcaklık, mobil fazın yapısı gibi deneysel koşulların değıştirilmesiyle yönetilebilir.

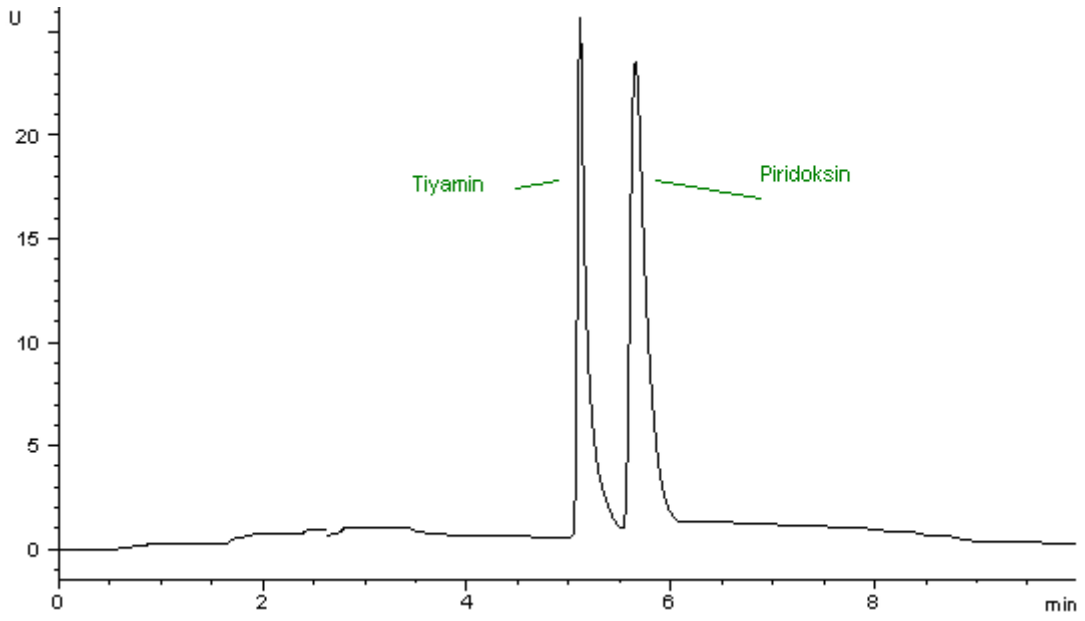
4.2.1. Hareketli Faz Optimizasyonu

Hareketli fazın bileşimi, ters faz sıvı kromatografide bileşiklerin alıkonmalarında önemli rol oynar. Mobil faz olarak kullanılan çözücü karışımlarında polarite, mobil fazın elue etme gücünün bir ölçüsüdür ve ters faz HPLC’de çözünenin alıkonmasını etkileyen temel faktördür. Bu çalışmada hareketli faz olarak metanol-su ve asetonitril-su çözücü karışımları denendi ve metanol-su çözücü karışımı uygun mobil faz olarak seçildi daha sonra uygun kromatografik ayırımı sağlamak için hareketli faz karışımının farklı bileşimleri (su-metanol oranı: 70:30, 80:20 ve 91:9, v/v) test edildi ve elde edilen

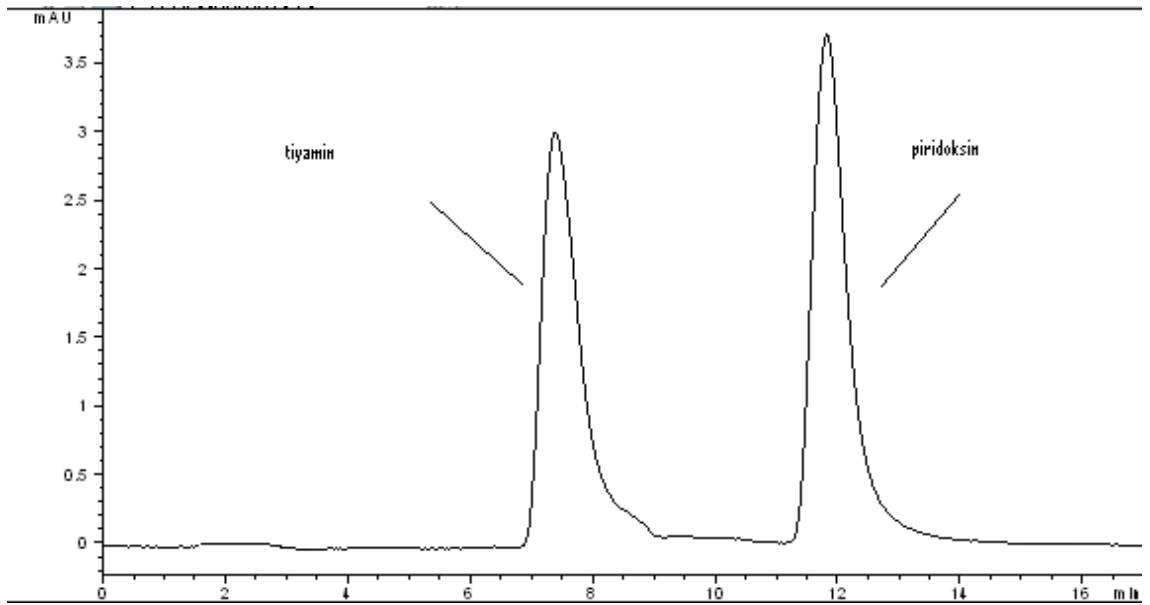
sonuçlara göre su-metanol oranının 70:30 (Şekil 4.1.) ve 80:20 (Şekil 4.2.) olduğu çalışmalarda tiyamin ve piridoksinin yeterli ayrımı sağlanamazken bu oranın 91:9 (Şekil 4.3.) olduğu çalışmada iyi bir ayırım sağlandı.



