CLOPİDOGREL'İN
BİYOANALİTİK YÖNTEM VALİDASYONU

Ömer Faruk KOÇAK

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU

Yüksek Lisans Tezi-2012

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

CLOPİDOGREL'İN BİYOANALİTİK YÖNTEM VALİDASYONU

Ömer Faruk KOÇAK

Analitik Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU

ERZURUM

2012

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

CLOPİDOGREL'İN BİYOANALİTİK YÖNTEM VALİDASYONU

Ömer Faruk KOÇAK

Tez Savunma Tarihi : 19.10.2012

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU (Atatürk Üniversitesi) Y.K.d.oğlu

Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr. Kadir Özden YERDELEN (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr. Alptuğ ATİLA (Atatürk Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Yüksak Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM
Enstitü Müdürü

Yüksak Lisans Tezi
ERZURUM - 2012

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR V
ÖZET VI
ABSTRACT VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ IX
TABLOLAR DİZİNİ X
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1.1. Antikoagulan İlaçlar 3
2.1.2. Oral Antikoagülanlar 4
2.1.3. Antitrombositik İlaçlar 4
2.1.4. Etki Mekanizması 5
2.2. Clopidogrel 6
2.2.1. Kullanım Alanları 8
2.2.2. Clopidogrelin Formları 8
2.2.3. Clopidogrelin Etki Mekanizması 9
2.2.4. Clopidogrelin Farmakokinetiği 10
2.2.5. Clopidogrel ile Tedavide Beklenen Yan Etkiler 10
2.2.6. Clopidogrel ile Yapılan Çalışmalar 11
2.3. Spektroskopik Yöntemler 13
2.3.1. Işının Absorplanması 14
2.3.2. Atomik Absorpsiyon Spektrumları 15
2.3.3. Moleküler Absorpsiyon Spektroskopisi 16
2.3.4. Lambert-Beer Kanunundan Sapmalar 19
2.3.5. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektrofotometreleri 19
2.3.6. Tek Işınlı Spektrofotometreler 20
2.3.7. Çift Işınlı Spektrofotometreler 20
2.3.8. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektrofotometre Cihazının Kullanım Amaçları 21
2.3.9. Kalitatif Analiz ve Molekül Yapısını Aydınlatma 21
2.3.10. Kantitatif Analiz 22

2.4. Türev Absorpsiyon Spektrofotometrisi Yöntemi 23
2.5. Kromatografi 24
2.5.1. Kromatografinin sınıflandırılması: 24
2.5.1.a. Adsorpsiyon Kromatografisi 24
2.5.1.b. Dağılma (Partisyon) Kromatografisi 24
2.5.1.c. İyon Değişim Kromatografisi 25
2.5.1.d. Eleme (Jel Filtrasyon, Jel Geçirgenlik) Kromatografisi 25
2.5.2. Kromatografik Ayırım 26
2.5.3. Bir Kromatografik Ayırımın Amaçları 26
2.5.3.a. Kalitatif Analiz 26
2.5.3.b. Kantitatif Analiz 26
2.5.3.c. Preparatif Analiz 26
2.5.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) 27
2.5.4.a. Enjeksiyon Üniteleri 27
2.5.4.b. Pompalar 28
2.5.4.c. Dedektörler 29
2.5.4.d. Kolon 30
2.5.4.e. Hareketli Faz 31
2.5.5. HPLC'de KullanılanTemel Parametreler 32
2.5.5.a. Alıkonma Zamanı ve Kapasite Faktörü 32
2.5.5.b. Seçicilik 34
2.5.5.c. Kolon Etkinliği 34
2.5.5.d. Kolonun Ayırma Gücü 34
2.5.5.e. Hareketli Faz Bileşiminin Ayırıma Etkisi 36
2.5.6. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon) 37
2.5.6.a. Doğruluk ve Kesinlik 37
2.5.6.b. Örneklerin Kararlılığı (Stabilite) 38
2.5.6.c. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi 38
2.5.6.d. Duyarlılık 39
2.5.6.e. Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ) 39
2.5.6.f. Gözlenebilme (Teşhis) Sınırı (LOD) 39
2.5.6.g. Geri Kazanım 39

3. MATERYAL VE METOT 40
3.1. Kullanılan Materyaller 40
3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler 40
3.1.2. Cihazlar 40
3.2. Yöntemler 40
3.2.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) Yöntem Şartları 40
3.2.2. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi Yöntem Şartları 41
3.3. Yöntem Geçerlilik Testleri 41
3.3.1. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı 42
3.3.2. Doğruluk/Kesinlik 42
3.3.3. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ) 42
3.4. Tablet Çözeltilerinin Hazırlanması 43
4. BULGULAR 44
4.1. HPLC Yöntemi 44
4.1.1. Standart Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması 44
4.1.2. HPLC Yöntem Geliştirme 44
4.1.2.a. Hareketli Faz Optimizasyonu 44
4.1.3. HPLC Yöntem Geçerlilik Testleri 45
4.1.3.a. Seçicilik (Belirleyicilik) 45
4.1.3.b. Doğrusallık/Çalışma Aralığı 46
4.1.3.c. Doğruluk/Kesinlik 47
4.1.3.d. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ) 48
4.1.3.e. Analitik Geri Kazanım 49
4.1.3.f. HPLC Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulanması 50
4.2. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi Yöntemi 50
4.2.1. Standart Çalışma Çözeltilerin Hazırlanması 50
4.2.2. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi Yönteminin Optimizasyonu 50
4.2.3. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi Yönteminin Geçerlilik Testleri 51
4.2.3.a. Seçicilik (Belirleyicilik) 51
4.2.3.b. Doğrusallık/Çalışma Aralığı 52
4.2.3.c. Doğruluk/Kesinlik 53
4.2.3.e. Analitik Geri Kazanım 55
4.2.3.f. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulanması 56

5. TARTIŞMA 57
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 61
7. KAYNAKLAR 62
EKLER 68
EK-1. ÖZGEÇMİŞ 68
EK-2. ETİK KURUL ONAYI 69

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarımın bir ürünü olarak yaptığım bu tezin hazırlanmasında emeği olan, benim en iyi şekilde yetişmem için çalışan, bilgi ve deneyimleriyle sürekli destek olan Sayın Hocam Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU'na

Tez sürecindeki ve öncesindeki tüm çalışmalarımda beni yönlendiren, bana her konuda yardımcı olan, en yoğun olduğu zamanlarda dahi yardım edebilmek adına değerli vakitlerini harcayan değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Alptuğ ATİLA' ya,

Çalışmalarımın her aşamasında büyük emeği olan ve her konuda bana destek veren Sayın Arş. Gör. Onur ŞENOL'a ve Arş. Gör. Mehmet Emrah YAMAN'a ,

Çalışma süresinde bana her konuda yardımcı olan tüm değerli hocalarıma ve mesai arkadaşlarıma,

Her zaman beni destekleyen, sevgi ve ilgisini hiçbir zaman eksik etmeyen sevgili eşim Gülşen KOÇAK'a,

Ayrıca hiçbir zaman fedakârlıktan kaçınmayan sevgili aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Erzurum, 2012 Ömer Faruk KOÇAK

ÖZET

Clopidogrel'in Biyoanalitik Yöntem Validasyonu

Amaç. Clopidogrel etkin maddesinin miktar tayini için bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi yönteminin geliştirilmesi, geçerlilik testlerinin yapılması ve uygulama aşamasında farmasötik preparatlarda clopidogrel miktar tayinin gerçekleştirilmesi amaçlanmaktadır.

Materyal ve Metot. Farmasötik preparatlarda clopidogrelin belirlenmesi için UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi ve HPLC yöntemleri geliştirildi ve geçerlilik testleri yapıldı. Spektroskopi yönteminde, farklı çözücülerde clopidogrelin spektrumu alındı ve en iyi absorbans değeri metanol-asetonitril (50:50, h/h) çözücü bileşiminde 202 nm dalga boyunda elde edildi. HPLC yönteminde ise asetonitril-metanol-su (45:45:10, h/h/h) hareketli fazı, C18 ters faz kolonu, 0.9 mL/dak hareketli faz akış hızı, 10 µL enjeksiyon hacmi ve 230 nm dalga boyundan oluşan çalışma parametreleri kullanıldı. HPLC çalışmasında iç standart (IS) olarak meloksikam kullanıldı. Her iki yöntemin çalışma parametreleri belirlendikten sonra doğrusallık, analitik geri kazanım, güniçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik gibi parametreleri içeren geçerlilik testleri yapıldı.

Bulgular. 0.25-30 µg/mL derişim aralığında HPLC yönteminin, 1.25-25 µg/mL derişim aralığında UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi yönteminin doğrusal olduğu tespit edildi. Güniçi ve günler arası kesinlik ve doğruluk değerleri sırasıyla % 5.38 ve % 2.66 (HPLC yöntemi için), % 3.77 ve % 3.60 (UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi yöntemi için), analitik geri kazanım değeri ise her iki yöntem için ortalama olarak % 99.5 olarak belirlendi. Geliştirilip geçerlilik testleri yapılan HPLC ve UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi yöntemleri clopidogrel içeren farmasötik preparatlara uygulandı.

Sonuç. Clopidogrel için geliştirilen ve geçerlilik testleri yapılan HPLC ve UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi yöntemlerin farmasötik preparatlarda (Karum, Plavix ve Atervix) clopidogrel miktar tayinine başarı ile uygulandı.

Anahtar Kelimeler: Clopidogrel, UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi yöntemi, HPLC, farmasötik preparat

ABSTRACT

Bioanalytical Method Validation of Clopidogrel

Aim. It is aimed to develop and validate a high performance liquid chromatography and UV-Visible Absorption Spectroscopy method for determination of clopidogrel and apply these methods on pharmaceutical formulations that include clopidogrel.

Material and Method. UV-Visible Absorption Spectroscopy and HPLC methods to determine clopidogrel in pharmaceutical formulations were developed and validated. In the spectroscopy method, the spectrum of clopidogrel was taken in different solvent mixtures and optimum absorbance values were obtained, where it detected at 202 nm, in methanol-acetonitrile (50:50 v/v) mixture. In HPLC method, working parameters which were mobile phase (acetonitrile-methanol-water (45:45:10, v/v/v)), reverse phase column (C_{18}), flow rate (0.9 mL/min), injection volume (10 µL) and wavelength (230 nm). Meloxicam was used as internal standard (IS) for HPLC analysis. After the optimization of both methods, the validation tests were made including analytic recovery, linearity, intra and inter day accuracy and precision.

Results. It was noticed that methods were linear in concentration range of 0.25-30 µg/mL for HPLC method and 1.25-25 µg/mL for UV-Visible Absorption Spectroscopy method. The intraday and inter-day accuracy and precision values were lower than 5.38% and 2.66% (for HPLC method), 3.77% and 3.60% (for spectroscopy method). The analytic recovery values for both methods were found as averagely % 99.5. Developed and validated HPLC and UV-Visible Absorption Spectroscopy methods were applied to pharmaceutical preparation including clopidogrel.

Conclusion. The developed and validated HPLC and UV-Visible Absorption Spectroscopy methods for clopidogrel were successfully applied on pharmaceutical preparation (Karum, Plavix and Atervix).

Key words: Clopidogrel, UV-Visible Absorption Spectroscopy method, HPLC, pharmaceutical preparation

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BSS : Bağıl Standart Sapma

BH : Bağıl Hata

GK : Geri Kazanım

HPLC : Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

IS : İç Standart

LOD : Gözlenebilme Sınırı

LOQ : Miktar Tayin Alt Sınırı

ng : Nano Gram

nm : Nanometre

µL : Mikro Litre

µg : Mikro Gram

UV : Ultraviole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No : **Sayfa No:**

Şekil 2.1. Clopidogrelin kimyasal yapısı 6
Şekil 2.2. Clopidogrelin üç boyutlu görünümü 7
Şekil 2.3. Elektromanyetik ışınların sistematik olarak tanımlanması 15
Şekil 2.4. Bir molekül için elektronik, titreşimsel, rotasyonal enerji seviyelerini gösteren enerji diyagramı 16
Şekil 2.5. Absorblayan bir çözeltiye giren P0 şiddetindeki ışın demetinin P şiddetine düşmüş olarak çıkması 17
Şekil 2.6. Tek ışınlı Spektrofotometre cihazının şematik gösterimi 20
Şekil 2.7. Çift ışınlı spektrofotometre cihazının şematik gösterimi 21
Şekil 2.8. HPLC Cihazı Kısımlarının Şematik Gösterimi 27
Şekil 2.9. Çözünen maddelerin kolonda göç hızları 33
Şekil 2.10. Kromatografik ayırımın başarı ile gerçekleşmesi 35
Şekil 2.11. Ayrılmanın seçicilikle değişimi 35
Şekil 2.12. Ayrılmanın kapasite faktörü ile değişimi 36
Şekil 4.1. 17.5 µg/mL derişiminde standart clopidogrel çözeltisinin HPLC kromatogramı 45
Şekil 4.2. Artan derişime bağlı clopidogrel standart çalışma çözeltilerinin HPLC kromatogramları (0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 22.5, 25 ve 30 µg/mL) 46
Şekil 4.3. HPLC yönteminde elde edilen ortalama kalibrasyon eğrisi 47
Şekil 4.4. Clopidogrel kalite kontrol çözeltilerine ait kromatogramlar 48
Şekil 4.5. 5 µg/mL derişimde ilaç çözeltisine 3 farklı clopidogrel derişiminde ekleme sonrası elde edilen çözeltilerin HPLC kromatogramı 49
Şekil 4.6. 5 µg/mL derişiminde standard Clopidogrel çözeltisinin spektrumu 35
Şekil 4.7. 1.25, 2.50, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20, 25 µg/mL derişimlerde clopidogrel standart çalışma çözeltilerinin spektrumları 52
Şekil 4.8. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi yönteminde elde edilen ortalama kalibrasyon eğrisi 53
Şekil 4.9. 2.5, 12.5 ve 20 µg/mL derişimlerde clopidogrel kalite kontrol çözeltilerine ait spektrumlar 54

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No : **Sayfa No:**

Tablo 2.1. Ayırabildikleri maksimum madde miktarına göre kolonlar 31
Tablo 3.1. Clopidogrel için HPLC yöntem şartları 41
Tablo 3.2. Clopidogrel için spektroskopi yöntem şartları 41
Tablo 4.1. HPLC yönteminin kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri 47
Tablo 4.2. HPLC yönteminin güniçi - günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6) 48
Tablo 4.3. Farmasötik preparatlarda yöntemin analitik kazanım değerleri (n=6) 50
Tablo 4.4. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi yönteminden elde edilen kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz sonucu 53
Tablo 4.5. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi yönteminin güniçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6) 54
Tablo 4.6. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi yönteminin analitik kazanım değerleri (n=3) 56

1. GİRİŞ

Antitrombositler (antiagregan), tromboz (damar içi pıhtı) tedavisinde kullanılan kanın pıhtılaşma yeteneğini azaltan ilaçlardır. Bu ilaçlar, özellikle koroner arter hastalıklarındaki koruyucu etkilerinden dolayı son yıllarda üzerinde çok durulan ve araştırmalar yapılan bir ilaç grubudur. Venöz tromboz ve arteriyel tromboz olmak üzere ikiye ayrılır. Venöz tromboz fibrin içeren kırmızı tromboz ve artiyel trombozda platelet içeren beyaz tromboz olarak bilinir.[1] Damar içinde tromboz oluşumunda rol oynayan çeşitli faktörler vardır. Bunlar, damar çeperinin durumu, trombositlerin veya plazma proteinlerinin aktivasyonudur. Trombozun oluştuğu yer, bileşimini ve oluşum mekanizmasını belirleyen temel faktördür. Bu nedenle arterlerde, venlerde oluşan trombozlar arasında ve bunların tedavilerinde önemli farklılıklar vardır. Venöz tromboz, pıhtılaşma faktörlerinin aktivasyonuna bağlı olarak gelişir. Damar çeperi genellikle normaldir ve trombosit aktivasyonunun önemi azdır. Arteriyel trombozda ise damar çeperinin ateroskleroza bağlı olarak bozulması temeldir ve buna bağlı olarak trombosit aktivasyonu gelişir. Plateletler tromboz oluşumunda ve kanamanın durmasında etkilidirler. Burada hemostatik fonksiyon ve tromboplastik fonksiyon olmak üzere iki fonksiyon önem taşımaktadır. Hemostatik fonksiyon fiziksel etki yapabilirken, tromboplastik fonksiyon plateletlerin kimyasal bileşenlerinin koagülasyon mekanizmasına katılmasıdır.[1]

Arter ve venlerin çeperinde kan dolaşan yüzeylerde tromboz oluşmasını gelişmesini engelleyen ve oluşmuş pıhtıyı ortadan kaldıran ilaçlara anti trombotik ilaçlar denir. Patolojik olan trombosit oluşumu ve fizyolojik olan kanama durması yakın benzerlik gösterir. Bu yüzden bu ilaçların dozlarının aşırılığı veya etkilerini arttıran ilaçlarla kullanılması anormal kendiliğinden kanamalara neden olur. Kalıtsal veya kazanılmış hemostaz bozuklukları olanlarda bu ihtimal artar.[2]

İn vivo tromboz oluşumunu engelleyen ve in vitro pıhtılaşma testlerini bozan ilaçlar hem antitrombotik, hem de antikoagülan ilaçlardır. Heparin ve varfarin bu grubun özelliklerini taşıyan ilaçlardır. In vivo trombozu engelleyen fakat in vitro pıhtılaşma testlerini bozmayan ilaçlar antitrombotik olup, antikoagülan değillerdir. Aspirin ve clopidogrel gibi antitrombosit ilaçları da antitrombotik olarak kabul etmek gerekir.[3]