Şekil 4.1. Hareketli faz bileşiminin 70:30 (su-metanol, v/v) olduğu şartlarda piridoksin ve tiyamin karışımı çözeltisinden elde edilen kromatogram



Şekil 4.2. Hareketli faz bileşiminin 80:20 (su-metanol, v/v) olduğu şartlarda piridoksin ve tiyamin karışımı çözeltisinden elde edilen kromatogram



Şekil 4.3. Hareketli faz bileşiminin 91:9 (su-metanol, v/v) olduğu şartlarda piridoksin ve tiyamin karışımı çözeltisinden elde edilen kromatogram

4.2.2. pH Optimizasyonu

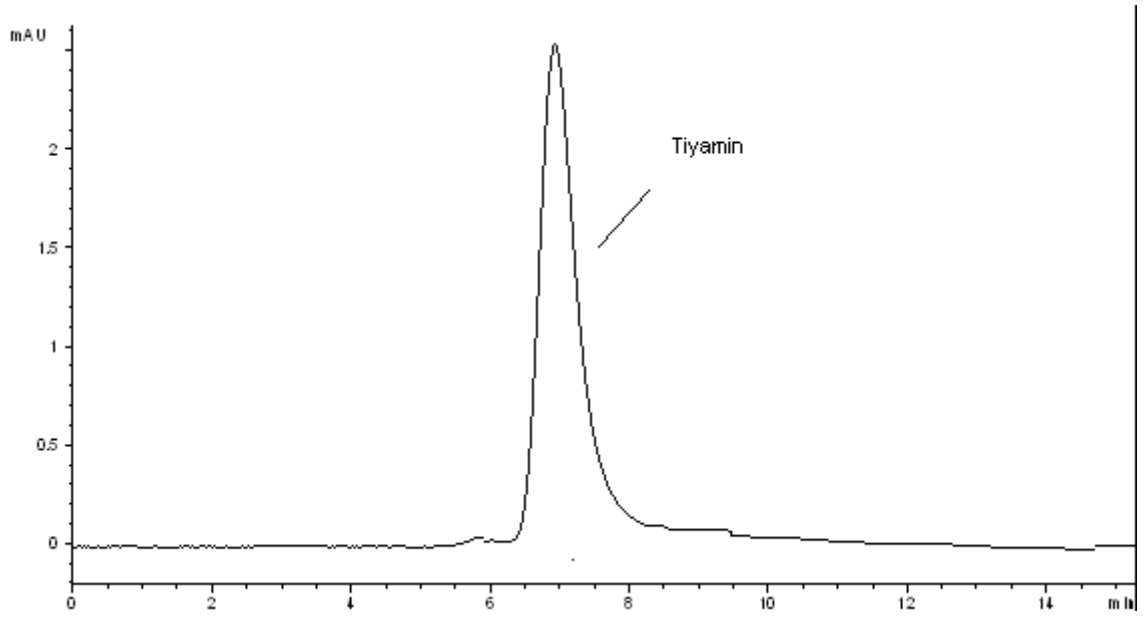
Kromatografik ayırmada mobil faz pH'sı, iyonlaşabilen bileşiklerin ayrılmasında önemli bir faktördür. Elde edilen literatürlerde, piridoksin ve tiyamin karışım çözeltisinin kromatografik ayırımı asidik mobil faz kullanılarak başarılmıştır. Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda hareketli fazda asidik ortamı sağlamak için farklı pH değerleri (pH: 2,5, pH: 3 ve pH:3,5) test edildi. Elde edilen sonuçlara göre, pH: 2,5 ve pH: 3'de pik simetriği sağlanamazken pH: 3,5'da simetrik pikler elde edildi. Ayrıca etkin maddelerin alıkonma zamanları pH: 3,5'da diğer pH değerlerine göre daha kısa olarak tespit edildi.

4.3. HPLC Yönteminin Geçerlilik Testleri

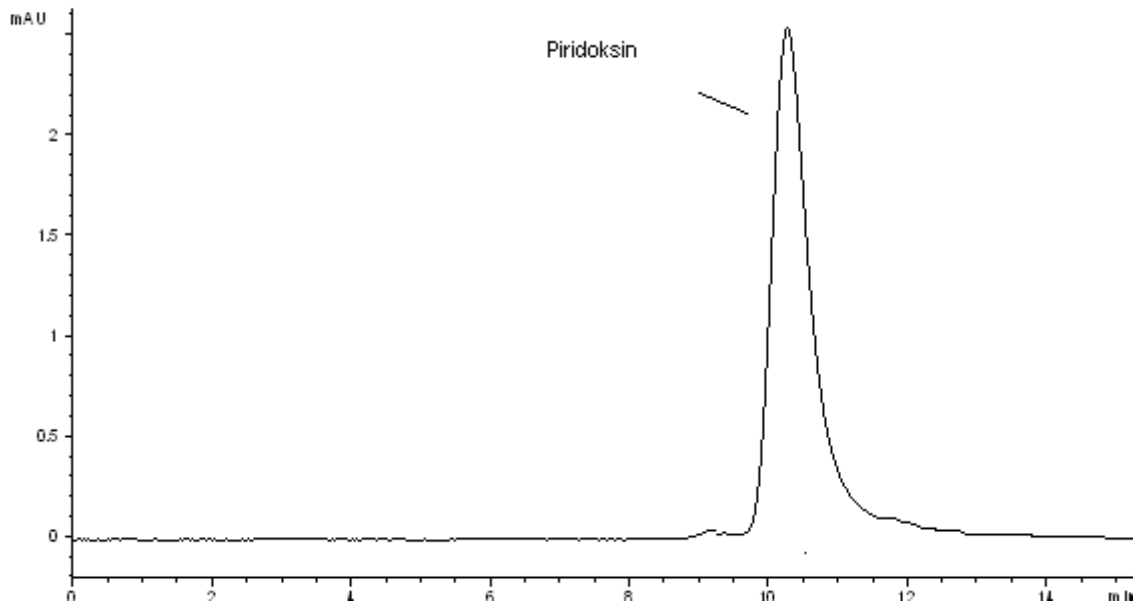
Yöntemin uygulanabilirliğini göstermek amacıyla yöntem geçerlilik testleri yapıldı.

4.3.1.Özgünlük (Belirleyicilik)