Kanın pıhtılaşmasını engelleyen ya da oluşan pıhtıyı eriten ilaçlara antitrombotik ilaçlar denir. Pıhtılaşma; hemostaz sırasında damar dışında, tromboz olayında ise damar içinde oluşur. Yaşamsal, fizyolojik bir olay olan hemostaz, zedelenmiş ya da kesilmiş damardan kanamanın durmasıdır. Tromboz ise hemostaza benzer mekanizmalarla oluşan damar içi pıhtı (tromboz) oluşumudur; istenmeyen ve patolojik bir durumdur. Antitrombotik ilaçlar esas olarak tromboz ve onun neden olduğu hastalıkların tedavisinde kullanılırlar. Ancak benzer mekanizmalarla oluşan fizyolojik hemostazı da engelleyerek istenmeyen etkilere yol açabilirler.[4]

Bu çalışmada, antitrombotik ilaçlardan clopidogrelin miktar tayini için Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ve UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi yöntemleri geliştirilip, geçerlilik testlerinin yapılması ve daha sonra bu yöntemler ile clopidogrel etkin maddesini içeren tabletlerde clopidogrel miktar tayinin yapılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Hemostaz (kanamanın durması) ve tromboz (damar içinde pıhtı oluşumu), birbirine yakından benzer; ancak kanamanın durması fizyolojik, tromboz ise patolojik bir olaydır. Yani yanlış yer ve zamanda olan koagülasyondur. Hemostaz, cerrahi girişimlerde damarın zedelenmesi veya damar üzerindeki travma sonucu endotel tabakasının bütünlüğünü yitirmesi ve kanın subendoteliyal bağ dokusu ile etkileşmesi ile tetiklenir.[1,2] Trombozun başlamasında ise damar endotelinin zedelenmesi, yırtılması veya disfonksiyonu esastır. Pıhtılaşma tromboz sırasında damar içinde ve hemostaz sırasında damar dışında meydana gelir. Pıhtılaşma; çoğu plazmada bulunan pıhtılaşma faktörleri isimli özel proteinlerin etkileşmesine ve pıhtılaşma faktörlerinin kendi aralarında belli bir düzene göre etkileşmesine bağlı karmaşık bir olay zinciridir.[2] Akut koroner hastalık tablosu ya da iskemik inme gibi aterotrombotik klinik durumlarda trombositler kritik bir rol oynar.[5] Antitrombosit ajanlar trombosit aktivasyonunu ve agregasyonunu inhibe ederek tromboz gelişimini önlemektedir. Mevcut tedavi seçenekleri etkinlik ve güvenilirlik açısından verimli bir seçenek sunamamaktadır.[6]

Arterlerin ve venlerin çeperinde ve içinde kan dolaşan yapay yüzeylerde, tromboz (damar-içi pıhtı) oluşmasını ve gelişimini inhibe eden ilaçlara (antikoagülanlar ve antitrombositikler gibi) ve oluşmuş pıhtıyı eriten ilaçlara (fibrinolitikler gibi) antitrombotik ilaçlar denilir.[7]

2.1.1. Antikoagulan İlaçlar

Bunlar heparin ve oral antikoagülanlardır. Bu iki grup, kimyasal, farmakodinamik ve farmakokinetik olarak farklıdır. Antikoagulanların başlıca kullanım alanı, dolaşımın yavaş olduğu venler içinde var olan trombositler ve eritrositlerle dolu bir fibrin ağından oluşan trombozun büyümesini veya oluşumunu önlemektir. Bu nedenle, bacaklardaki derin ven trombozlarının önlenmesi ve tedavisinde yaygın olarak kullanılırlar. Kan akışının hızlı olduğu damarlarda ise trombozlar bol miktarda trombosit ve çok az miktarda fibrinden oluştuğu için,

arterlerdeki trombozun önlenmesinde antikoagulanların rolü azdır. Kalp kapak protezleri üzerinde tromboz oluşumunun önlenmesi için de kullanılırlar.[7]

2.1.2. Oral Antikoagülanlar

K vitamini antimetaboliti olmaları nedeniyle, karaciğerde K-vitaminine bağımlı olarak sentez edilen protrombin (faktör II), faktör VII, IX ve X'un sentezini ve özellikle bu faktörlerin aktive edilebilir hale gelmesi için gereken, moleküllerinin glutamik asid rezidülerinin ribozomlarda gama-karboksiglutamik asid (Gla) rezidüsüne dönüştürülmesi olayını inhibe ederler. Bu olayın bozulması, olaya kenetli K vitamini epoksidinin indirgenmiş K vitaminine dönüşmesi olayını katalizleyen epoksid redüktazın inhibisyonuna bağlıdır.[7]

Bu azalma geç ortaya çıktığından, antikoagülan etkileri, heparin ile olduğu gibi hemen değil, ilaç verildikten en az 48-72 saatlik bir latent süreden sonra tam olarak ortaya çıkar. Bu süre içinde, acil durumlarda heparin ile antikoagülasyon hemen başlatılmalıdır.[7]

Oral antikoagulan tedavi için başlıca endikasyon derin ven trombozudur. Pulmoner embolizmi olan hastalar ile atriyal fibrilasyonu olup emboli oluşma tehlikesi olanlar ve mekanik kalp kapakçığı protezi olanlar da tedavi edilmelidir. Bu hastalarda, antitrombositik ilaçlar da yararlı olabilir. Asetilsalisilik asit, geçici iskemik ataklarda riskin azaltılması için daha uygundur. Oral antikoagülanlar, ağızdan verilirler; hepatik metabolizma hızları ve absorpsiyonları bireyler arasında fazla değişkenlik gösterdiğinden, doz elde edilen cevaba göre belirlenmelidir.[7]

2.1.3. Antitrombositik İlaçlar

Trombositlerin aktivasyonu engelleyerek, damar endoteline yapışmalarını (adezyonu) ve onların birbiri ile yapışmalarını (agregasyonu) önleyen ilaçlardır. Trombosit agregasyonu pıhtılaşma olayında merkezi rol oynamaktadır. Trombositlerin özellikle koroner ve serebral arter

tıkanmalarında önemli olduklarına inanılmaktadır. Trombosit agregasyonu adenozin difosfat (ADP), tromboksan, serotonin, fibrin ve diğer maddelerce kolaylaşır.[7]

2.1.4. Etki Mekanizması

Aspirin ve diğer steroid olmayan non stereoidal antienflamatuar ilaçlar (NSAİİ) siklooksigenaz enzimi bloke ederek tromboksan sentezini inhibe ederler. Tromboksan A_2, trombosit agregasyonunun potent stimülatorüdür. Aspirin, enzimi geri dönüşümsüz olarak bloke ettiğinden özellikle çok etkilidir. Çünkü trombositler yeni protein sentezleyemezler ve aspirinle inhibisyon yeni trombositler oluşuncaya kadar devam eder. Diğer NSAİİ'ların antitrombosit etkileri daha az sürer. Tiklodipin ve clopidogrelin etki mekanizması ADP reseptörünün geri dönüşümsüz inhibisyonudur, böylece ADP aracılığı ile trombosit agregasyonu inhibe olmuş olur. Absiksimab, fibrinojenin trombositler üzerindeki glikoprotein IIb/IIIa reseptörlerine bağlanmasını bloke ederek trombosit agregasyonunu önleyen monoklonal antikordur. Dipiridamol, trombositlerin adenilat siklazını aktive ederek ve endotelyal prostasiklinin antiagregant etkisini potansiyalize ederek antiagregant etki yapar.[7]

Antitrombositik ilaçlar, trombosit agregasyonunu azaltarak, arteriyel dolaşımda tromboz oluşmasını engelleyebilirler. Arteriyel dolaşımda antikoagülanların etkisi azdır. Trombotik serebrovasküler ya da kardiyovasküler hastalığa yönelik ikincil korumada, asetilsalisilik asit kullanılır. İskemik olaydan sonra, tercihen su içerisinde dağıtarak ya da çiğnenerek tek doz asetilsalisilik asit alınmalıdır. Miyokard infarktüsü ve iskemik (hemorajik değil) inmeden sonra 300 mg'lık doz verilir. İlk dozdan sonra günde 75-300 mg asetilsalisilik asit ile idame tedavisine geçilir.[7]

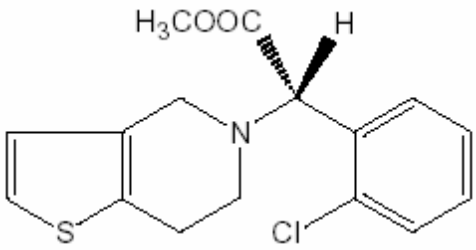
Vasküler olaylara karşı birincil koruma için de, on yıllık tahmini koroner kalp hastalığı riskinin en az %15 olduğu vakalarda, hipertansiyonun kontrol altında tutulması koşuluyla, düşük doz asetilsalisilik asit yararlıdır. Koroner bypass ameliyatından sonra da, düşük doz asetilsalisilik

asit (günde 75-100 mg) verilir**.** Atriyalfibrilasyonda, stabil anginada ve intermitan klodikasyonda da kullanılır.[7]

2.2. Clopidogrel

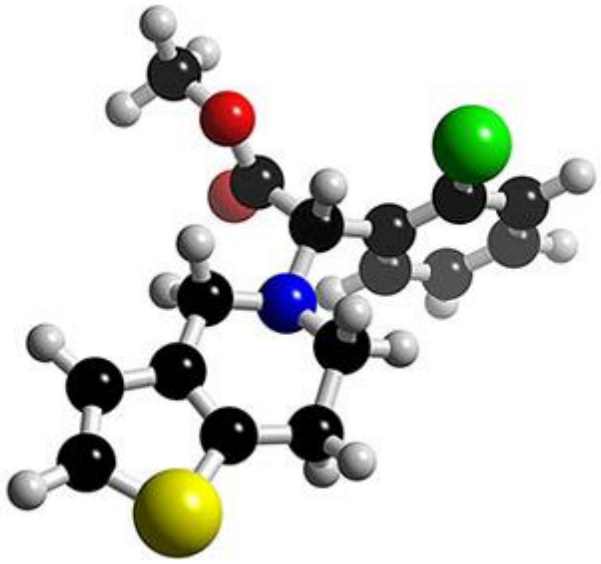
Clopidogrel tiklopidin isimli etkin maddenin kimyasal olarak değişikliğe uğratılması sonucu elde edilen bir etkin maddedir. Clopidogrel bisulfat olarak dünya piyasasında Sanofi-Synthelabo ve BMS tarafından Plavix ve Iscover ismi ile pazarlanmaktadır. Aterotrombotik olayların azaltılmasında, miyokard enfarktusu, inme ve kardiovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılan bir etkin maddedir.[8,9] Ayrıca perkutan koroner müdahale sonrası stent trombosis oluşma sıklığını azalttığı da görülmüştür.[10,11] Clopidogrel, diğer platelet inhibitorleri gibi akut koroner sendrom sebebi ile sonuçlanan ölümlerin veya hastalıkların azaltılmasında etkili olduğu kanıtlanmış bir maddedir.[12,13] Clopidogrelin klinik anlamda yararlı olduğu dünya çapında 30000 hasta üzerinde yapılan çalışmalar da uzun sure kullanımında aterotrombotik olayların önlenmesinde etkili olduğu klinik anlamda kanıtlanmıştır.[9,14,15] Clopidogrel bisulfat beyaz ya da krem renginde bir tozdur.[9]

Clopidogrel bisulfatın molekül ağırlığı 419.9 g/mol'dür. Pratikte suda veya nötral pH değerlerinde çözünmez. Metanolde ve asetonitrilde kolaylıkla çözünmekte, dietileterde ise pratikte çözünmemektedir.[16,17]



Şekil 2.1. Clopidogrelin kimyasal yapısı[9]

Clopidogrel bisulfatın kimyasal ismi; (S)-α-(2-klorofenil) 6,7-dihidrotiyeno [3,2-c] piridin 5(4H) asetik asit metil ester hidrojen sülfat tuzu diye okunur.[9,18]



Şekil 2.2. Clopidogrelin üç boyutlu görünümü

Clopidogrel in vitro olarak inaktif in vivo olarakda platelet inhibisyonu etkisini gösterebilmesi için karaciğer sitokrom P450 izoenzimleri tarafından hepatik biyotransformasyona uğraması gereklidir. Bir tiyol türevi olan aktif metabolit clopidogrelin 2-oxoclopidogrele oksidasyonu daha sonrada gerçekleşen hidrolizi ile oluşmaktadır.[19,20] İn vitro izole edilen aktif tiyol metaboliti hızla ve geri dönüşümsüz olarak trombosit reseptörlerine bağlanmaktadır.[9,21] Bu aktif metabolit plazmada izole edilmiş ve tayini gerçekleştirilmiştir.[22,23] Oral uygulanmasından sonra clopidogrelin plazma seviyesi oldukça düşüktür. Plazmada sirküle olan bileşiğin yaklaşık % 85'ini temsil eden inaktif metabolit karboksilik asit türevidir.[9,21] Karboksilik asit metaboliti, clopidogrelin karboksil esteraz enzimleri tarafından ester bağlarının parçalaması sonucu oluşmaktadır.[24-26]

2.2.1. Kullanım Alanları

Clopidogrel ile aspirin kombine halde klinik çalışmalarda çok fazla kullanılmaktadır. Özellikle tromboz oluşumunu engellemek, platelet antijen polimorfiziminde, miyokard enfarktus'de, perkutan koroner müdahale geçirmiş hastaların uzun dönem tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.[9,27-29] Fakat bu birleşim, maddelerin tek başına kullanımlara oranla, kanama zamanlarının uzamasına neden olmaktadır.[6,9] Yapılan bir çalışmada iskemik olay riski altında bulunan 19185 hasta üzerinde clopidogrel ile aspirinin etkileri karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak clopidogrel iskemik inme, miyokardial enfarktusde ya da vasküler ölümleri önlemede aspirinden daha etkili bulunmuştur.[30]

2.2.2. Clopidogrelin Formları

Clopidogrelin altı tane polimorf yapısı ve bir tane de amorf yapısı bulunmuştur.[9,31] Fakat farmasötik preparatlarda yalnızca form I ve form II kullanılmaktadır.[31] Form I'de patent süresi sona ermiş fakat form II'de ki patent koruması devam etmektedir. Form I, ticari anlamda piyasada kullanılmaya başlanmasından sonra, molekülü keşfeden firma form II'yi keşfetmiştir. Yapılan incelemelerde form II'nin form I'den termodinamik acıdan daha stabil olduğu bulunmuştur.[9]

Clopidogrelde, bir asimetrik karbon atomunun neden olduğu R ve S olmak üzere iki enantiyomeri mevcuttur.[9,20] Sanofi-Synthelabo tarafından yapılan çalışmalarda clopidogrelin aktif bileşiğinin S-enantiyomeri olduğu gösterilmiştir.[9,32] Ayrıca aktif S-enantiomeri stabilitesini koruyabilecek ortam ve şartlarda tutulmasa R-enantiomerine dönüşerek etkisini yitirmektedir.[9,33] Clopidogrelin ürünlerinde ve bitmiş ürünlerinde R-enantiyomeri çok dikkatli olarak takip edilmesi önerilmekte ve ülke sağlık otoriteleri tarafından da R-enantiyomerin takip edilmesi istenmektedir. Amerika da R-enantiyomeri miktarı % 0.2 ile sınırlandırılmıştır.[9]

Yapılan bir çalışmada clopidogrel bisulfatı içeren ve çeşitli ülkelerde piyasada ruhsatlı olan on sekiz tane jenerik ilaç ile innovator ürün (Plavix) kütle benzerliği, impurite profili ve içeriği, çözünme özelliği ve stabilite açısından karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak; kütle benzerliği açısından ilaçların birbirine yakın olduğu ve farmakope limitlerinde kaldığı, çözünme özelliği açısından innovator ürünün 30 dakika içerisinde % 94-96 oranında çözündüğü, benzer ilaçların ise % 50-60 civarında çözündüğü, stabilite çalışmalarında ise benzer ilaçların hidroliz ürünleri, R-enantiyomeri ve total impurite değerlerinin üst limitlerde bulunduğu tespit edilmiştir.[9]

2.2.3. Clopidogrelin Etki Mekanizması

Trombositler adenozin difosfat (ADP), kollajen, plazminojenaktivator faktor (PAF), prostagladinler (PG-G2 ve PG-H2), thrombin, serotonin, adrenalin, thromboxane A2 ve vazopresin gibi maddeler tarafından uyarılması sonucu, membran üzerindeki reseptör aracılığı ile aktif olup agregasyon ve sekresyon fonksiyonlarını gerçekleştirirler.[6,34]

Adenozin difosfat (ADP), aktive olmuş plateletler, eritrositlerve endoteliyal hücrelerden salınmaktadır.[9,35] ADP'nin salınmasının ardından, ADP trombosite bağlanarak membranındaki glikoprotein (Gp-Iıbve Gp-IIIa) tipi fibrinojen reseptorlerini aktive ederek fibrinojenin bağlanmasına ve yakınındaki trombositlerle birleşerek agregasyona yol açarlar.[6,9] Clopidogrelin aktif metaboliti, adenozin difosfatın (ADP) trombositteki reseptöre bağlanmasını ve bu yolla selektif olarak glikoprotein GPIIb/IIIa kompleksinin ADP uyarımlı aktivasyonunu, bunun sonucu olarak da trombosit agregasyonunu inhibe eder.[36,37] Ayrıca trombosit aktivasyonunun salgılanan ADP ile artmasını engelleyerek diğer agonistlerin yol açtığı trombosit agregasyonunu inhibe eder. Clopidogrelin aktif metaboliti, trombosit ADP reseptörünü geri dönüşümsüz olarak modifiye etmek suretiyle etkisini gösterir.[32,38]

2.2.4. Clopidogrelin Farmakokinetiği

Günde oral olarak alınan 75 mg clopidogrel hızla absorbe olur ve clopidogrelin gastrointestinal kanaldan absorpsiyonu % 50 dolaylarındadır.[8,39] Dolaşımda bulunan ana metabolitin kinetiği clopidogrelin 50 ile 150 mg'lık doz aralığında doğrusaldır ve yarılanma ömrü uzundur.[9,39] Tekrarlanan dozlarda günlük olarak uygulanan 75 mg clopidogrelin ana bileşiğinin plazma derişimi (≤0.00025mg/L) oldukça düşük ve platelet inhibisyon etkisinden de yoksundur.[9] Oral olarak alınan clopidogrelin kararlı hal (steady state) derişimine ulaşması ortalama olarak sekiz günde gerçekleşmektedir.[40,41] Clopidogrel ve dolaşımda bulunan ana metaboliti, in vitro ortamdaki plazma proteinlerine geri dönüşümlü olarak bağlanır.[9] Bu bağlanma in vitro olarak 100 μg/mL üstündeki derişimlerde gerçekleşmiştir.[9] İnsanlarda, 120 saatlik bir aralıkta yaklaşık % 50 oranında idrarla ve yaklaşık % 46 oranında feçesle atılır.[9,42] Doza bağımlı platelet agregasyonunu inhibe edici etkisi, uygulanan75 mg'lık dozun ardından en az iki saat sonra görülmekte ve beş ile yedi gün boyunca etki devam etmektedir.[42,43] Maksimum plazma derişimine bir saatte ulaşmaktadır.[43]

2.2.5. Clopidogrel ile Tedavide Beklenen Yan Etkiler

Her ilaçta olduğu gibi bu etkin madde için de söz konusudur. Yan etki olarak hemorajik bozukluklar (kanama zamanın artması, gastointestinal kanama, intrakraniyal kanama), hematolojik bozukluklar (notropeni, trombositopeni, trombotik trombositopenik purpura), santral ve periferik sistem bozuklukları (baş ağrısı, sersemlik, baş dönmesi, uyuşukluk), gastrointestinal bozukluklar (karın ağrısı, dispepsi, diyare, gastrit, konsitipasyon), hepatik ve biliyer bozukluklar, deri ve eklemlerde bozukluklar görülmektedir.[9,44-49]

a. Hematolojik Yan Etkiler

Kanama

Notropeni/Agrunositozis

TTP, Pansitopeni

TTP-HUS

Aplastik anemi

Kemik iliği baskılanması

b. Hematolojik Olmayan Yan etkiler

Gastroenterit

Urtiker dokuntu

Akut artirit

Yetişkin nefrotik sendrom

Anjioodem

Hepatoseluler ve kolestatik karaciğer zedelenmesi

2.2.6. Clopidogrel ile Yapılan Çalışmalar

Panderi ve arkadaşları[26] sıvı kromatografisi-kütle spektrometri (LC-MS) yöntemiyle insan plazmasında clopidogrelin karboksilik asit metobolitini belirlemişlerdir. Bu çalışmada iç standart olarak sulfafuratol, katı faz ekstraksiyon metodu, PGC kolon, metanol-% 0.1 trifloraasetikasit içeren sudan (70:30, h/h) oluşan mobil faz ve 0.25 mL/dak akış hızından oluşan çalışma parametreleri kullanılmıştır.

Zaazaa ve arkadaşları[50] clopidogrel bisülfatın spektrofotometrik ve spektrodensotometrik olarak belirlenmesi ve bazik olarak ayrıştırma kinetiğini çalışmışlardır.

Serra ve arkadaşları[51] kapiler elektroforez yöntemiyle clopidogrel ve onun karboksilik asit metabolitlerinin eş zamanlı olarak belirlenmesini çalışmışlardır.

Mitokoz ve Panderi[16] yaptıkları çalışmada farmasötik preparatlarda clopidogrelin belirlenmesi için bir HPLC yöntemini geliştirip geçerlilik testlerini yapmışlardır. Bu

çalışmada C_{18} kolon, 0.3 mL/dak akış hızı, naproksen olarak iç standart, 235 nm dalga boyu ve sodyum dihidrojen fosfat-asetonitrilden (35:65, h/h) oluşan hareketli faz çalışma parametreleri kullanılmıştır. Clopidogrelin ve IS'ın alıkonma zamanları sırasıyla 6.28 ve 3.08 dakika olarak tespit edilmiştir.

Rao ve arkadaşları[52] farmasötik preparatlarda sitalopramın enantiometrik saflığının belirlenmesi için bir HPLC yöntemini geliştirip geçerlilik testini yapmışlardır. 240 nm dalga boyu, UV dedektör, clopidogrel hidrojen sülfatı iç standart olarak ve n-hexane:2-propanol:trietilaminden (95:0.5:0.1, h/h/h) oluşan hareketli fazı çalışma parametreleri kullanılmıştır.

Ksycinska ve arkadaşları[53] LC-MS yöntemiyle insan plazmasındaki clopidogrelin metobolitini belirlemeye çalışmışlardır. Plazmadan clopidogrelinin geri kazanımında sıvı sıvı ekstraksiyon yöntemini kullanmışlardır. Çalışmada C_{18} kolon, mobil faz olarak asetonitril-su-formikasit (60:40:0.1, h/h/h), 0.2 mL/dak akış hızı, repagliniti iç standart ve 35 ^{0}C kolon sıcaklığından oluşan parametreler kullanılmıştır. Analiz süresi 12 dakika olarak belirlenmiştir.

Takahashi ve arkadaşları[54] LC-MS-MS yöntemiyle insan plazmasında clopidogrel aktif metabolitinin miktar tayini için çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada iç standart olarak clopidogrel aktif metabolitinden türetilen bir analoğu, katı faz ekstraksiyon yöntemi, metanol-formikasitden (70:30, h/h) oluşan hareketli fazı ve 0.2 mL/dak akış hızı kullanılmıştır. Analiz süresi 6 dakika olarak belirlenmiştir.

Fayed ve arkadaşları[55] trietilamin fosforik asit tampon çözeltisi kullanarak kapiler elektroforez yöntemiyle clopidogrelin ve safsızlıklarının belirlenmesi ve ayrılmasını çalışmışlardır.

2.3. Spektroskopik Yöntemler

Spektroskopik yöntemler; atomik ve moleküler spektroskopiye dayanan geniş bir analitik yöntemler grubudur. İnorganik ve organik bileşiklerin kalitatif, kantitatif analizlerinde, asit-baz denge sabitlerinin ve molekül yapılarının aydınlatılmasında spektroskopik yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır. Spektroskopi kavramı önceleri görünür bölge ışınının çeşitli dalga boylarına ayrılıp spektrumlarının elde edilmesi için kullanılırken günümüzde ise elektromanyetik ışınların madde ile etkileşimini inceleyen genel bir bilim dalı olarak tanımlanmaktadır. Önceleri sadece elektromanyetik ışıma ile madde arasındaki etkileşimlerle ilgilenilirdi; ancak bugün için spektroskopinin kapsamı madde ve diğer enerji türleri arasındaki etkileşimleri de içerecek şekilde genişletilmiştir. Elektromanyetik ışıma uzayda çok büyük bir hızla hareket eden dalga ve parçacık yapısında bulunan, pek çok yapıya girebilen bir enerji şeklidir.[56]

Elektromanyetik ışının madde (atom ya da moleküller) tarafından soğurulması veya yayılması inceleniyorsa sırasıyla, soğurma (absorpsiyon) veya yayılma (emisyon) spektroskopileri olarak adlandırılır. Işının moleküller tarafından soğurulması moleküldeki atomların türüne, düzenlenmesine, moleküllerin şekline, büyüklüğüne vb. özelliklerine bağlı olduğundan spektroskopik yöntemler maddelerin yapılarının ve stereokimyasal özelliklerinin bulunması, tanınması ve saflık kontrolü gibi çok geniş bir alanda uygulanmaktadır. Spektroskopik çalışmalarda madde üzerine dalga boyu 110 nm den 30000 nm'ye kadar değişen çeşitli ışınlar gönderilir. Bütün bu dalga boylarını verecek ve hangi dalga boylarının absorplandığını tespit edecek tek bir cihaz yapmak mümkün olmadığından, belirli dalga boyları arasında çalışan cihazlar geliştirilmiştir. 110-1000 nm dalga boylarındaki ışınlarla çalışan cihazlara ultraviyole ve görünür alan, 2500-30000 nm dalga boylarında çalışan cihazlara infrared ve dalga boyları yüzlerce metreye kadar değişen radyo dalgalarıyla çalışan cihazlara da nükleer manyetik rezonans cihazları denir. Bu cihazların geçerli oldukları alan

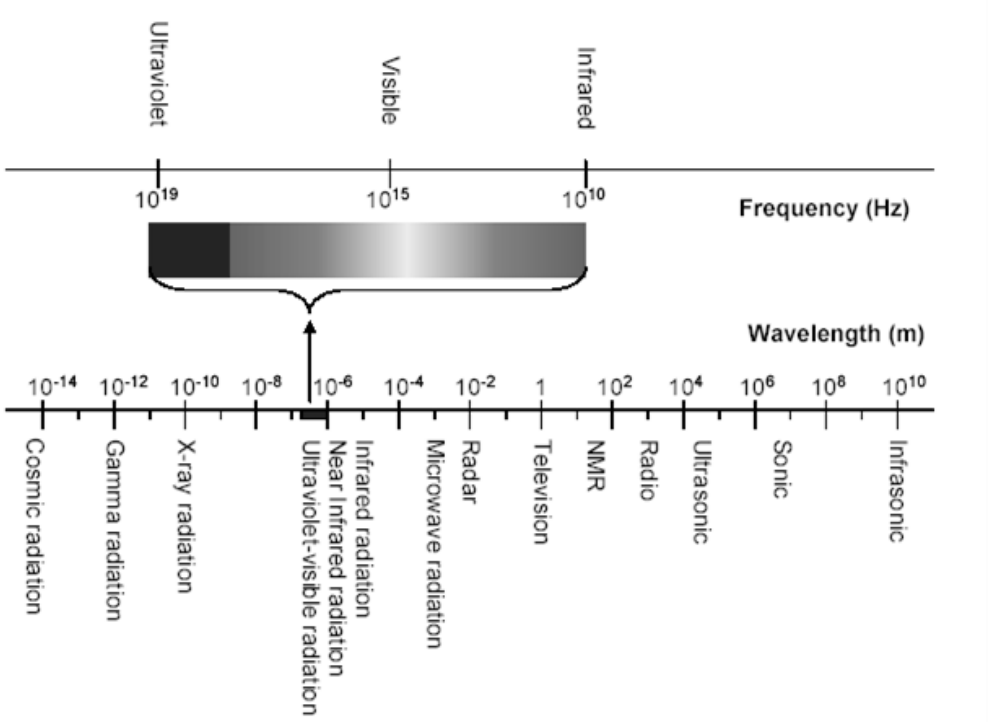
spektroskopilerine de sırasıyla Ultraviyole-Görünür Bölge Absorpsiyon (UV-Visible), Infrared (IR titreşim) ve Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektroskopileri adı verilir.[57] Analitik amaçlar için önemli spektral bölgelerin dalga boyu ve dalga sayısı aralıklarını gösteren diyagram Şekil 2.3'de verildi.

2.3.1. Işının Absorplanması

Çeşitli dalga boylarında ışın içeren bir demet, saydam ve şeffaf bir ortamdan geçirilirse, içinden bazı dalga boylarının kaybolduğu görülür. Buna ışının absorplanması denir. Absorpsiyonla ışın enerjisi, maddenin iyon, atom, moleküllerine aktarılır. Böylece ışın enerjisini absorplamış olan iyon, atom veya moleküller uyarılmış hale geçerler. Uyarılmış bir atom veya molekül 10^{-8} saniye kadar yaşayabilir. Sonra absorpladığı ışın enerjisini geri vererek tekrar eski haline veya temel haline döner. Madde tarafından absorplanan ışın enerjisinin geri verilmesi, genellikle ısı şeklinde olur ve madde az çok ısınır. Bazı maddelerde ise absorplanan ışın enerjisi daha uzun dalga boylu ışınlar halinde yayınlanır. Buna fotolüminesans olayı denir. Bu olayın çok kısa süreli olanına floresans, daha uzun süreli olanına fosforesans adı verilir.[58]

Bir maddenin temel haliyle uyarılmış halleri arasındaki enerji farkları, başka bir maddeninkinden farklı olduğundan, her maddenin kendine özgü bir absorpsiyon spektrumu vardır. Absorpsiyon spektrumları genel olarak iki kısma ayrılır.[59]

1. Atomik Absorpsiyon Spektrumları
2. Moleküler Absorpsiyon Spektrumları



Şekil 2.3. Elektromanyetik ışınların sistematik olarak tanımlanması

2.3.2. Atomik Absorpsiyon Spektrumları

Polikromatik UV-Görünür Bölge ışını civa veya sodyum gazı gibi tek atomlu bir ortamdan geçirilirse demetten bazı ışınların kaybolduğu görülür. Sodyum buharından ışın geçirildiğinde sarı ışının kaybolduğu görülür. Sarı ışının sodyum atomları tarafından adsorplanması, sodyum atomlarında 3s enerji seviyesinde bulunan bir elektronun sarı ışını absorplayarak 3p enerji seviyesine çıkmasıyla açıklanabilir.[58,59]

Atomlarda, en dış tabaka elektronları UV-görünür bölge ışınlarla uyarıldıkları halde, iç tabaka elektronları uyarılamaz. İç tabaka elektronlarını uyarabilmek için X-ışınları kullanılır. X-ışınları görünür bölge ışınlarından daha fazla enerjilidirler.[58,59]

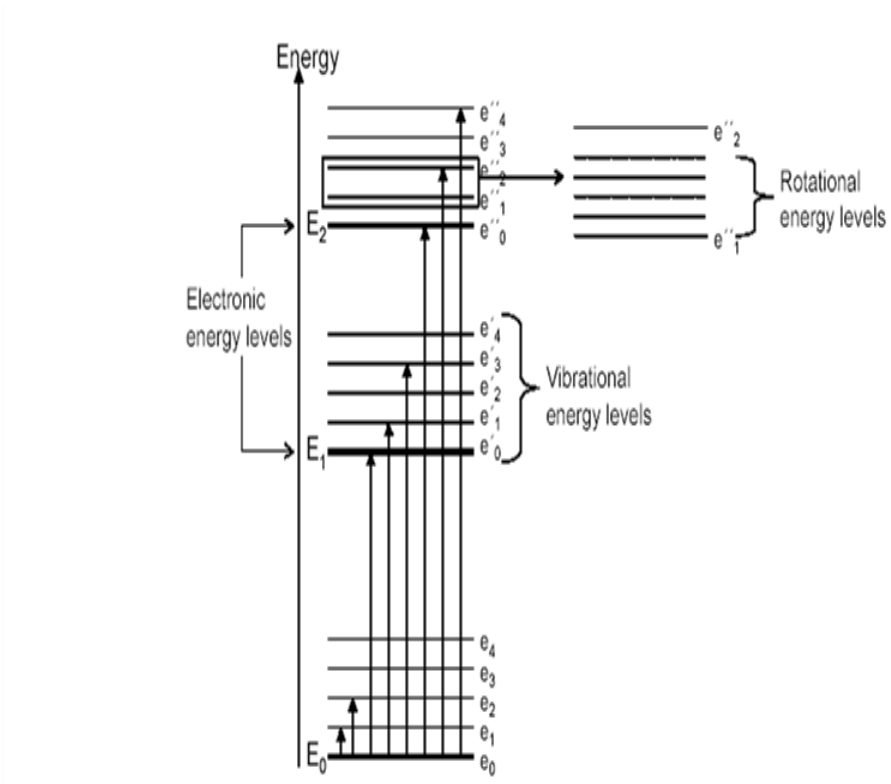
Atomların en dış tabaka elektronlarının uyarılması üzerine kurulmuş olan spektroskopi dalına atomik absorpsiyon, en iç tabaka elektronlarının uyarılması üzerine kurulmuş olan spektroskopi dalına da X-ışınları spektroskopisi denir.[58,59]

2.3.3. Moleküler Absorpsiyon Spektroskopisi

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

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

dir. Elektronik geçiş enerjisi; molekülün çeşitli dış orbitallerindeki elektronlarla ilişkin enerji, titreşim enerjisi; atomlar arası titreşimlere ilişkin enerji, dönme enerjisi ise molekül ağırlık merkezi etrafında dönmesine ilişkin enerjidir.[56,57] Titreşim ve dönme geçişleri çok atomlu moleküller için geçerlidir (Şekil 2.4).

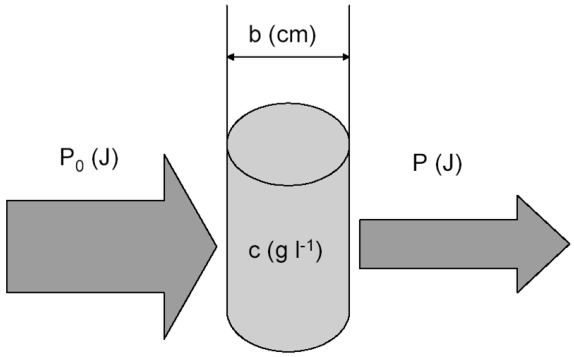


Şekil 2.4. Bir molekül için elektronik, titreşimsel, rotasyonal enerji seviyelerini gösteren enerji diyagramı

Elektronik geçişler dalga boyları 200-800 nm arasında olan UV ve görünür alan ışınlarıyla gerçekleşir.