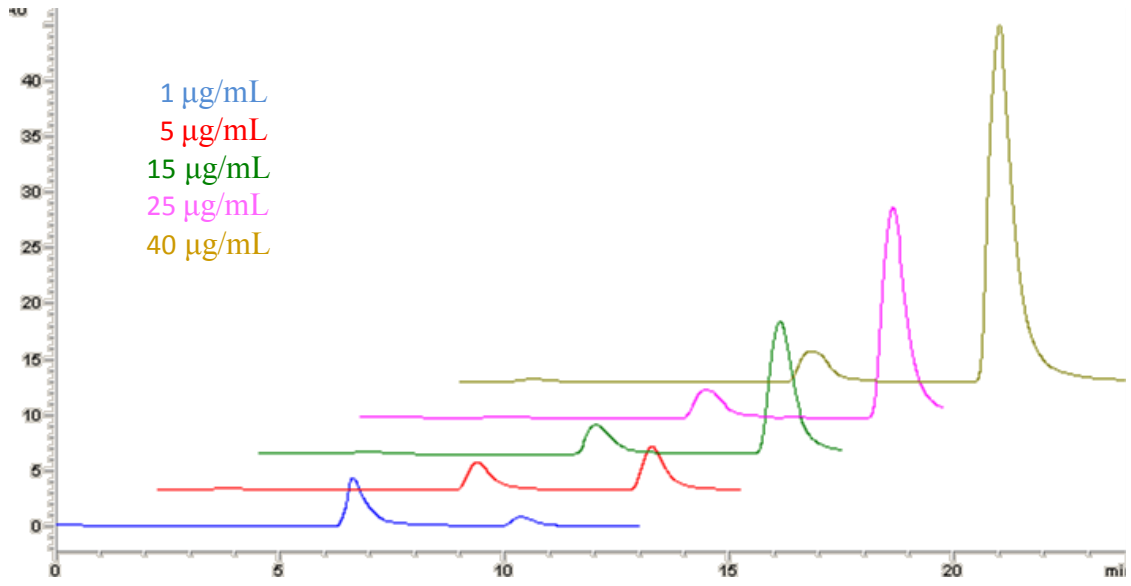
Standart çözeltiler ile edilen kromatogramların incelenmesinde tiyamin ve pridoksinin alıkonma zamanları sırasıyla 7,0 dak. ve 10,5 dak. olarak belirlendi. Tiyamin ve pridoksinin kromatogramları sırasıyla Şekil 4.4. ve Şekil 4.5.'de verildi. Tiyamin ve pridoksin karışımında tiyamin sabit tutularak pridoksinin farklı derişimlerdeki kromatogramı Şekil 4.6.'da ve pridoksin sabit tutularak tiyaminin farklı derişimlerdeki kromatogramı Şekil 4.7.'de verildi.



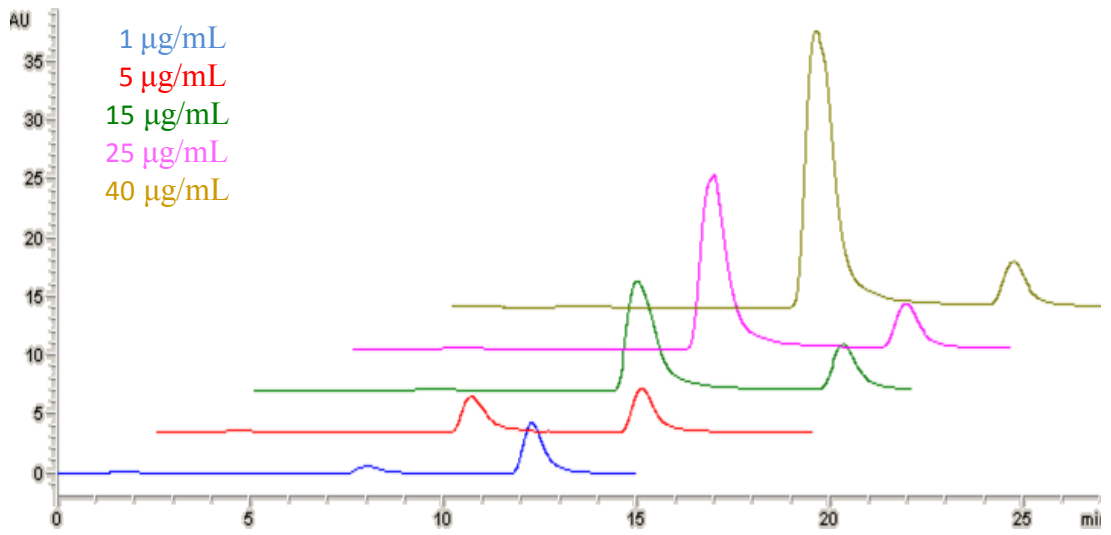
Şekil 4.4. Standart tiyaminin HPLC kromatogramı (5 µg/mL)



Şekil 4.5. Standart pridoksinin HPLC kromatogramı (10 µg/mL)



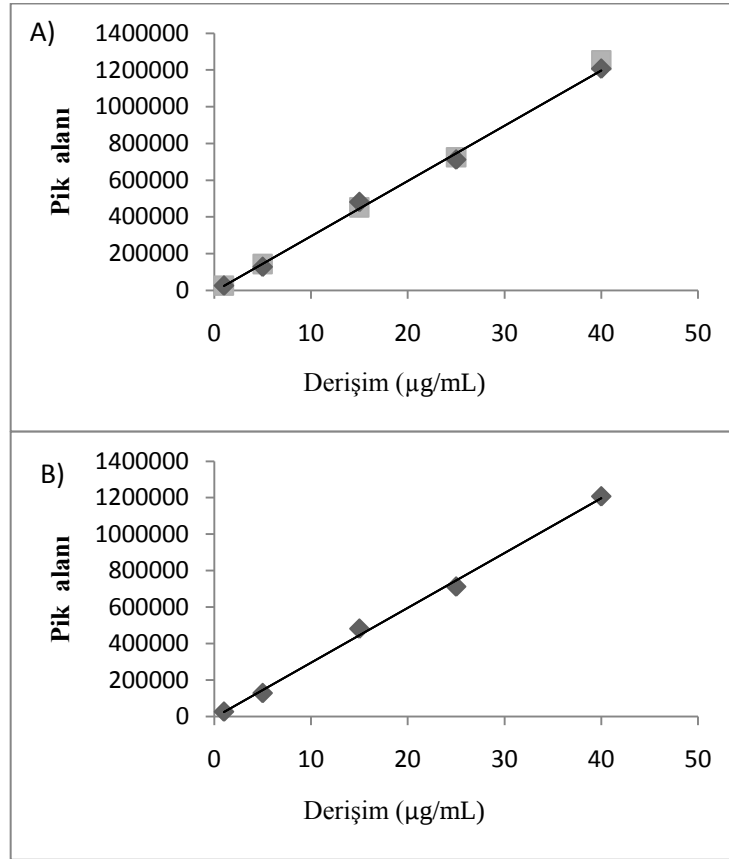
Şekil 4.6. 5 µg/mL tiamin içeren farklı derişimlerinde standart pridoksinin HPLC kromatogramları



Şekil 4.7. 5 µg/mL pridoksin içeren farklı derişimlerinde standart tiaminin HPLC kromatogramları

4.3.2. Doğrusallık/Çalışma Aralığı

1, 5, 15, 25 ve 40 $\mu\text{g/mL}$ derişimlerdeki pridoksin ve tiyaminin çözeltilerinin kromatogramları alınarak pik alanları tespit edildi. Piridoksin ve tiyamin çözeltileri derişimlerine karşı pik alanları grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri türetildi. Kalibrasyon eğrileri sırasıyla Şekil 4.8. A ve B’de verildi. Kalibrasyon eğrilerinin regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları sırasıyla Tablo 4.1.’de verildi.