Moleküler absorpsiyon spektroskopisinin, atomik absorpsiyon spektroskopisinden ayrılan en önemli yanı; atomik absorpsiyon spektroskopisinde birbirinden farklı dalga boylarında keskin çizgiler meydana gelmesine karşılık, moleküler absorpsiyon spektroskopisinde, birçok dalga boylarını içine alan geniş absorpsiyon bantlarının meydana gelmesidir. Bir molekülün UV-Görünür Bölge Absorpsiyon spektrumu, molekülün bağ elektronlarından birinin bir foton enerjisini absorplayarak bir üst elektronik seviyeye geçmesi şeklinde açıklanabilir.

Bir maddenin çözeltisinden polikromatik bir ışın demeti geçirildiğinde, demette bulunan bazı ışınlar madde tarafından absorplanır ve ışın demeti çözeltiden şiddetinden bir miktar kaybederek çıkar (Şekil 2.5).[56,59]



Şekil 2.5. Absorblayan bir çözeltiye giren P0 şiddetindeki ışın demetinin P şiddetine düşmüş olarak çıkması

Çözeltiye P_0 şiddetinde giren ışın çözeltiyi P şiddetinde terk eder. Fotonlarla ışın absorblayan atom veya moleküller arasındaki etkileşimin sonucu olarak ışının gücü P_0'dan

P'ye düşmüş olur. Buna göre ışın demetinin ortamdan geçme oranına geçirgenlik (*T*) adı verilir.[59]

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

Şeklinde gösterilir.

Geçirgenliğin eksi logaritması absorbans (A) olarak adlandırılır ve absorbans

$$A = -\log_{10} T = -\log \frac{P}{P_0}$$

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

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

Bir çözeltinin absorbansı, ışının çözelti içinde aldığı yolla (b) ve çözeltide absorpsiyon yapan taneciklerin derişimiyle (c) doğru orantılıdır. Bu ilişki Lambert-Beer kanunu olarak adlandırılır:

$A = \varepsilon.b.c$

şeklinde verilir ve burada ε *molar absorptivite katsayısı* olarak adlandırılır.

Lambert Beer Kanunu aşağıdaki denklem ile de ifade edilebilir.[56,59]

$P = P_0 . 10^{-\varepsilon.b.c}$

2.3.4. Lambert-Beer Kanunundan Sapmalar

Lambert-Beer kanunu sadece çok seyreltik çözeltilere uygulanabilen bir kanundur. Bunun nedeni yüklü taneciklerin birbirinin yük dağılımını etkilemeleri veya değiştirmeleridir. Yük dağılımı değişen bir taneciğin absorplama kabiliyeti çok değişir. Bu da derişimle absorbans arasındaki lineer bağıntının bozulmasına neden olur. Absorplayan maddenin derişimi düşük olabilir fakat yanında bulunan maddelerin derişimi yüksek olursa yine sapma gözlenebilir. Kanundan sapmalar ortamda yüklü tanecikler bulunduğu zaman daha da büyük olur. Sapmalar; [56,59]

1- Cihazdan gelen sapmalar

2- Kimyasal maddelerden gelen sapmalar

3- Analizci hatasından gelen sapmalar

şeklinde üçe ayrılabilir.

2.3.5. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektrofotometreleri

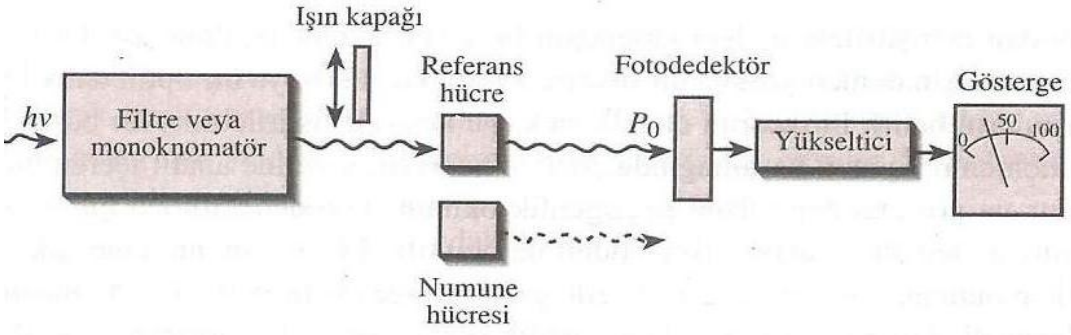
Spektrofotometre, elektromanyetik ışının dalga boyunun bir fonksiyonu olarak numunenin absorbans ya da geçirgenliğini ölçmek için kullanılan bir cihazdır. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon spektrofotometreleri, 110 nm' den 1000 nm arasında değişen dalga boylarında çalışırlar. Ancak 110 nm ile 200 nm dalga boyu aralığında çalışan cihazlar vakum tertibatlı ve oldukça pahalı cihazlardır. Bundan dolayı laboratuvarlarda kullanılan spektrofotometri cihazları 200 nm ile 800 nm dalga boyu aralığında çalışmaktadırlar. Spektrofotometrelerde elektromanyetik ışın kaynağı olarak döteryum ve tungsten olmak üzere iki lamba kullanılmaktadır. 160-400 nm aralığında ışın üretmek için döteryum lambası, 350-2500 nm arasında ışın üretmek için tungsten lambası kullanılmaktadır.[56-58] UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektrofotometreleri yapılarına göre iki kısma ayrılır;

1- Tek ışınlı spektrofotometreler

2- Çift ışınlı spektrofotometreler

2.3.6. Tek Işınlı Spektrofotometreler

Absorpsiyon ve % geçirgenlik ölçümlerinde kullanılan basit, ucuz ve bakım kolaylığı olan bir cihazdır. Tek ışınlı spektrofotometreler aşağıda gösterildiği gibi ışın kaynağı, dalga boyu seçici, filtre veya monokramatör, ışın yoluna konacak eşlenik iki hücre, dedektör, yükseltici ve bir gösterge aletinden oluşur. Absorpsiyon ve % geçirgenlik okumak için önce numune bölmesine referans madde konularak alet ve referans hücreye göre cihaz sıfırlanır. Daha sonra numune hücresi konur ve ölçüm yapılır (Şekil 2.6).[56]

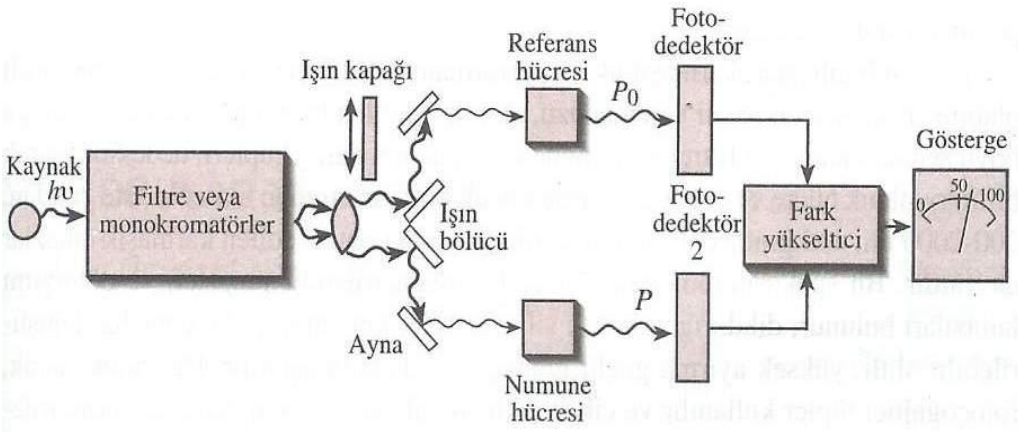


Şekil 2.6. Tek ışınlı Spektrofotometre cihazının şematik gösterimi

2.3.7. Çift Işınlı Spektrofotometreler

Modern spektrofotometrelerin pek çoğu çift ışınlı tasarıma sahiptir. Bu cihazlar tek ışınlı cihazlara göre hem optik hem de elektronik yönden daha karmaşıktırlar. Çift ışınlı spektrofotometreler 190-800 nm aralığında çalışmak üzere tasarlanmışlardır. Cihaz sıra ile devreye giren tungsten ve döteryum lambaları, yansıtmalı granting monokromatörü ve bir fotoçoğaltıcı dedektörü ile donatılmıştır. Çift ışınlı cihazlar, ışık kaynağındaki bütün dalgalanmaları giderebilme, kaçak ışınları ve saçılan ışınlardan gelen sapmaları minimize

etme ve yükselticideki voltaj değişikliklerinden fazla etkilenmeme gibi üstün özelliklere sahiptirler (Şekil 2.7). Günümüz modern optoelektronik teknolojisinin ürünlerinden olan çok kanallı veya diod serili spektrofotometreler kullanılmaktadır. Bu cihazlar, çok kısa zamanda bütün UV ve Görünür Bölge Absorpsiyon spektrumunun kaydını mümkün kılar.[56]



Şekil 2.7. Çift ışınlı spektrofotometre cihazının şematik gösterimi

2.3.8. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektrofotometre Cihazının Kullanım Amaçları

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

2.3.9. Kalitatif Analiz ve Molekül Yapısını Aydınlatma

Bilinmeyen bir madde saflaştırıldıktan sonra UV spektrumu alınır. Bu spektrum, her yönüyle aynı şekilde daha önce alınmış olan spektrumlarla karşılaştırılır. Bilinmeyen maddenin spektrumu daha önceki madde spektrumlarından hangisine uyuyorsa, bilinmeyen madde o maddedir. Bundan başka maddelerin saflık kontrolünde de kullanılmaktadır. Numunenin alınan spektrumunda beklenmedik pikler görünüyorsa bu o maddenin saf

olmadığını gösterir. Ayrıca, kromofor grupların kalitatif tayininde ve organik moleküllerin yapılarının aydınlatılmasında da UV spektroskopi yöntemi kullanılmaktadır. Yapı aydınlatılmasında, 200-400 nm aralığında bir veya daha çok pik gözleniyorsa bu, molekülde doymamış grupların veya kükürt, halojen gibi hetero atomların varlığını gösterir. Çoğu zaman, analitin spektrumu, çok sayıda kromofor grup içeren ve yapısı bilinen başka bir molekülün spektrumu ile karşılaştırılarak, analitteki fonksiyonel grup hakkında bir fikir edinilebilir. Fakat genel bir kural olarak, analitin kesin yapısını anlamak için yeterli ayrıntılı bilgileri, UV spektrumlarında bulamayız. Bu yüzden, UV spektrumlarından elde edilen kalitatif veriler, NMR, MS gibi başka fiziksel ve kimyasal verilerle desteklenmeli mümkünse çözünürlük, erime noktası ve kaynama noktası gibi bilgilerle birleştirilmelidir.[56-58]

Kalitatif analiz amaçlı UV spektrumları genelde analitin seyreltik çözeltileri kullanılarak elde edilir. Fakat uçucu bileşiklerin gaz halindeki spektrumları alınabilirse, daha ayrıntılı ve dolayısıyla daha yararlı spektrumlar ele geçer. UV-Görünür Bölge Spektroskopisinde kullanılacak çözücünün bu bölgedeki ışınlar için geçirgen olması ve numuneyi, belirgin pikler verebilecek derişimlerde çözmesi gerekir. Ayrıca çözücü ile absorpsiyon yapan tür arasındaki mümkün etkileşmeleri de hesaba katmak gerekir. Örneğin, su, alkol, ester ve keton gibi polar çözücüler, spektrumdaki titreşim ayrıntılarını örtme etkisi gösterirler. Polar çözücüler, hem spektrumun titreşimlerinden ileri gelen küçük piklerin kaybolmasına, hem de absorpsiyon bantlarının ve dolayısıyla piklerin esas yerlerinden kaymasına neden olurlar.[56-58]

2.3.10. Kantitatif Analiz

UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopisi, kimyacıların kantitatif analizlerde en çok faydalandıkları yöntemlerden biridir. Kantitatif analizde, ilk önce analizi yapılacak maddenin en iyi absorbans yaptığı dalga boyu bulunur ve bu dalga boyunda spektrumu alınır.

Belirlenen dalga boyu sabit tutularak, artan derişimlerde hazırlanan çözeltilerin absorbansları okunur. Derişime karşı absorbans grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edilir. Sonra bilinmeyen maddenin derişimi kalibrasyon eğrisi yardımıyla bulunur ve ayrıca seçilen dalga boyu sabit tutularak absorbtivite katsayısı da belirlenmeye çalışılır.

2.4. Türev Absorpsiyon Spektrofotometrisi Yöntemi

Türev Absorpsiyon Spektrofotometresi, türev spektrumlarının kullanılması esasına dayalı bir analiz yöntemidir. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopisi çalışmalarından çok daha geniş bir uygulama alanı bulmuştur. Bunun nedeni UV-Görünür Bölge Absorpsiyon spektrumlarında üst üste binen, çakışan bantlar daha çok görünür ve ayırım gücü zayıftır. Bunun yanında sinyal /gürültü (S/G) oranı da düşüktür. Türev uygulamaları bu sorunlara belli oranlarda çözüm getirmiş ve karakteristik pikleri az olan ve çözümlenmemiş bantları içeren spektrumların ayırım gücünü artırmıştır.

Türev tekniği orijinal spektrumun eğimleri hakkında bilgi vererek bunun omuz noktaları ile dönüm noktalarının daha belirgin hale gelmesine neden olur. Böylece bir bileşik daha kolay ve daha kesin olarak tanımlanabilir. Orijinal spektrumlarda üst üste binen çakışan bantlar varsa, bu spektrumların bantları alınarak bantların belli oranda birbirinden ayrılması sağlanır. Bu yöntemle karışımların analizleri de yapılabilmektedir. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi yönteminde bulanık çözeltiler ile çalışırken çökme hızı tanecik büyüklüğü gibi etkenlere bağlı olarak büyük oranda hata yapılırken türev alınarak bulanıklığın oluşturduğu bu etki ortadan kaldırılabilir. Bu yöntemin dezavantajı ise; yüksek türev derecelerinde S/G oranın bozulması, pik şekillerinde bozulma ve dönüm noktası kaymasıdır. Bu nedenle uygulanacak türevin derecesi iyi seçilmelidir.[60]

2.5. Kromatografi

Kromatografi, diğer yöntemlerle ayrılmayan ve yapı olarak birbirine benzeyen bileşenleri ayırmakta kullanılan bir yöntemdir. Çeşitli maddelerin hareketli faz yardımıyla sabit faz üzerinde değişik hızlarda hareket etmeleri veya sürüklenmeleri esasına dayanır. Sabit faz tarafından bağıl olarak kuvvetle alıkonulan bileşenler hareketli fazla yavaş ilerlerken zayıf alıkonulanlar hızlı ilerleyecektir. Bu şekilde karışımı oluşturan bileşenler birbirinden ayrılarak nitel ve nicel analizleri mümkün olacaktır.[61]

Sıvı kromatografisi düzlemsel yüzeylere ve kolonlara uygulanabilen bir kromatografi türüdür. Sıvı kromatografisi normal-faz sıvı ve ters-faz sıvı olmak üzere iki farklı teknikle uygulanabilir. Normal-faz sıvı kromatografisinde sabit faz hareketli faza göre daha polarken, ters faz sıvı kromatografisinde hareketli faz polar, sabit faz ise apolardır.[61]

2.5.1. Kromatografinin sınıflandırılması:

Kromatografi ayrılma mekanizmasına göre dörde ayrılır.