Şekil 4.8. HPLC yöntemi ile pridoksin ve tiyaminin standart çalışma çözeltilerinin ortalama kalibrasyon eğrileri: A) Tiamin B) Pridoksin

Tablo 4.1. HPLC yöntemi ile pridoksin ve tiyaminin standart çalışma çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri

Etkin Madde	ÇA (µg/mL)	λ(nm)	LR ^a	Sa	Sb	r
Tiyamin	1-40	274	y=31146x-15906	2609,0	245,4	0,9988
Pridoksin	1-40	274	y=30089x-6034,7	2197,9	87,2	0,9984

λ: dalga boyu, ^a: 6 kalibrasyon eğrisi, LR: lineer regresyon, Sa: regresyon eğrisindeki kaymanın standart sapması, Sb: regresyon eğrisindeki eğimin standart sapması, r: korelasyon katsayısı

4.3.3.Doğruluk/Kesinlik

Pridoksin ve tiyaminin kalibrasyon eğrileri içine düşen üç farklı derişimde (2,5, 10 ve 30 µg/mL) kalite kontrol çözeltilerinin günüçi (aynı yöntem ve aynı labaratuvar şartlarında 1 günde 6 kez) ve günler arası (aynı yöntemle farklı 3 günde 6 kez) analizleri ile doğruluk ve kesinlik değerleri elde edildi. Analiz sonuçlarının ortalaması ve standart sapmaları belirlendi. Doğruluk bağıl hatayla ve kesinlik bağıl standart sapma (% BSS) ile verildi (Tablo 4.2.).

Tablo 4.2. HPLC yöntemiyle pridoksin ve tiyaminin standart çözeltilerinin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)

Etkin Madde	λ(nm)	Eklenen (µg/mL)	Günüçi			Günler Arası		
			Ortalama±SS (µg/mL)	Doğruluk	Kesinlik %BSS	Ortalama±SS (µg/mL)	Doğruluk	Kesinlik % BSS
Tiamin	274	2,5	2,33±0,077	-6,77	3,33	2,28±0,11	-8,56	4,82
		10,0	9,70±0,62	-2,96	0,30	9,60±0,72	-3,93	7,51
		30,0	27,74±0,31	-7,53	1,01	28,00±0,32	-6,66	1,17
Pridoksin	274	2,5	2,28±0,09	-8,50	4,29	2,31±0,13	-7,52	5,52
		10,0	10,29±0,34	2,96	3,38	10,44±0,38	4,46	3,69
		30,0	30,37±0,26	1,23	0,85	30,35±0,24	1,19	0,82

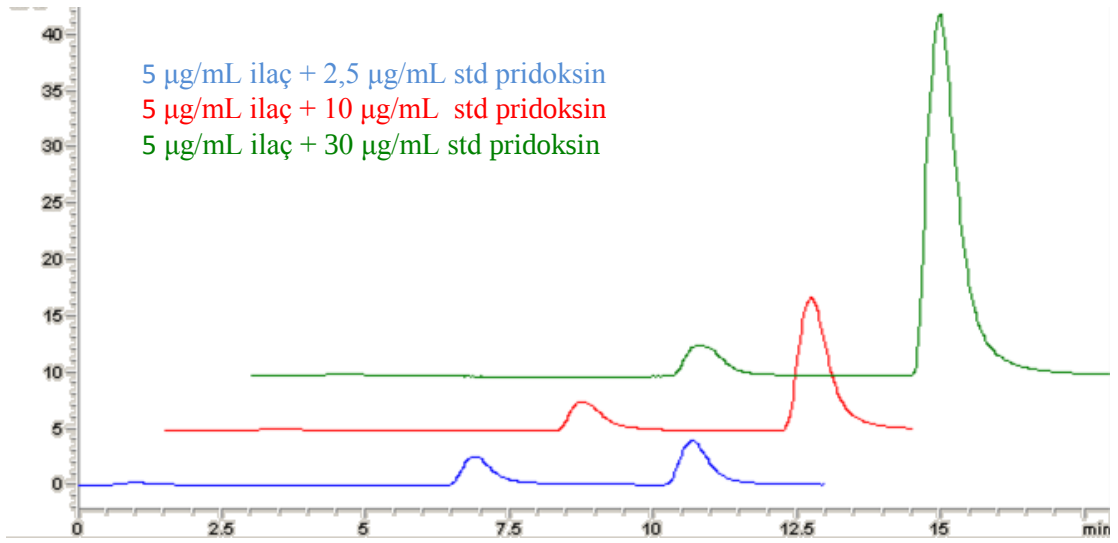
λ: dalga boyu, SS: standart sapma (n=6), Doğruluk: (bulunan-eklenen)/eklenenx100, % BSS: bağıl standart sapma (SS/ortalamax100)

4.3.4. Teşhis Limiti (LOD) ve Miktar Tayin Limiti (LOQ)

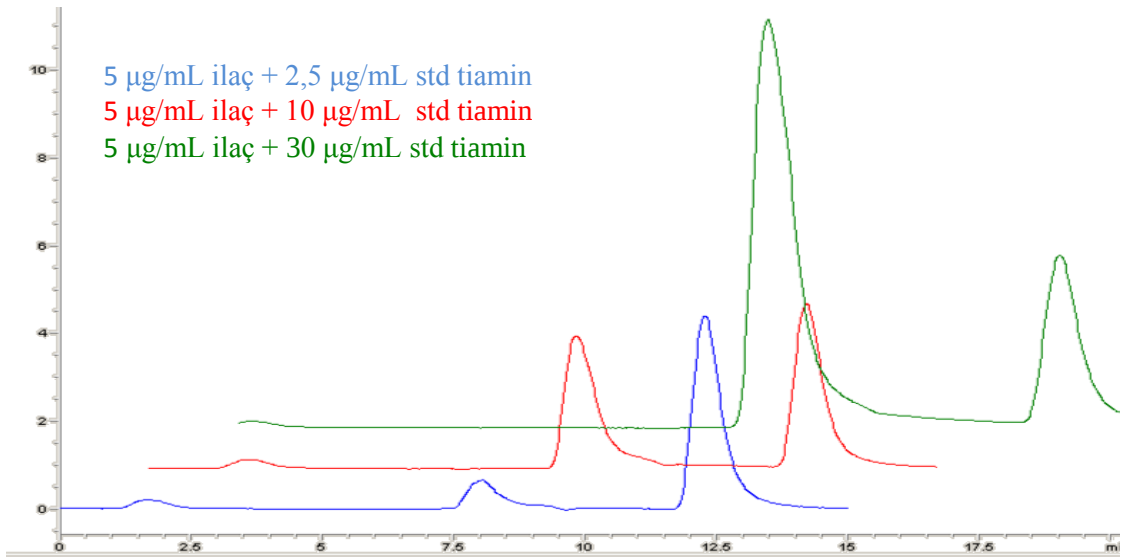
Kalibrasyon eğrisinin en düşük değeri olan 1 µg/mL'den daha küçük derişimlerde standart çözeltiler hazırlandı. Bu çözeltilerin kromatogramları alındı ve bu kromatogramlardan sinyal/gürültü (S/G) oranı 3 olduğu derişim teşhis limiti (LOD) ve 10 olduğu derişim ise miktar tayin limiti (LOQ) olarak belirlendi. Pridoksin ve tiyaminin her ikisi için LOD değeri için 0,5 µg/mL ve LOQ değeri ise 1 µg/mL olarak tespit edildi.

4.3.5. Geri Kazanım

Farmasötik preparattan geri kazanım çalışmaları standart ekleme yöntemi ile yapıldı. Bunun için 250 mg Pridoksin + 250 mg Tiyamin içeren Benol tabletten sekiz tablet iyi bir şekilde öğütüldü ve homojen bir şekilde karıştırıldı. Örnekleme yöntemine göre bir tablet ağırlığında bir numune tartımı alındı ve 0,1 M HCl çözeltisi içerisinde çözüldü. Daha sonra Milli-Q saflıkta su ile seyreltilerek tablet çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden 5 µg/mL derişimde ilaç çözeltileri hazırlanarak kromatogramları alındı ve pik alanları belirlendi (Şekil 4.9. ve Şekil 4.10.). Sonra bu çözeltiler üzerine 2,5, 10 ve 30 µg/mL derişimlerde üç farklı derişimde tiamin ve pridoksin standart çalışma çözeltileri ayrı ayrı eklendi ve tekrar pik alanları okundu. Okunan toplam pik alanı değerlerinden 5 µg/mL derişimin pik alanı çıkarılarak elde edilen değerler 2,5, 10 ve 30 µg/mL derişimlerin standart çözeltilerinin pik alanlarına oranlanarak analitik geri kazanım değerleri tespit edildi (Tablo 4.3.).



Şekil 4.9. 5 µg/mL derişimde ilaç çözeltilisine eklenen 3 farklı derişimdeki pridoksinin standart çalışma çözeltilerinin kromatogramı



Şekil 4.10. 5 µg/mL derişimde ilaç çözeltilisine eklenen 3 farklı derişimdeki tiamin standart çalışma çözeltilerinin kromatogramı

Tablo 4.3. Farmasötik preparatlarda piridoksin ve tiyamin analitik kazanım değerleri (n=3)

Ticari Preparat	λ (nm)	Eklenen ($\mu\text{g/mL}$)	Ortalama $\pm$ SS ($\mu\text{g/mL}$)	Geri kazanım	% BSS
Benol® 5 $\mu\text{g/mL}$	274	2,5 ^a	2,13 $\pm$ 0,10	85,33	4,70
		10,0 ^a	11,82 $\pm$ 0,45	118,24	3,88
		30,0 ^a	30,70 $\pm$ 1,01	102,34	3,27
		2,5 ^b	2,32 $\pm$ 0,14	93,08	6,39
		10,0 ^b	9,01 $\pm$ 0,61	90,10	6,78
		30,0 ^b	28,17 $\pm$ 1,54	93,91	5,48

λ : dalga boyu, ^a: tiyamin standart çözeltisi, ^b: pridoksin standart çözeltisi, SS: standart sapma, % BSS: bağlı standart sapma (SS/ortalama $\times$ 100)

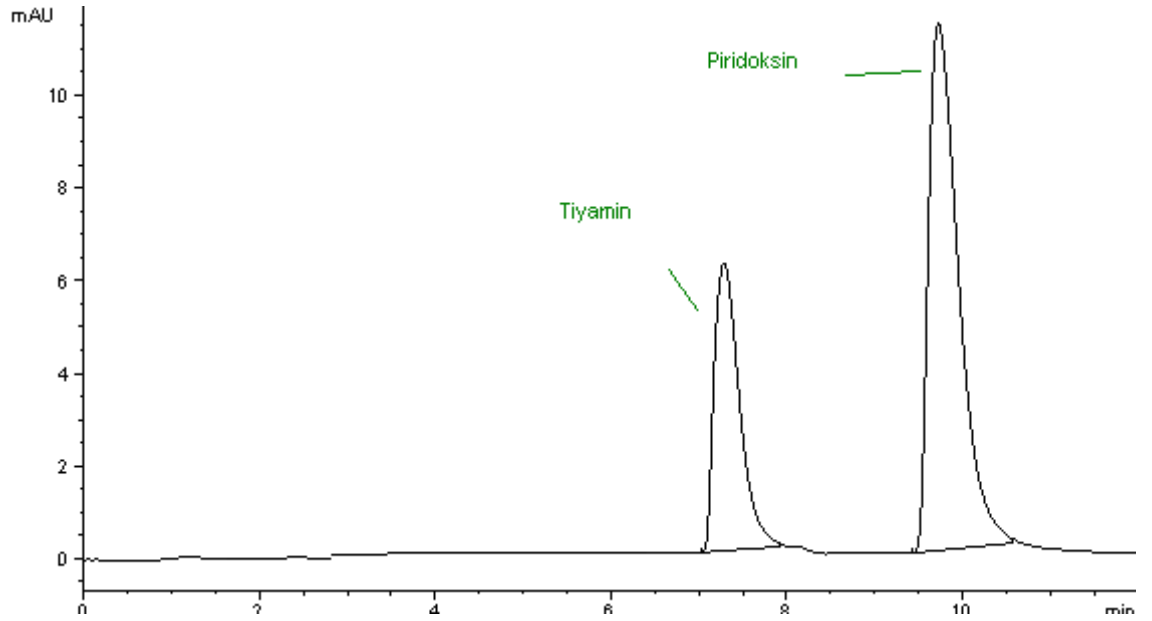
4.4 Gerçek Numunelere Uygulama

4.4.1. Geliştirilen Yöntemlerin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Geliştirilen ve geçerlilik testleri yapılan yöntemlerin uygulanabilir olduğunu görmek amacıyla tiyamin ve pridoksin içeren farmasötik preparatlarda etkin madde miktar analizleri yapıldı.