2.5.1.a. Adsorbsiyon Kromatografisi

Adsorpsiyon, bir karışımda bulunan gaz veya buhar halindeki çözünmüş maddelerin katı faz üzerinde tutunmasıdır. Adsorbsiyon kramotografisi ise örnek bileşenlerinin dolgu maddesinin yüzeyinde farklı güçlerde tutunmaları sonucu meydana gelen bir ayırma işlemidir. Bir çözeltideki maddeler sabit faz üzerinde adsorbe olabildikleri gibi hareketli fazada desorbe olmaktadırlar. Denge durumunda adsorbsiyon ve desorpsiyon hızları eşittir. Adsorbsiyon kromarografisi ile örneğin izomerler, hormonlar ve antibiyotikler kolayca ayrılabilir.[62]

2.5.1.b. Dağılma (Partisyon) Kromatografisi

Bir faz sistemi (birbirleri ile karışmayan iki sıvı karışımı) içine konulan madde bu sıvılardaki çözünürlüğüne bağlı olarak iki faz arasında dağılır ve dengeye ulaşır. Böyle bir

sistemde maddenin iki faz arasındaki dağılımı sabit olup buda dağılım (partisyon) katsayısı ile ifade edilir.[61-64]

$Kd=C_1/C_2$ C_1=Maddenin 1. fazdaki derişimi

C_2=Maddenin 2. fazdaki derişimi

Dağılma kromatografisinde, maddeler birbiriyle karışmayan sıvı sabit faz ve hareketli faz arasında dağılıma uğrar. Sıvı sabit faz olarak genelde su, bazen de organik çözücüler kullanılabilir. Sabit faz taşıyıcısı olarak kağıt, sellüloz, silikajel, diatome toprağı, alüminyum oksit gibi su veya organik çözücüler emdirilerek sıvı sabit faz oluşturulur. Hareketli faz olarak tek veya karışım halindeki çözücüler kullanılır. En uygun hareketli faz çeşitli çözücü sistemleri denenerek bulunur. Dağılma kromatografisinin ayırma gücü, adsorpsiyon kromatografisinden fazladır. Bu yöntemle örneğin aminoasitler, asitler, şeker türevleri ve alkoller gibi yapıları birbirine çok yakın maddeler ayrılabilir.[65]

Adsorpsiyon kromatografisinde, maddeler katı olan sabit faz ile sıvı olan hareketli faz arasında etkileşir. Dağılma kromatografisinde ise; maddeler sıvı olan sabit faz ile sıvı olan hareketli faz arasında dağılır. Adsorban destek materyali olarak kullanılıp üzerine sıvı faz emdirilir ve madde bu sıvı sabit faz ile hareketli faz arasında dağılıma uğrar.[65-67]

2.5.1.c. İyon Değişim Kromatografisi

Maddelerin iyonik grupları ile iyon değiştiricilerdeki iyonik grupların karşılıklı yer değiştirme esasına dayanır.[67]

2.5.1.d. Eleme (Jel Filtrasyon, Jel Geçirgenlik) Kromatografisi

Karışımdaki maddelerin molekül büyüklüklerine göre ayrılması esasına dayanır.[67]

2.5.2. Kromatografik Ayırım

Kromatografik ayırımda, maddeler karışmayan iki faz arasında dağılırlar. Fazlardan biri hareketli faz, diğeri sabit fazdır. Kolon olarak adlandırılan dar bir tüp içine doldurulmuş, birbirine yakın, gözenekli partiküller sabit faz olarak adlandırılır. Hareketli faz ise bu partiküller arasındaki boşluğu doldurur. Hareketli faz kolon boyunca maddeleri sürükler. Kolondan çıkan her maddenin derişim profili pik olarak adlandırılır, piklerin oluşturduğu tabloya da kromatogram adı verilir.[61–67]

2.5.3. Bir Kromatografik Ayırımın Amaçları

Bir kromatografik ayırımın kalitatif analiz, kantitatif analiz ve preparatif ayırım olmak üzere üç temel amacı vardır.[68–70]

2.5.3.a. Kalitatif Analiz

Maddelerin bilinen alıkonma zamanları ile karşılaştırma yapılır. Bununla birlikte sadece HPLC ile gerçekleştirilen kalitatif analiz maddenin kimlik tayini için tek başına yeterli değildir, spektroskopik veya diğer yöntemlerle desteklenmesi gerekir. [68-70]

2.5.3.b. Kantitatif Analiz

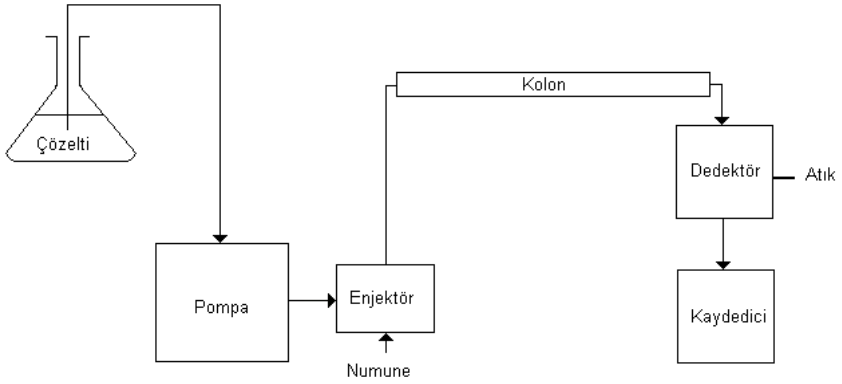
Kromatografinin en yaygın kullanım alanı kantitatif analizdir. Kromatografik pik altındaki alan mevcut madde miktarına karşılık gelir. Pik alanları genellikle bir elektronik integratör veya bilgisayar data sistemi ile ölçülür.[60,68,70]

2.5.3.c. Preparatif Analiz

Preparatif ayırma, büyük miktardaki numunelerin ayırma ve saflaştırma işlemlerinde kullanılır. Analitik çalışmalarda mikrogram mertebesindeki numuneler ayrılırken, preparatif çalışmalarda miligram, hatta gram mertebesindeki madde miktarları ayrılabilir.[60,68,70]

2.5.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Günümüzde kromatografik teknikler, çok sayıda kompleks yapıya sahip bileşenleri (gıda, ilaç vb.) kalitatif ve kantitatif olarak katkı, kalıntı ve kontaminasyonlarının tespitinde kullanılmaktadır. Hareketli fazın sıvı olduğu ve basınç yardımıyla kolona gönderildiği sistemlere yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) denir. HPLC cihazının kısımları enjektör, pompa, dedektör, kolon ve kaydediciden oluşur ve Şekil 2.10'da gösterilmiştir.[60]



Şekil 2.8. HPLC Cihazı Kısımlarının Şematik Gösterimi

2.5.4.a. Enjeksiyon Üniteleri

a) Manuel Enjeksiyon Valfleri

Enjeksiyon valfleri yüksek basınçlı bir ortama numune aktarmak amacıyla kullanılan sistemlerdir. Enjeksiyon valfinin numune yükleme ve enjeksiyon olmak üzere iki konumu vardır. Yükleme konumunda loop basınçlı ortamdan izole edilir. Enjeksiyon konumunda loop tekrar yüksek basınçlı ortama dönerek numuneyi sisteme aktarır.[60]

b) Basit Otomatik Enjektörleri

Basit otomatik enjektörlerde, manuel enjeksiyon valfine benzer bir valf kullanılır. Bu sistemde örnek şişesine azot basıncı uygulayarak loop doldurulur ve valfin dönmesi ile örnek enjekte edilir.[60]

c) Programlanabilen Otosamplır

Programlanabilen otosamplırlar örnek loopuna doldurmak için hassas motor ile hareket ettirilen şırınga kullanırlar. Enjektörle çekilen hacim kontrol edilerek istenilen miktarda örnek loopa doldurulur.[68]

Avantajları: Loop'un kısmi doldurulması ile küçük miktardaki örnek enjeksiyonları gerçekleştirilmekte ve örnek kayıpları minimum olmaktadır. Bu tip otosamplırlarda 10 μL'lik toplam örnek hacminden 2 μL gibi küçük miktar enjekte edebilirler. Ayrıca istenilen örnek şişesinden, istenilen sayıda enjeksiyon yapmak mümkündür. Programlanabilen otosamplırların dezavantajı başlangıçtaki yüksek maliyetidir.[68]

2.5.4.b. Pompalar

Hareketli fazın kolon boyunca akışını sağlamak için kullanılırlar. Akışın sabit ve deneylerin tekrarlanabilir olması için hareketli fazın pompalanma hızı sabit olmalıdır. Pompalar iki tiptir.[68,71]

a) **Sabit Basınç Pompaları:** İlk geliştirilen pompalardır. Hareketli faz bir haznede bulunur ve bu hazne azot gibi eylemsiz bir gaz yardımıyla basınç altında tutulur, bu basınç hareketli fazın akışını sağlar.[71]

b) **Sabit Hacim Pompaları.** Basıncı motor sağlar. Herhangi bir nedenle sistemin geçirgenliği bozulursa veya çözücünün viskozitesi değişirse oluşan iç basınç değişikliği motorla sağlanan basınç değişikliği ile kapatılır. Özellikle gradient elüsyonlarda bu tip pompalar kullanılır.[68,71]

2.5.4.c. Dedektörler

Işık enerjisini elektrik enerjisine dönüştüren cihazlara dedektör denir. Dedektör seçimi örneğin kimyasal yapısına ve kullanılan yöntemin gereksinimlerine bağlıdır. HPLC'de UV, fluoresans, rekraktif indeks, elektrokimyasal ve kütle dedektörleri kullanılmaktadır.[72]

a- UV Dedektörler: Çoğu ilaç analizinde kullanılan UV dedektörler, maddenin ışığı absorplayıp absorplamadığını anlamak için ışık kaynağından gelen ışığın şiddetinin ölçülmesi amacıyla kullanılan 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.[72]

Değişken dalga boylu dedektörler: 108-400 nm arasında sürekli ışık verebilen döteryum lamba ya da 400-800 nm arasında ışık veren bir tugsten lambaya sahip ve 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 kullanışlıdır.[72]

b. Diyod Array Dedektörler: Değişken dalga boylu UV esaslı dedektörleridir. Hem sabit hem de taramalı dalga boylarında incelemeye müsait olan dedektörlerdir. Diyod array dedektörler seçimlilik ve hassasiyet açısından değişken dalga boylu UV dedektör ile aynı avantajlara sahiptir.[72] Buna ek olarak;

1. Aynı anda spektrumun bütün dalga boylarında piklerin ölçümü yapılabilir.

2. Çok hızlı spektrum taraması yapılabilir ve istenilen pikin üç boyutlu kromatogramı alınabilir.

3. Birden fazla dalga boyunda kromatogramdaki piklerin UV spektrumları alınabilir.

4. Spektrumların çakıştırılması yöntemi ile pik saflığının tespiti yapılabilir.

c. Floresans Dedektörler: Bu dedektörde floresans, uyarıcı ışına 90 derecede yerleştirilmiş bir fotoelektrik dedektör yardımıyla gözlenmektedir. Basit dedektörlerde, uyarıcı ışık kaynağı olarak civa lambası ve yayılan ışınların belli bir bandını izole etmek için birkaç filtre kullanılır. Daha gelişmiş cihazlarda kaynak olarak ksenon lambası ve floresans ışımasını izole etmek için optik ağ monokromatör kullanılır. Floresans özellik gösteren ya da floresans hale getirilebilen numunelerin ayrılması ve analizinde kullanılan bir yöntemdir. Floresans özelliğe sahip ilaçlar, doğal ürünler, klinik numuneler ve petrol ürünleri gibi maddelerin analizinde oldukça fazla tercih edilen yöntemlerdendir.[72,73]

2.5.4.d. Kolon

Dolgu maddesini yani sabit fazı taşıyan kolonlar genellikle paslanmaz çeliktir. 2-5 mm çapında ve 10-100 cm boyunda olabilir. Dolgu maddesi taneciklerinin çapı 5-10 μm ile 35-125 μm arasında değişir ve sistemin performansını büyük ölçüde belirleyen niteliktir. Tanecik çapı 2-3 μm olan kolonlarda geliştirilmiştir. Analitik amaçla kullanılan dolgu maddesinde kütle aktarımı daha hızlı, etkinlik daha yüksek, kolonun yeniden dengelenmesi ise çok hızlıdır. Kolonların ömrü kullanıma göre değişir. Kolonun ömrünü uzatmak için ön kolon kullanılabilir.[73]

HPLC ile ilaç analizi yapabilmek için yaygın olarak dağılım kromatografisi uygulanır. Bu sıvı-sıvı kromatografi türünde uygun bir analiz yapabilmek için maddenin belli bir çözücüde çözünmüş olması gerekir. Maddenin apolar veya polar olmasına göre maddenin polaritesine yakın bir sabit faz seçilir. Örneği oluşturan bileşenlerin iyi ayrılabilmesi için sabit faz ile hareketli faz polaritesi farklı olmalıdır. Silika, alümina gibi katılar sahip oldukları –OH

grupları nedeniyle polar bileşenlerdir ve normal-faz sıvı kromatografisinde kullanılır. -OH grubu yerine $-C_{18}H_{35}$ gibi bir hidrokarbon bağlanırsa katı yüzey apolar özellik kazanır ve ters-faz sıvı kromatografisinde kullanılır.[72,73]

Dağılım kromatografisinde sistemin ayırım gücü, sabit faz, hareketli faz ve maddenin polaritesine bağlı olarak değişir. Ters-faz sıvı ve normal-faz sıvı kromatografisinde madde polaritesinin sabit faz polaritesine yakınlığına göre kolonda alıkonulur ve hareketli faz polaritesine yakın olan maddeler kolonu önce terk eder. Ayırabildikleri maksimum madde miktarına göre kolonlar üç farklı tipte sınıflandırılabilir (Tablo 2.1).[72,73]

Tablo 2.1. Ayırabildikleri maksimum madde miktarına göre kolonlar

Kolon tipi	Çapı (mm)	Uzunluk (cm)	Örnek miktarı (mg)	Akış hızı (mL/dak)
Mikrobor Analitik	1–2	7–30	0,01	0,1
Standart Analitik	3–5	7–30	0,1	1,0
Preparatif	5–20	25–50	10	10

2.5.4.e. Hareketli Faz

HPLC sisteminde kullanılabilecek sabit faz türü seçilebilecek hareketli faz bileşimine göre daha sınırlıdır. Ayrıca hareketli fazın bileşimi alıkonmayı ve seçiciliği en çok etkileyen faktörler aşağıda verilmiştir.[74–77]

a. Ayırımı etkileyen çözücü özellikleri: Elüsyon gücü ve seçiciliktir.

b. İşletime bağlı özellikler: Viskozite, bastırılabilirlik, dedektörle geçimlilik, kolon ile geçimlilik, numuneyle etkileşmeler, saflık ve içinde çözünmüş gaz oranı

Hareketli fazın cihaza verilmeden önce süzülmesi gerekir. Süzme işlemi için 0.45–0.60 μm çapında membran veya teflon filtreler kullanılır. Teflon filtrenin sakıncası pahalı olması ve organik çözücüyü süzmeden önce bir miktar su ile ıslatmanın gerekmesidir. Vakumda gerçekleştirilen süzme işlemi hareketli fazda çözünmüş gazların kısmen uzaklaştırılmasını da sağlar. Bütün çözücüler az çok oksijen taşır ve hava kabarcığı oluşumuna neden olur. Bu durum, pompada düzensiz hareketlere ve zemin bozukluklarına, dedektörde girişimlere ve yanlış okumalara neden olur. Çözücüdeki hava kabarcığını yok etmek için ultrasonikatörde bekletme, vakumla gazların arındırılması ve çözücüden inert gaz (He, Ne) geçirme işlemleri uygulanır.[74,75]

Hareketli faz sulu ve/veya tamponlu ise kimyasal bozunmanın yanı sıra mikrobiyolojik üreme sonucunda kolonu tıkayabilir. Bu nedenle, HPLC analizleri sırasında taze hazırlanmış hareketli faz kullanılır.

2.5.5. HPLC'de KullanılanTemel Parametreler

2.5.5.a. Alıkonma Zamanı ve Kapasite Faktörü

Numunenin enjeksiyonundan sonra dedektöre ulaşması için geçen süreye alıkonma zamanı denir. Alıkonma zamanı (t_R) terimi yerine alıkonma hacmi (V_r) de kullanılır (Şekil 2.11). Bir maddenin alıkonma hacmi bir bileşenin sabit fazdan elue olması için gerekli olan hareketli faz hacmi olup alıkonma zamanı ve hacimsel akış hızı (F)'ndan hesaplanır.[72-77]

$$V_r=t_R.F$$

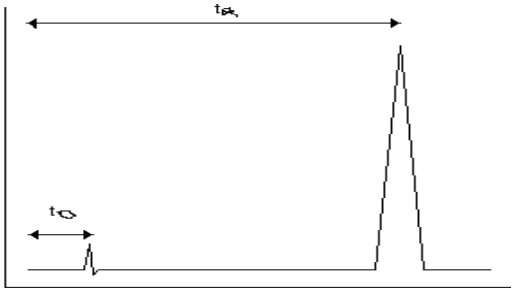
Alıkonma hacmi temel kromatografik parametre olan dağılım katsayısı (K) ile aşağıdaki eşitlik gereği doğrudan ilişkilidir[67].

$$V_r=V_m+K.V_s$$

Bu eşitlikte V_M kolondaki hareketli faz hacmi; V_s kolondaki sabit faz hacmidir. Dağılım katsayısı(K) ise;

K=sabit fazdaki madde derişimi/hareketli fazdaki madde derişimi olarak tanımlanır. Kolonda hiç tutulmayan bir türün dedektöre varışı arasında geçen zamana ölü zaman (t_o) denir.

Kapasite faktörü ($k^{'}$), önemli bir deneysel parametre olup, çözünen maddelerin kolonda göç hızlarını tanımlamakta yaygın olarak kullanılır. Kapasite faktörü olarak bilinen bu kavram Eşitlik II.5'de verilmiştir.[72-77]



Şekil 2.9. Çözünen maddelerin kolonda göç hızları

$$k^{'}=(t_R-t_0)/t_0$$

Kapasite faktörü, hareketli fazın kompozisyonu ile kontrol edilir. Kapasite faktörü her maddenin kendine özgüdür ve bir karışımı oluşturan bileşikleri seçici olarak ayıran kromatografik sistemin seçiminde göz önünde tutulan en önemli parametredir. Uygun bir hareketli faz-sabit faz çifti seçildiğinde belirli bir karışımdaki her bir bileşen için farklı kapasite faktörü değerleri elde edilir ve bu değerler ayrılan maddelerin nitel tayini için kullanılır.[74-77]

2.5.5.b. Seçicilik

Kapasite faktörü oranı seçicilik veya ayırım faktörü olarak adlandırılır. Bir kolondaki iki analit için seçicilik katsayısı, bu kolonun söz konusu iki maddeyi ne kadar iyi ayıracağının bir ölçüsüdür ve aşağıdaki eşitlikle verilir.[76,77]

$$\alpha=k_2/k_1$$

k_1 kısa alıkonma zamanlı maddenin, k_2 ise daha uzun alıkonma zamanlı maddenin kapasite faktörü olarak tanımlanır. Seçicilik, esas olarak sabit faz özelliklerine bağlıdır ancak; hareketli faz bileşimi de seçiciliği etkiler.