4.4.1.1. Benol® Tablet (250 mg Pridoksin + 250 mg Tiyamin/Tablet)

250 mg Pridoksin + 250 mg Tiyamin içeren Benol® tablet içeriği 0,1 M HCl çözeltisinde çözüldü. Hazırlanan çözelti Milli-Q saflıkta su ile seyreltilerek 5 $\mu\text{g/mL}$ derişimlerde çözeltileri hazırlandı ve 10 μL enjekte edilerek kromatogramları alındı (Şekil 4.10.) ve pik alanları kalibrasyon eğrisine konularak miktar tayini gerçekleştirildi (Tablo 4.4.).



Şekil 4.11. Benol[®] ilaç çözeltisinin HPLC kromatogramı

Tablo 4.4. HPLC yöntemiyle 250 mg Pridoksin + 250 mg Tiyamin içeren Benol[®] tabletin miktar tayini

Ticari Preparat	n	λ(nm)	Etkin Madde	Ortalama±SS (mg)	%Geri kazanım	% BSS	Güven Aralığı
Benol [®] tablet	5	274 nm	Pridoksin	251,6±11,11	100,64	4,42	93,92-105,3
			Tiyamin	250,68±4,74	100,27	1,89	98,09-102,0

λ: dalga boyu, SS: standart sapma, % BSS: bağıl standart sapma (SS/ortalama×100)

5.TARTIŞMA

Bir madde veya madde grubu analizinde çalışılmaya başlamadan önce laboratuvar olanakları ve bu olanaklara bağlı olarak nasıl bir enstrümental analiz yöntemiyle miktar tayinin yapılacağı, çalışılacak madde ve çalışılacak ortama uygunluğu hakkında iyi bir bilgiye sahip olunması gerekmektedir. Bunu başarabilmek için konuya hakim olmak ve çok iyi bir literatür taraması yapmak en önemli olgulardandır. Çoğunlukla; birden fazla enstrümental yöntem bir maddenin çalışılabilmesi için uygunluk arz etmektedir. Burada analizciye düşen görev kendi şartlarına en uygun olan yöntemi belirlemek ve bu yöntem üzerinde ilerleyerek sonuca ulaşmaktır. Asıl önemli olan husus geliştirilen yönteme bilimsel bir hüviyet kazandırmaktır. Böylece uygulanan yöntemin geçerliliği kanıtlanmış olur. Bunu yaparken de tüm dünyada geçerli olan validasyon parametrelerine başvurulur.

İlaç analizlerinde, birinci temel kural analizi gerçekleştirilecek analit hakkında çok iyi bir literatür taraması yapılması ve daha sonra elde edilen literatür bilgileri ışığında çalışılacak laboratuvar olanakları da göz önüne alınarak analitik yöntem seçiminin yapılması gerekmektedir. Analitik yöntem seçimi yapıldıktan sonra yöntem geliştirme işlemleriyle yöntem çalışma parametreleri belirlendikten sonra geliştirilen yöntemin uygulanabilirliğini göstermek amacıyla yöntem geçerlilik parametreleri (validasyon) çalışılmalıdır. Yöntem geçerlilik parametreleri; doğruluk, kesinlik, tekrarlanabilirlik, seçicilik, miktar tayin limiti (LOQ), Teşhis limiti (LOD), spesifiklik, hassaslık ve geri kazanımdır. Çalışmalarda bir diğer önemli hususta analiz süresinin kısa olmasıdır. Yöntem geliştirme ve geçerlilik testleri bileşimi güvenilir bir şekilde bilinen bir veya daha fazla standart numunenin analizi ile yapılır. Bu yöntemin bir değer

ifade edebilmesi için, standart numunelerin hem bileşim bakımından hem de analit derişimi bakımından analizi yapılacak numune ile benzer olması gerekir.

Kromatografi, karmaşık karışımlardaki kimyasal bileşimlerin ayrılması, tanınması ve tayininde çok yaygın olarak kullanılan bir yöntemler topluluğudur. Bu yöntemler topluluğundan Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) doğruluk, kesinlik, tekrarlanabilirlik, seçicilik, duyarlılık ve sonuçların hızlı elde edilebilmesi gibi diğer yöntemlere göre birçok üstün yanlara sahiptir. Birçok yöntemle göre sahip olduğu üstünlüklerden dolayı ilaç endüstrisinde hem farmasötik preparatlarda hem de biyolojik sıvılarda ilaç etkin maddelerinin analizlerinde HPLC oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

HPLC çalışmalarında genel olarak, sabit fazın özellikleri ve hareketli fazın bileşimi, buna mukabil sistemde yer alan diğer maddelerin gösterdiği abundanslar ayrılan maddenin kromatografik davranışına etki etmektedir. Bundan dolayı ayırımın iyileştirilmesi ve kabul edilebilir sonuçların alınabilmesi için kromatografik koşulların optimizasyonuna gerek duyulmaktadır. Çalışmada, ters faz C₁₈ kolonu (5 µm, 250 x 4.6 mm), hareketli faz olarak su - metanol (91:9), kolon sıcaklığı değişken, hareketli faz akış hızı 1 mL/dak, dalga boyu 274 nm ve enjeksiyon hacmi 10 µL olarak çalışma parametreleri olarak belirlendi. Bu parametreler belirlenirken öncelikle literatürdeki veriler incelendi ve bu verilere göre bazı testler yapılarak en uygun aralıklar tayin edildi. 4. bölümde anlatmış olduğumuz optimizasyon kısmında ayrıntılı olarak yer verdiğimiz üzere mobil faz, pH gibi değerler değiştirilerek rezolüsyonu en yüksek, alı konma zamanları en uygun pikler elde edilmeye çalışıldı. Ayrıca literatürdeki var olan yöntemlere de alternatif olabilecek yeni bir yöntemin ortaya konması amaçlandı.

Çalışmamızda diğer yöntemlerde kullanılan trimetilamin gibi maddelere veya herhangi bir türevlendirme girişimine ihtiyaç duyulmadan doğrusallığı oldukça iyi bir kalibrasyon eğrisi elde edildi ve geri kazanım değerleri de baz alındığında tatmin edici bir çalışma olduğu gözlemlendi.