2.5.5.c. Kolon Etkinliği

Başarılı bir kromatografinin asıl amacı verimli bir ayırım ve dar bir kromatografik bant elde etmektir. Kolon etkinliğinin ölçüsü kolonun kuramsal tabaka sayısı (N)'dir ve aşağıdaki eşitlikte verilir.[74-77]

$$N=16.(t_R/W)^2$$

Bu eşitlikte W, baseline bant genişliği t_R, alıkonma zamanıdır.

2.5.5.d. Kolonun Ayırma Gücü

Kolonun ayırma gücü (rezolüsyon, R_s) değeri, kolonun iki analiti ayırma gücünün kantitatif ölçütüdür. Rezolusyon genel olarak aşağıdaki eşitlikle verilmektedir[70–72].

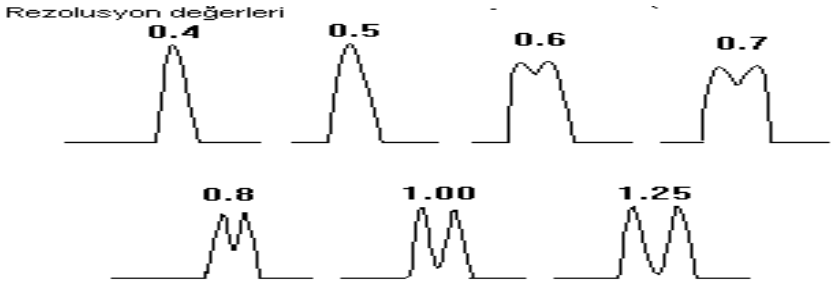
$$R=2.(t_{R2}-t_{R1})/W_1+W_2$$

Rezolusyon (R); kapasite faktörü ($k^{'}$), seçicilik (α) ve kolon etkinliği (N) terimleriyle ilişkisi aşağıdaki eşitlikle ifade edilebilir.

$$R=1/4\sqrt{}\ N.(\ \alpha-1/\alpha\ )/.k/(k+1)$$

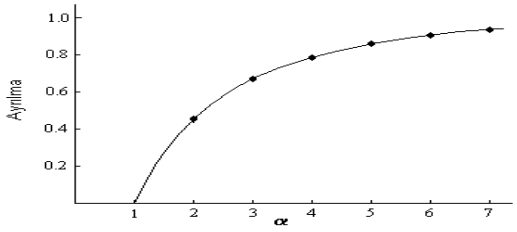
Verimlilik Seçicilik Kapasite

Kromatografik ayırımın başarı ile gerçekleşmesi için $\alpha>1$ olmalıdır.$\alpha=1$ olduğunda iki bileşik ayrılamaz (Şekil 2.12.).



Şekil 2.10. Kromatografik ayırımın başarı ile gerçekleşmesi

Genel olarak seçicilik arttıkça ayrılmanın da artması beklenir. Fakat belli bir seçicilik değerinden sonra toplam ayırıcılıkta gerçek bir iyileşme olmadan farklı alıkonma sürelerine sahip madde pikleri elde edilir. Seçicilik dışında kalan terimler sabit kabul edilerek seçiciliğe karşı ayırıcılık grafiğe işaretlendiğinde bu davranış açıkça görülmektedir (Şekil. 2.13).[70-72]

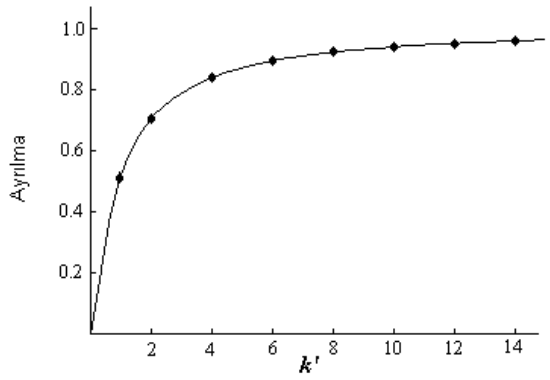


Şekil 2.11. Ayrılmanın seçicilikle değişimi

Kapasite faktörünün ayrılma üzerine etkisi bu kavramdan türetilmiş olan seçiciliğin etkisine benzer. Kapasite faktörü dışındaki bütün terimler sabit kabul edildiğinde kapasite

faktörünün toplam ayrılmaya etkisi Şekil 2.14'de görülmektedir. $k'=0$ olduğunda herhangi bir ayırma işlemi gerçekleşmez.[70-72]

Ayrıca k^1 değeri arttıkça k^1/k^1+1 değeri bire yaklaşır ve kapasite faktöründeki artışın toplam ayrılmaya etkisi kalmaz. Kapasite faktörü için en uygun değerler 1 ile 10 arasındadır ve daha çok hareketli faz özelliklerine göre değişir.[70-72]



Şekil 2.12. Ayrılmanın kapasite faktörü ile değişimi

Kromatografide ayrılma kolon etkinliğinin kareköküyle doğrusal olarak değişir. Kolon etkinliği ise kolon boyuyla doğru orantılıdır.

2.5.5.e. Hareketli Faz Bileşiminin Ayırıma Etkisi

Sıvı kromatografide iyi bir ayırım için uygun çözücü çifti seçilerek ayrılan maddenin kapasite faktörü 1 ile 10 aralığında değiştirilebilir. İki veya daha fazla sayıda madde aynı kapasite faktörüyle elue edilirse hareketli faz seçiciliği yeterli değildir ve değiştirilmesi gerekir. Normal faz sıvı kromatografisinde yaygın olarak hekzan, metil-t-butil eter, metilen klorür, asetonitril, metanol gibi organik çözücüler kullanılır.[70-72]

2.5.6. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)

Geçerlilik testi (validasyon), ürünlerin değerlendirme prosesinde, kalitatif veya kantitatif analizlerde seçilen yöntem yada yöntemlerin bu analiz işlemlerinde uygulanabilir olduğunu göstermek için yapılan testlerin tümüdür.[69,78] Farmasötik preparatlarda ve biyolojik ortamlarda etkin maddelerin miktarlarının belirlenmesinde uygulanan yöntemlerin geçerlilik testlerinin yapılmış olması gerekmektedir. Seçilen analitik yöntemin geçerliliğini göstermek için kullanılan parametreler:[78]

1. Doğruluk

2. Kesinlik

3. Saklanan Örneklerin Kararlılığı (Stabilite)

4. Doğrusallık

5. Seçicilik

6. Duyarlılık

7. Geri Kazanım

2.5.6.a. Doğruluk ve Kesinlik

Doğruluk, bir analitik yöntemde sonuçların gerçek değere veya gerçek olarak kabul edilen değere yakınlığı olarak ifade edilir ve bağıl hata (% BH) ile verilir. Kesinlik ise, analitik bir işlemde önceden belirlenmiş koşullar altında aynı homojen örnekten birçok örnekleme yapılır ve bu örneklerin her birinden alınan bir seri ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığı olarak ifade edilir ve % BSS (bağıl standart sapma) ile verilir.[69,78]

i) Güniçi kesinlik: Bir birinden bağımsız biçimde hazırlanmış numunelerin aynı gün içerisinde tekrarlayan analiz sonuçlarının birbirine yakınlığı (n=6, n:ölçüm sayısı) % BSS değeri ile verilir.[78]

ii) Günler arası kesinlik: Bir birinden bağımsız biçimde hazırlanmış numunelerin farklı günler (en az altı gün) içerisinde tekrarlayan analiz (en az altı kez, n=6) sonuçlarının birbirlerine olan yakınlık ölçüsüdür. Bu çalışmayla elde edilen değerler aynı zamanda yöntemin uygulanabilirliğinin de bir ölçüsüdür.[78]

2.5.6.b. Örneklerin Kararlılığı (Stabilite)

Saklanan örneklerin analiz süresince bozulmadan sabit kaldığından emin olmak için yapılan testlere kararlılık (stabilite) denilmektedir. Etken maddeyi içeren kan örneklerinin normal laboratuvar koşullarında nem, sıcaklık, hava ve örneklerin dondurulup-eritilmesi (-20 °C bekletilmesi) gibi etkilere maruz kaldığında etken maddenin bozulmadan sabit kaldığı süre tespit edilmeli ve aynı zamanda elde edilen bilgilerin literatür bilgileri ile de desteklenmesi gerekmektedir.[76,78]

2.5.6.c. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi

En düşük derişimden en yüksek derişime doğru bir seri çözelti hazırlanarak yöntemin doğrusal olduğu aralığın belirlenme işlemine doğrusallık denir. Bu aralık belirlendikten sonra çözeltinin derişimine karşı elde edilen cevaplar grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi türetilir. Kalibrasyon eğrisinin regrasyon analizi yapılarak standart eğrinin doğru denklemi ve korelasyon katsayısı elde edilir. Kalibrasyon doğrusunun eğimi, doğrusallığın matematiksel bir ölçüsüdür.[76,78]

2.5.6.d. Duyarlılık

Analitik yöntemin en düşük derişimdeki analitleri saptayabilmesinin bir ölçüsüdür.[69,76,78]

2.5.6.e. Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Belirlenen deney koşulları altında, analitik yöntemin tayin alt sınırı değeri numune içindeki analitin uygun doğruluk ve kesinlik ile tayin edilebildiği en düşük derişimdir. Kromatografik çalışmalarda tayin alt sınırı değeri, pik yüksekliğinin gürültü yüksekliğine oranın 10 olduğu derişim olarak belirlenir.

2.5.6.f. Gözlenebilme (Teşhis) Sınırı (LOD)

Bir analitik yöntemin gözlenebilme (teşhis) sınırı, bir örnekteki incelenen bileşiğin belirlenebilen en düşük miktarıdır. Ancak burada belirlenen derişim kantitatif tayin için tam olarak kesinlik ifade eden bir değer olamayıp sadece bir sınır değeridir. Kromatografik çalışmalarda gözlenebilme sınırı değeri, pik yüksekliğinin gürültü yüksekliğine oranın 3 olduğu derişim olarak ifade edilir.

2.5.6.g. Geri Kazanım

Analiz sonucunda bulunan değerin gerçek değere oranı olarak ifade edilir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Materyaller

3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

Çalışmada kullanılan meloksikam (IS) ve clopidogrel standart maddeleri Novagenix ARGE Merkezinden, asetonitril ve metanol Merck'ten (Almanya) temin edildi. Çalışma sırasında kullanılan otomatik pipetler (10-100 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL ve 1000-5000 µL), ve oto örnekleyici vial kitleri (Agilent, 1,8 mL screw cap), mezür, deney tüpü, balon joje, kuartz küvet Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Laboratuvarından temin edildi.

3.1.2. Cihazlar

Terazi (Bosch S 2000), Karıştırıcı Vorteks (IKA), pH metre (Schott), Etüv (Memmert), Vakum Pompası (Phenomenex), Spektrofotometre (Helios) ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) Sistemi (Agilent Technologies 1200 Series), Degazer (Agilent Technologies), Pompa (Agilent Technologies), Kolon (C_{18}, 5 µm, 250 x 4,6 mm) (USA), Otoörnekleyici (Agilent Technologies) ve Bilgisayar (HP).

3.2. Yöntemler

3.2.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) Yöntem Şartları

HPLC çalışmasında, clopidogrel etkin maddesi için uygulanan kromatografik yöntem şartları Tablo 3.1.'de verildi.

Tablo 3.1. Clopidogrel için HPLC yöntem şartları

Yöntem Şartları	Clopidogrel
Kolon	C_{18} (250x4.6 mm, 5µm)
Dedektör	UV
Dalga Boyu	230 nm
Hareketli Faz	Metanol : Asetonitril: Deiyonize su (45:45:10, h/h/h)
Kolon Sıcaklığı	Değişken
Kolon Akış Hızı	0.9 mL/dak
Enjeksiyon Hacmi	10 µL

3.2.2. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi Yöntem Şartları

Spektroskopi çalışmasını gerçekleştirmek üzere ilk olarak clopidogrel etkin maddesi asetonitrilde çözüldü ve ölçümler alındı. Fakat bu şartlar altında yapılan ölçümlerde maksimum dalga boyunun 190 nm'nin altında olduğu gözlendi. Bu dalga boyunda mevcut spektrofotometre ile ölçüm alınamayacağından çözücü polaritesi metanol ile ayarlanarak clopidogrel etkin maddesi absorbans piki 202 nm'ye ayarlandı. Deneylerde metanol:asetonitril (50/50, h/h) çözücü karışımı kullanıldı. Clopidogrel etkin maddesi için uygulanan spektroskopi yöntem şartları Tablo 3.2'de verildi.

Tablo 3.2. Clopidogrel için spektroskopi yöntem şartları

Yöntem Şartları	Clopidogrel
Küvet	Kuartz
Dedektör	UV
Max. Dalga Boyu	202 nm
Çözücü	Metanol : asetonitril (50:50, h/h/h)

3.3. Yöntem Geçerlilik Testleri

Analitik alanda farklı amaçlara göre düzenlenen kurallar dünyanın farklı bölgelerinde ve farklı amaçlara göre farklılıklar göstermektedir. Bu çalışmada, clopidogrel analizinde

kullanılan her iki yöntemin geçerlilik testi, ICH (The International Conference on Harmonization) rehberinde kabul edilen analitiksel yöntem geçerlilik parametreleri esas alınarak gerçekleştirildi.

3.3.1. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı

HPLC yönteminin doğrusallığı, 0.25-30 µg/mL derişim aralığında on dört standart çözeltinin, spektroskopi yönteminde ise 1.25-25 µg/mL derişim aralığında dokuz standart çözeltinin analizi ile belirlendi. Her iki çalışmada da çalışma aralığı seçilirken; kabul edilebilir doğruluk, kesinlik ve doğrusallığın elde edildiği derişim aralıkları tercih edildi. HPLC çalışmasında belirtilen derişim aralıklarında çözeltinin derişimine karşı elde edilen pik alan oranları (clopidogrel pik alanı/IS pik alanı) ve spektorskopi çalışmasında ise clopidogrel derişimine karşı okunan absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri türetildi (n=6). Kalibrasyon eğrilerinin regresyon analizi yapılarak standart eğrinin doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları elde edildi.

3.3.2. Doğruluk/Kesinlik

Clopidogrel kalibrasyon eğrileri içinde yer alan üç farklı derişimde (2.5, 12.5 ve 20 µg/mL) kalite kontrol çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin güniçi (aynı yöntem ve aynı laboratuvar şartlarında 1 günde 6 kez) ve günler arası (aynı yöntemle farklı 3 günde 6 kez) analizleri yapıldı. Analiz sonuçlarının ortalaması ve standart sapmaları belirlendi. Doğruluk bağıl hatayla (% BH = [(bulunan-eklenen)/eklenen] x 100) ve kesinlik bağıl standart sapma (% BSS = [SS/ortalama] x 100) ile verildi.

Analitik geri kazanım ise, standart ekleme yöntemine göre yapıldı.

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

HPLC yönteminde, kromatogramdan sinyal/gürültü (S/G) oranı 3 olduğu derişim gözlenebilme sınırı (LOD) ve 10 olan derişimde miktar tayin alt sınırı (LOQ) değeri olarak

belirlendi. Spektroskopi çalışmasında ise kalibrasyon eğrisinin en küçük değerinden daha küçük derişimlerde bir seri çözeltiler hazırlandı ve altı kez absorbansları okundu. Okunan değerlerin % BBS'ları belirlendi. % BBS değeri % 20'den küçük olan derişim değeri gözlenebilme sınırı ve % 10'dan küçük olan derişim değeri ise miktar tayin alt sınırı olarak tespit edildi.

3.4. Tablet Çözeltilerinin Hazırlanması

Clopidogrel etkin maddesini içeren tablet formunda üç adet ticari Atervix, Plavix ve Karum tabletlerinde miktar tayin işlemleri yapıldı. Çalışmada her bir tabletten sekiz adet tablet alınıp tartılarak ortalaması alındı ve bir tabletin kütlesi belirlendi. Daha sonra bu tabletler toz haline gelinceye kadar öğütüldü ve harmanlandı. Bu karışımdan 1 tablet ağırlığı kadar clopidogrel olacak şekilde belirli bir miktar alınarak 100 mL'lik balon jojeye koyuldu analitik saflıktaki HPLC yöntemi için asetonitrilde UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi yöntemi için ise methanol:asetonitril (50:50, h/h) çözücü karışımında çözüldü ve aynı çözücüler ile hacmi 100 mL'ye tamamlandı. Elde edilen çözeltiler süzüldü ve çalışmada kullanılacak derişimde çözeltileri hazırlanıp miktar tayinleri yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. HPLC Yöntemi

4.1.1. Standart Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması

Clopidogrel stok çözeltisi, clopidogrel etkin maddesinin hassas terazide tartılıp daha sonra 100 mL balon joje içerisinde asetonitril eklenerek çözülmesiyle 100 µg/mL derişiminde hazırlandı. Stok çözeltiden uygun miktarlarda alınıp asetonitril ile seyreltilerek 0.25, 0.50, 1,2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 22.5, 25 ve 30 µg/mL derişimlerinde standart çalışma çözeltileri hazırlandı.

4.1.2. HPLC Yöntem Geliştirme

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

4.1.2.a. Hareketli Faz Optimizasyonu

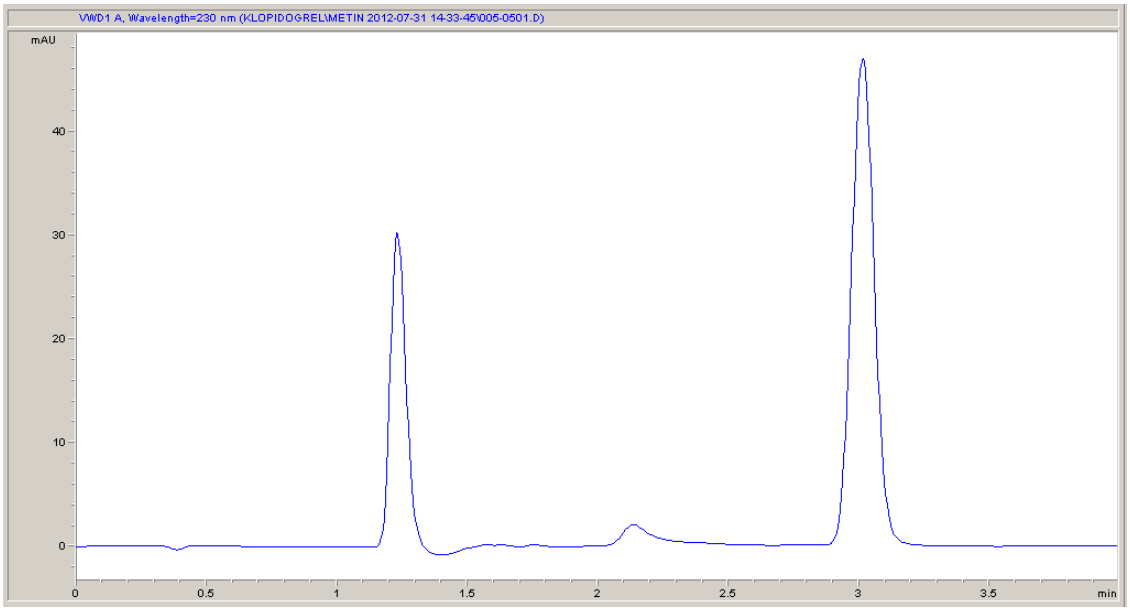
Mobil fazın bileşimi, ters faz sıvı kromatografisinde bileşiklerin alıkonmalarında önemli rol oynar. Mobil faz olarak kullanılan çözücü karışımlarında polarite ve mobil fazın elüsyon gücü ters faz HPLC çalışmalarında analitin alıkonmasını etkileyen temel faktördür. Bu çalışmada hareketli faz olarak metanol-su ve asetonitril-su çözücü karışımları denendi ve asetonitril-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 90:10, (h/h) test edildi ve elde edilen sonuçlara göre asetonitril-su-metanol oranının 45:45:10 (h/h/h) olduğu değer optimum mobil faz karışımı olarak belirlendi.

4.1.3. HPLC Yöntem Geçerlilik Testleri

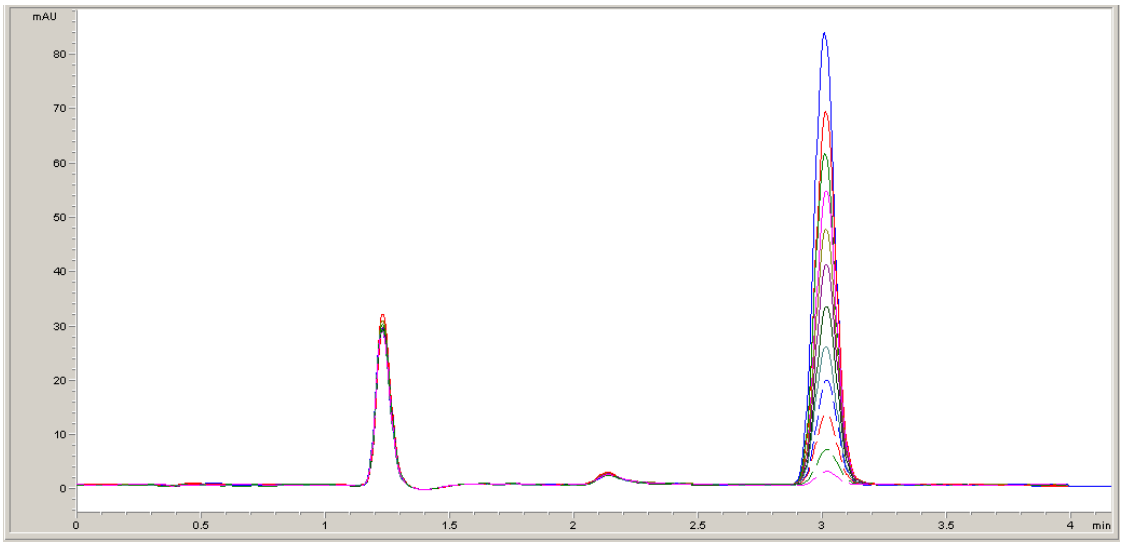
Yöntemin farklı ortamlarda uygulanabilirliğini göstermek amacıyla yöntem geçerlilik testleri yapıldı.

4.1.3.a. Seçicilik (Belirleyicilik)

Standart çözeltiler ile elde edilen kromatogramların incelenmesinde clopidogrel ve meloksikam (IS) alıkonma zamanları sırasıyla 3.1 ve 1.2 dakika olarak belirlendi. Clopidogrele ait kromatogram Şekil 4.1'de verildi. Clopidogrel etkin maddesinin IS sabit tutularak derişime bağlı olarak alınan kromatogram Şekil 4.2'de verildi.



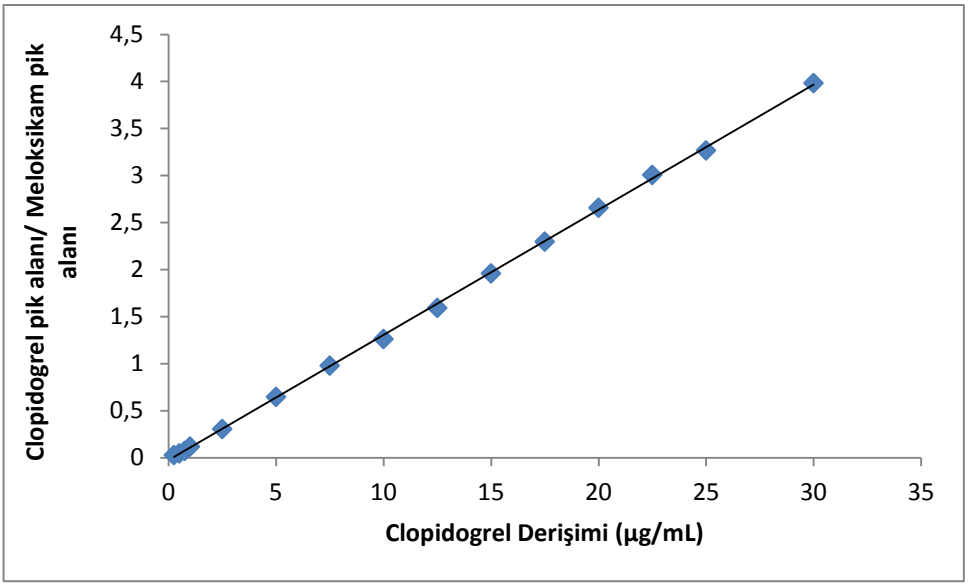
Şekil 4.1. 17.5 µg/mL derişiminde standart clopidogrel çözeltisinin HPLC kromatogramı



Şekil 4.2. Artan derişime bağlı clopidogrel standart çalışma çözeltilerinin HPLC kromatogramları (0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 22.5, 25 ve 30 µg/mL)

4.1.3.b. Doğrusallık/Çalışma Aralığı

0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 22.5 ve 25 µg/mL derişimlerindeki clopidogrel çözeltilerinin ve 10 µg/mL derişiminde IS olan meloksikamın kromatogramları alınarak pik alanları tespit edildi. Daha sonra clopidogrel çözelti derişimlerine karşı clopidogrel pik alanının meloksikam pik alanına oranları (clopidogrel pik alanı/IS pik alanı) grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri türetildi (n=6). Clopidogrel etkin maddesine ait ortalama kalibrasyon eğrisi Şekil 4.3'de verildi. Kalibrasyon eğrilerinin regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.1'de verildi.



Şekil 4.3. HPLC yönteminde elde edilen ortalama kalibrasyon eğrisi

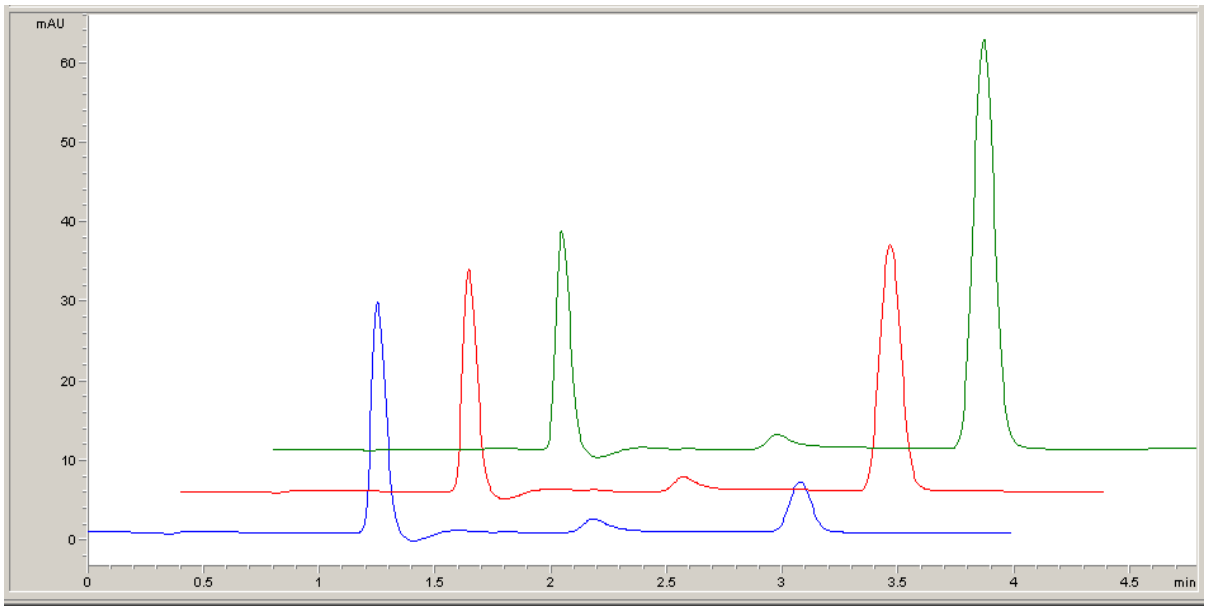
Tablo 4.1. HPLC yönteminin kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri

Etkin Madde	Derişim (µg/mL)	λ (nm)	LR[a]	Sa	Sb	R
Clopidogrel	0.25-30	230	Y= 0.1331x – 0.0251	$66.8x10^{-4}$	$1.5x10^{-3}$	0.9999

λ: dalga boyu, [a]: 6 kalibasyon eğrisi, LR: lineer regresyon, Sa: regresyon eğrisindeki kaymanın standart sapması, Sb: regresyon eğrisindeki eğimin standart sapması, R: korelasyon katsayısı

4.1.3.c.Doğruluk/Kesinlik

Clopidogrel kalibrasyon eğrisi içine düşen üç farklı derişimde (2.5 12.5 ve 20 µg/mL) kalite kontrol çözeltilerinin güniçi (aynı yöntem ve aynı laboratuvar şartlarında 1 günde 6 kez) ve günler arası (aynı yöntemle farklı 3 günde 6 kez) analizleri yapılarak güniçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri belirlendi. Şekil.4.4'te kalite kontrol çözeltilerinin kromatogramı verildi. Analiz sonuçlarının ortalaması ve standart sapmaları elde edildi. Doğruluk bağıl hatayla ve kesinlik bağıl standart sapma (% BSS) ile verildi (Tablo 4.2).



Şekil 4.4. Clopidogrel kalite kontrol çözeltilerine ait kromatogramlar

Tablo 4.2. HPLC yönteminin güniçi - günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)

Etkin Madde	λ (nm)	Eklenen (µg/mL)	Güniçi			Günler Arası		
			Ortalama±SS (µg/mL)	Doğruluk % BH	Kesinlik % BSS	Ortalama±SS (µg/mL)	Doğruluk % BH	Kesinlik % BSS
Clopidogrel	230	2.5	2.49±0.09	-0.40	3.61	2.52±0.08	0.80	3.18
		12.5	12.36±0.15	-1.12	1.21	12.28±0.20	-1.76	1.63
		20	20.17±0.44	0.85	2.18	19.73±0.39	-1.35	1.98

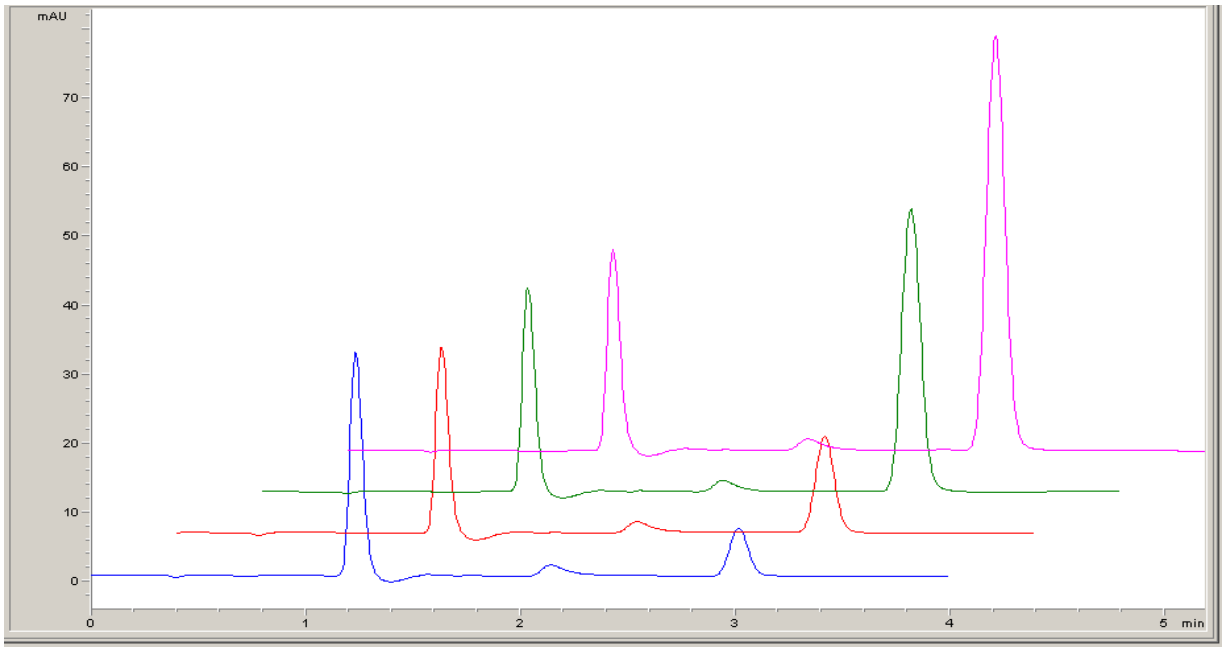
λ: dalga boyu, SS: standart sapma (n=6), BH: bağıl hata, BSS: bağıl standart sapma

4.1.3.d. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Clopidogrel standart çalışma çözeltilerinden elde edilen kromatogramlardan sinyal/gürültü (S/G) oranın 3 olduğu derişim gözlenebilme sınırı (LOD) ve 10 olduğu derişim ise miktar tayin alt sınırı (LOQ) olarak belirlendi. HPLC yönteminin LOQ değeri 0.25 µg/mL ve LOD değeri ise 0.09 µg/mL olarak tespit edildi.

4.1.3.e. Analitik Geri Kazanım

Farmasötik preparattan geri kazanım çalışmaları standart ekleme yöntemi ile yapıldı. Bunun için 75 mg clopidogrel etkin madde içeren Plavix, Karum ve Atervix farmasötik preparatlardan Bölüm 3.4.'de belirtildiği şekilde 5 µg/mL derişimde tablet çözeltileri hazırlanarak kromatogramları alındı ve pik alanları belirlendi. Her bir farmasötik preparat çözeltisi üzerine 2, 12.5 ve 20 µg/mL derişimlerinde üç farklı clopidogrel standart çalışma çözeltileri eklendi, kromatogramları alındı ve pik alanları belirlendi. [(toplam çözeltinin pik alanı-eklenen standart çözelti pik alanı)/farmasötik preparat çözeltisinin pik alanı]x100 formülü kullanılarak analitik geri kazanım değerleri tespit edildi (Tablo 4.3).



Şekil 4.5. 5 µg/mL derişimde ilaç çözeltisine 3 farklı clopidogrel derişiminde ekleme sonrası elde edilen çözeltilerin HPLC kromatogramı

Tablo 4.3. Farmasötik preparatlarda yöntemin analitik kazanım değerleri (n=6)

Ticari Preparat	Preparat çözeltisi (μg/mL)	Eklenen (μg/mL)	Ortalama±SS (μg/mL)	% Geri kazanım	% BSS
Plavix	5	2.5	7.49±0.07	99.8	0.93
		12.5	17.47±0.08	99.4	0.46
		20	25.08±0.11	101.6	0.44
Karum	5	2.5	7.53±0.09	100.6	1.20
		12.5	17.54±0.13	100.8	0.74
		20	24.94±0.12	98.8	0.48
Atervix	5	2.5	7.49±0.08	99.8	1.07
		12.5	17.47±0.09	99.4	0.52
		20	24.95±0.71	99.0	2.85

λ: dalga boyu, SS: standart sapma, % BSS: bağıl standart sapma

4.1.3.f. HPLC Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Geliştirilip geçerlilik testleri yapılan HPLC yönteminin uygulanabilir olduğunu görmek amacıyla, 75 mg clopidogrel etkin maddesini içeren piyasada mevcut olan üç ticari ilaçta (Plavix, Karum ve Atervix) clopidogrel miktar tayini mevcut yöntemle yapıldı.