Standart çözeltilerin 1-40 µg/mL derişim aralığında yöntemin doğrusal olduğu belirlendi. Stok çözeltiden 1, 5, 15, 25 ve 40 µg/mL derişimlerinde bir seri tiyamin ve piridoksin standart çözeltileri hazırlanarak HPLC’de kromatogramları alındı. Her bir çözeltinin derişimine karşı pik alanı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edildi. Kalibrasyon eğrisinin regresyon analizinden, regresyon doğrusunun denklemi $y = 31146x - 15906$ (tiyamin) ve $y = 30089x - 6034,7$ (y: pik alanı, x: derişim); her iki etkin madde için korelasyon katsayısı (r) 0.998 olarak belirlendi. Tiyamin ve piridoksinin saptanabildiği en düşük derişim olarak teşhis limiti (LOD), sinyal/gürültü (S / G) oranı 3 olan değer alınarak 0,5 µg/mL olarak belirlendi. Tiyamin ve piridoksinin tayin edilebildiği en düşük derişim miktar tayin limiti (LOQ) sinyal/gürültü (S / G) oranı 10 olan değer alınarak 1 µg/mL olarak belirlendi. Yöntemin kesinliği günüçi ve günler arası yapılan çalışmalardan elde edilen verilerin bağıl standart sapması (BSS) ile verildi. Günüçi ve günler arası verilerin % BSS’sı % 8’den küçük olduğu; doğruluk ise bağıl hatayla verildi ve % 8’den küçük olarak belirlendi. Geliştirilip geçerlilik testleri yapılan yöntemin uygulaması olarak tiyamin ve piridoksin etkin maddelerini içeren Benol tablette tiyamin ve piridoksin analizi gerçekleştirildi. Tabletten analitik geri kazanım değerleri % 85 - % 120 aralığında ve geri kazanım değerlerinin bağıl standart sapması ise % 7’den düşük olarak belirlendi. Mobil faz seçiminde birkaç mobil faz bileşimi denendi. Bu denemelerden elde edilen kromatogramların rezölüsyon (Rs) değerleri su-metanol (70:30) için 4,57, su-metanol (80:20) için 4,74 ve su-metanol (91:9) için 7,80

belirlendi ve en iyi ayırım su-met (91:9) bileşiminde sağlandı. Plaka yüksekliği (H) değeri 0,032 cm ve Ortalama plaka sayısı (Nort) değeri de 7808 olarak tespit edildi.

Yöntemimizi literatürdeki diğer yöntemlerle karşılaştırdığımızda; Dinç E ve ark.³⁵ HPLC çalışmasında 0,1 M (NH₄)₂CO₃:su: metanol (15:5:80) mobil fazını, Monferrer-Pons L ve ark.⁴⁵ 0,1 M SDS- % 4 (v/v) pentanol/fosfat tamponu(0,1 M; pH:3) mobil fazını, Kall MA⁴⁰ % 93 HPLC tamponu-% 7 asetonitril mobil fazı kullanmışlardır. Bu çalışmada ise su:metanol (95:5) mobil fazı kullanıldı. Her üç çalışmada tampon kullanılırken bu çalışmada sadece su ve metanol kullanılmaktadır. Oldukça kolay ve daha ucuzdur. Dinç ve ark.³⁵ nın çalışma aralığı 8-72 µg/mL, bu çalışmanın çalışma aralığı 1-40 µg/mL olarak belirlenmiştir. Monferrer-Pons L ve ark.⁴⁵ 45 °C’de kolon fırını kullanmışlardır ve tiyaminin alıkonma zamanı 18,7 dak ve pridoksin 4,8 dak olup toplam analiz süresi 20 dakikadır. Çalışmada ise pridoksin 10,5 dak ve tiyamin 7 dak olup toplam analiz süresi 11 dakikadır. Bu çalışmaya göre daha kısa sürede işlem tamamlanmaktadır. Markopoulou ve ark.³⁷ yapmış oldukları çalışmada iki ayrı dalga boyunu aynı enjeksiyonda kullanmışlardır. Bu çalışmada her iki etkin maddenin analizi tek dalga boyu ile yapılmıştır. Bu da tek dalga boylu dedektörler için daha uygun olacağı düşünülmektedir.

Sonuç olarak; tiyamin ve piridoksinin standart çözeltilerde ve farmasötik preparatlarda miktar analizi için literatürdeki yöntemlere alternatif olacak yeni bir HPLC yöntemi geliştirilip geçerlilik testleri yapıldı. Bu yöntem her iki molekül için de hassas, duyarlı, seçici, doğru, kesin ve tekrarlanabilir olduğu geçerlilik testleri ile gösterildiğinden dolayı bu yöntemin farmasötik preparatlarda tiyamin ve piridoksin miktar analizi için uygulanabilir olduğu sonucuna varılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen verilerin ileriki çalışmalara da yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Nishimura S, Nagano S , Crai CA. Comparson of a cation exchange HPLC method with the open column chromatographic method and the L-tyrosine apodecarboxylase assay. *Am J Clin Nutr* 1985; 41: 1236-1243.
2. Anderson B B, G. Perry M, Modell CB, Child JA, Mollin L. Abnormal Red-Cell Metabolism of Pyridoxine Associated with β -Thalassaemia. *Brit J Hematol* 2008; 41: 497-507.
3. Anderson BB, Giuberti M, Perry GM, Salsini G, Casadio I and Vullo C. Low red blood cell glutathione reductase and pyridoxine phosphate oxidase activities not related to dietary riboflavin: selection by malaria. *Am J Clin Nutr* 1993; 57: 666-672.
4. Kall MA. Determination of total vitamin B6 in foods by isocratic HPLC: a comparison with microbiological analysis. *Food Chemistry* 2003; 82: 315-327.
5. Moreno P and Salvado V. Determination of eight water- and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2000; 870: 207-215.
6. Hartvig P, Lindner KJ , Bjurling P, Långström B, Tedroff J. Pyridoxine effect on synthesis rate of serotonin in the monkey brain measured with positron emission tomography. *Journal of Neural Transmission* 1995; 102: 91-97.
7. Cox TC, Bottomley SS, Wiley JS, Bawden MJ, Matthews CS, May BK. X-linked pyridoxine-responsive sideroblastic anemia due to a Thr-to-Ser substitution in erythroid 5-aminolevulinate synthase. *New Engl J Med* 1994; 330: 675-679.
8. Tant D. Megaloblastic anaemia due to pyridoxine deficiency associated with prolonged ingestion of an oestrogen-containing oral contraceptive. *Br Med J* 1976; 6042: 979-980.

9. Hines JD and Harris JW. Description of Three Patients with Megaloblastic Erythropoiesis. *Am J Clin Nutr* 1964; 14: 137-146.
10. Balestra DJ. Adult chronic lead intoxication clinical review. *Arch Intern Med* A 1991; 151: 1718-1720.
11. Bottomley JSS. Sideroblastic anemia. *Clin Hemeatol* 1982; 11: 389-409.
12. Seto S, Furusho K, Aoki YA. Study of A Female With Congenital Sideroblastic Anemia. *Am J Hematol* 1982; 12: 63-67.
13. Broker S, Meunier B, Rich P, Gattermann N, Hofhaus G. Mtdna Mutations Associated with Sideroblastic Anemia Cause a Defect of Mitochondrial Cytochrome C Oxidase. *Eur J Biochem* 1998; 258: 132-138.
14. Boore JL. Animal Mitochondrial Genomes. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: 767-780.
15. Gaag MS, Ubbink JB, Sillanaukee P, Nikkari S, Hendriks HF. Effect of consumption of red wine, spirits, and beer on serum homocysteine. *Lancet* 2000; 356: 512.
16. Krishna AP, Ramakrishna T. Effect of pyridoxine deficiency on the structural and functional development of hippocampus. *Indian J Physiol Pharmacol* 2004; 48: 304-310.
17. Freye E, Agoutin H. The action of vitamin B1 (thiamine) on the cardiovascular system of the cat. *Biomedicine* 1978; 28: 315-319.
18. Roman CG. An Epidemic of Neurologic Disease in Cuba. *Ann Intern Med* 1995; 122: 530-533.
19. Bettendorff L, Wirtzfeld B, Makarchikov AF, Mazzucchelli G, Frédérich M, Gigliobianco T, Gangolf M. Discovery of a natural thiamine adenine nucleotide. *Nature Chem Biol* 2007; 3: 211–212.

20. Bruno EJ Jr, Ziegenfuss TN. Water-soluble vitamins: research update. *Curr Sports Med Rep* 2005; 4: 207-213.
21. Eijkman, C. Eine Beriberiähnliche Krankheit der Hühner *Virchows Arch. Pathol Anat* 1897; 148: 523.
22. Grijns, G. Over polyneuritis gallinarum. *Ned Ind* 1901; 43: 3-110.
23. Jansen, BCP, Donath WF. On the isolation of antiberiberi vitamin. *Proc Kon Ned Akad Wet* 1926; 29: 1390-1400.
24. Williams, RR, Cline, JK. Synthesis of vitamin B₁. *J Am Chem Soc* 1936; 58: 1504-1505.
25. Carpenter KJ. Beriberi, white rice, and vitamin B: a disease, a cause, and a cure. Berkeley CA: University of California Press; 2000: 127-129.
26. Peters RA. The biochemical lesion in vitamin B₁ deficiency. Application of modern biochemical analysis in its diagnosis. *Lancet* 1936; 1: 1161-1164.
27. Lohmann K, Schuster P. Untersuchungen über die Cocarboxylase. *Biochem Z* 1937; 188-214.
28. Breslow R. On the mechanism of thiamine action. Evidence from studies on model systems. *J Am Chem Soc* 1958; 80: 3719–3726.
29. Kandutsch AA, Bauman CA. Factors affecting the stability of Thiamine in a typical laboratory diet. *Journal of Nutrition* 1952; 24: 209-219.
30. Katz J, Abraham S, Baker N. Some factors Efecting the stability of Thiamine. *ASLO* 1968; 13 : 186-190.
31. Syunyakova ZM, Karpova IN. *Vop Pitan. Chem Abstr* 1966; 65: 1297.
32. Webb ME, Marquet A, Mendel RR, Rebeille F, Smith AG. Elucidating biosynthetic pathways for vitamins and cofactors. *Nat Prod Rep* 2007; 24: 988-1008.

33. Begley TP, Chatterjee A, Hanes JW, Hazra A, Ealick SE. Cofactor biosynthesis—still yielding fascinating new biological chemistry. *Curr Opin Chem Biol* 2008; 12: 118-125.
34. Bocobza S, Aharoni A. Switching the light on plant riboswitches. *Trends Plant Sci* 2008; 13: 526-533.
35. Dinç E, Baleanu D. Multidetermination of Thiamine HCl and Pyridoxine HCl in their mixture using continuous wavelets and biorthogonal wavelet analysis. *Talanta* 2003; 59: 707-717.
36. Ndaw S, Bergaentzle M, Aoude-Werner D, Hasselmann C. Extraction procedures for the liquid chromatographic determination of thiamin, riboflavin and vitamin B₆ in foodstuffs. *Food Chemistry* 2000; 71: 129-138.
37. Markopoulou CK, Kagkadis KA, Koundourellis J. An optimized method for the simultaneous determination of vitamins B₁, B₆, B₁₂ in multivitamin tablets by high performance liquid chromatography. *J Pharmaceut Biomed* 2002; 30: 1403-1410.
38. Höller U. Automated determination of selected water-soluble vitamins in tablets using a bench-top robotic system coupled to reversed (RP-18) HPLC with UV detection. *J Pharmaceut Biomed* 2003 ; 31: 151-158.
39. Marszał ML, Lebieżńska A, Czarnowski W, Szefer P. High performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of thiamine hydrochloride, pyridoxine hydrochloride and cyanocobalamin in pharmaceutical formulations using coulometric electrochemical and ultraviolet detection. *J Chromatogr A* 2005; 1094 : 91-98.
40. Kall MA. Determination of total vitamin B₆ in foods by isocratic HPLC: a comparison with microbiological analysis. *Food Chemistry* 2003; 82: 315-327.

41. Batifoulie F., Verny MA., Chanliaud E., R  m  sy C., Demign  , C. Variability of B vitamin concentrations in wheat grain, milling fractions and bread products. European Journal of Agronomy 2004; 816:67-72.
42. G  nd  z T. Instrumental Analiz. Ankara, Gazi Kitabevi 2002: 1116-1125.
43. Erdi  E. Organik Kimyada Spektroskopik Y  ntemler. Ankara, Gazi Kitabevi 1998: 1-81.
44. Skoog DA, Leary JJ. Principles of Instrumental Analysis. New York, Harcourt Brace College Publishers 1992 : 629.