4.2. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi Yöntemi

4.2.1. Standart Çalışma Çözeltilerin Hazırlanması

Clopidogrel stok çözeltisi 100 μg/mL derişimde metanol:asetonitril (50:50, h/h) çözücü karışımında clopidogrel standardından hazırlandı. Bu stok çözeltiden uygun miktarlarda alınıp aynı çözücü karışımı ile seyreltilerek 1.25, 2.50, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20 ve 25 μg/mL derişimlerde clopidogrel standart çalışma çözeltileri hazırlandı.

4.2.2. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi Yönteminin Optimizasyonu

Laboratuvarda kullanılan UV-Görünür Bölge Spektrofotometre cihazı 190-800 nm aralığında ölçüm yapmaktadır. Clopidogrel etkin maddesi için yapılan ön çalışmalarda; asetonitril içerisinde çözünmüş clopidogrelin ölçümleri alındığında maksimum dalga boyunun bu etkin madde için 190 nm'nin altında olduğu gözlemlendi. Ölçümlerin hassas ve güvenilir

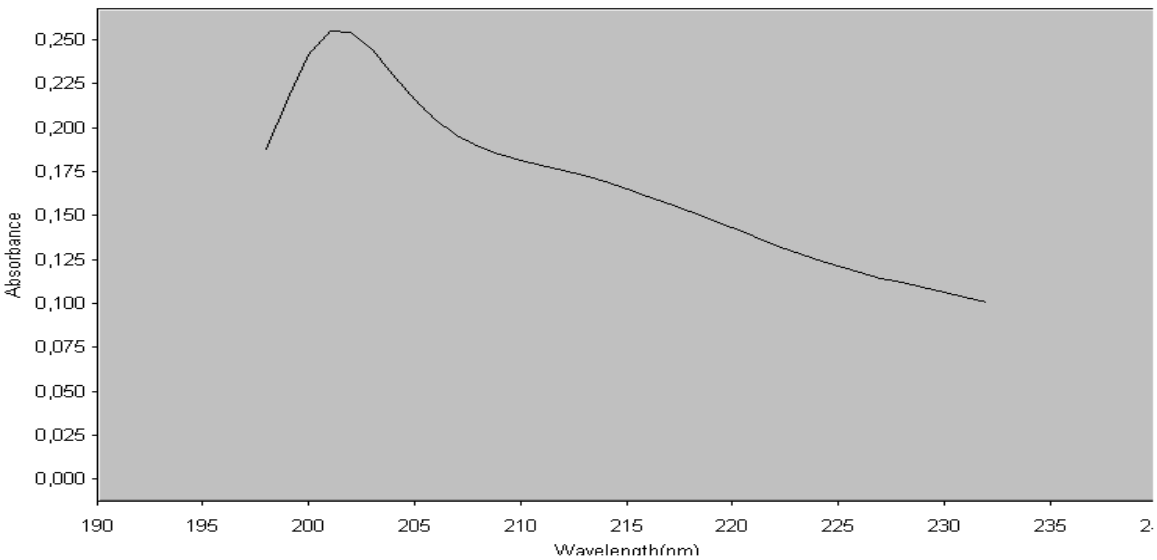
olabilmesi için maksimum dalga boyunu cihazın ölçüm aralığına almak üzere clopidogrel metanol ile asetonitril 50:50 (h/h) oranında karıştırıldı ve böylece batokromik kayma gerçekleştirilerek maksimum dalga boyu 202 nm'ye çekildi.

4.2.3. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi Yönteminin Geçerlilik Testleri

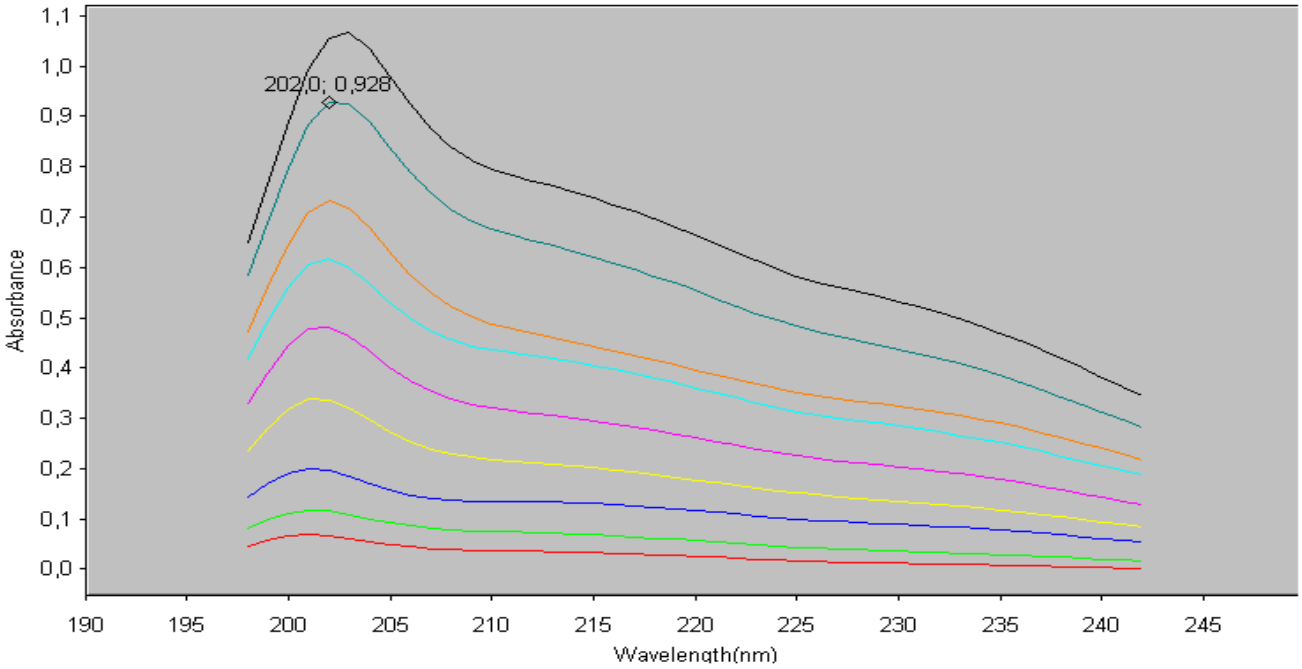
Yöntemin farklı ortamlarda uygulanabilirliğini göstermek amacıyla yöntem geçerlilik testleri yapıldı.

4.2.3.a. Seçicilik (Belirleyicilik)

50/50 (h/h) metanol:asetonitril çözücü karışımında hazırlanan clopidogrel standart çalışma çözeltilerinin 202 nm dalga boyunda maksimum absorbans verdiği belirlendi. 5 µg/mL derişiminde clopidogrel standart çözeltisine ait spektrum Şekil 4.6'da, dokuz farklı derişimde hazırlanan clopidogrel standart çalışma çözeltilerine ait spektrumlarda Şekil 4.7'de verildi.



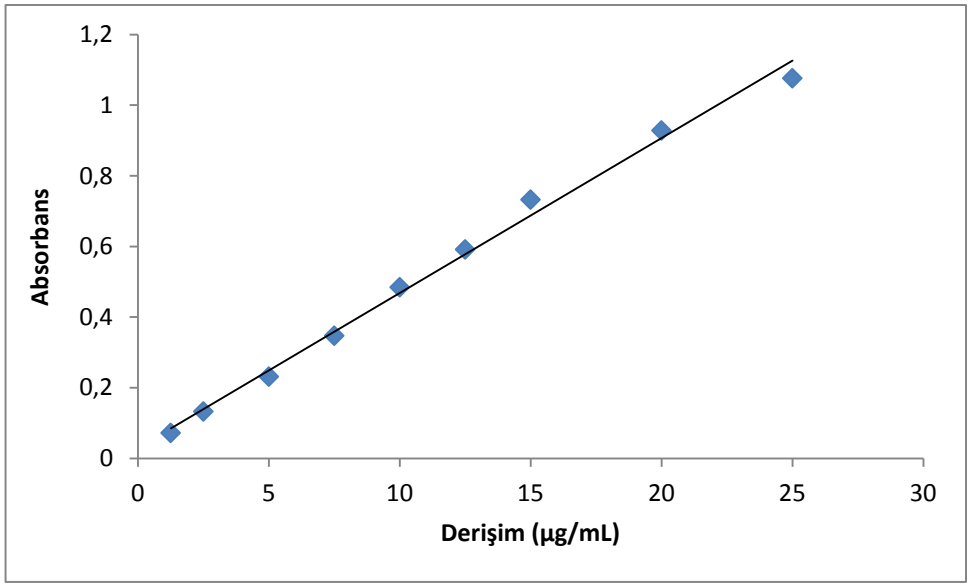
Şekil 4.6. 5 µg/mL derişimde standart clopidogrel çözeltisinin spektrumu



Şekil 4.7. 1.25, 2.50, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20 ve 25 µg/mL derişimlerde clopidogrel standart çalışma çözeltilerinin spektrumları

4.2.3.b. Doğrusallık/Çalışma Aralığı

1.25, 2.50, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20 ve 25 µg/mL derişimlerdeki clopidogrel standart çalışma çözeltilerinin spektrumları alındı ve en az altı kez okunarak absorbans değerleri tespit edildi. Clopidogrel derişimine karşı elde edilen absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri türetildi. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi yönteminde elde edilen ortalama kalibrasyon eğrisi Şekil 4.8'de, kalibrasyon eğrilerinin regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları da Tablo 4.4'de verildi.



Şekil 4.8. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi yönteminde elde edilen ortalama kalibrasyon eğrisi

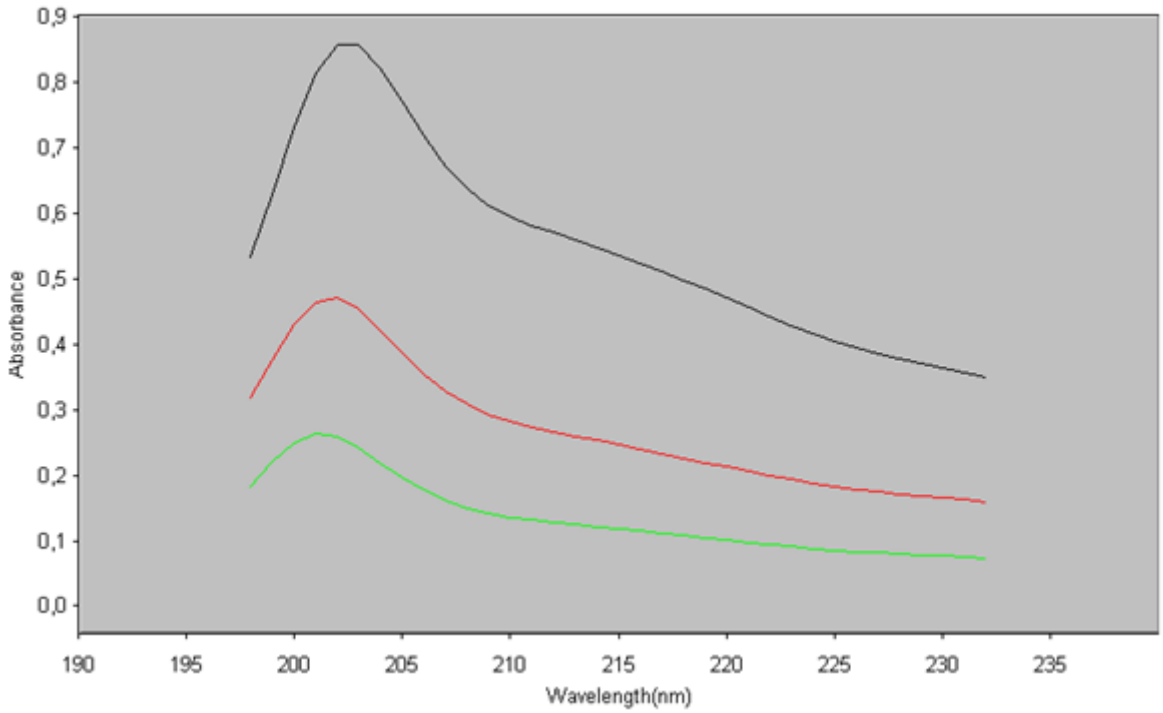
Tablo 4.4. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi yönteminden elde edilen kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz sonucu

Etkin Madde	Derişim (µg/mL)	λ (nm)	LR[a]	Sa	Sb	R
Clopidogrel	1.25-25	202	A=0.0443x+0.0229	0.0002	0.0034	0.9991

λ: dalga boyu, [a]: 6 tane kalibasyon eğrisinin ortalaması, LR: lineer regresyon, Sa: regresyon eğrisindeki kaymanın standart sapması, Sb: regresyon eğrisindeki eğimin standart sapması, R: korelasyon katsayısı

4.2.3.c. Doğruluk/Kesinlik

Clopidogrelin kalibrasyon eğrisi içine düşen üç farklı derişimde (2.5 12.5 ve 20 µg/mL) kalite kontrol çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltiler güniçi (aynı yöntem ve aynı laboratuvar şartlarında 1 günde 6 kez) ve günler arası (aynı yöntemle farklı 3 günde 6 kez) analizleri yapıldı. Şekil 4.9'da kalite kontrol çözeltilerinin spektrumları verildi. Analiz sonuçlarının ortalaması ve standart sapmaları belirlendi. Yöntemin doğruluk değeri bağıl hatayla (% BH) ve kesinlik değeri ise bağıl standart sapma (% BSS) ile verildi (Tablo4.5).



Şekil 4.9. 2.5, 12.5 ve 20 µg/mL derişimlerde clopidogrel kalite kontrol çözeltilerine ait spektrumlar

Tablo 4.5. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi yönteminin güniçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)

λ (nm)	Eklenen (µg/mL)	Güniçi			Günler Arası		
		Ortalama±SS (µg/mL)	Doğruluk % BH	Kesinlik %BSS	Ortalama±SS (µg/mL)	Doğruluk % BH	Kesinlik % BSS
202	2.5	2.39±0.05	-4.40	2.09	2.51±0.11	0.40	4.38
	12.5	12.16±0.11	-2.72	0.91	12.28±0.20	-1.76	1.63
	20	20.17±0.12	0.85	0.60	19.73±0.39	-1.35	1.98

λ: dalga boyu, SS: standart sapma (n=6), BH: bağıl hata, BSS: bağıl standart sapma

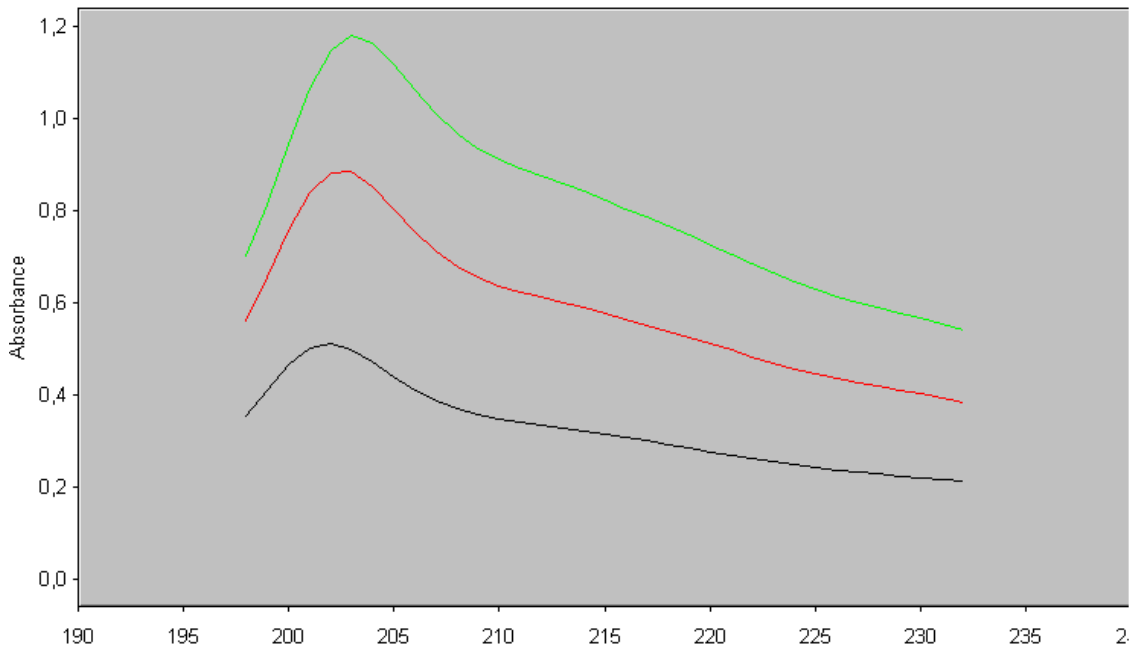
4.2.3.d. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Kalibrasyon eğrisinin en düşük değeri olan 1.25 µg/mL'den daha düşük derişimlerde bir seri standart çözeltiler hazırlandı ve bu çözeltilerin altı kez absorbans değerleri okundu. Okunan değerlerin yüzde bağıl standart sapmaları (% BSS) belirlendi. % BSS değeri % 20'den küçük olan derişim gözlenebilme sınırı (LOD) ve % 10'dan küçük olan derişim değeri

ise miktar tayin alt sınırı (LOQ) olarak tespit edildi. Yöntemin LOQ değeri 1.25 µg/mL ve LOD değeri ise 0.45 µg/mL olarak elde edildi.

4.2.3.e. Analitik Geri Kazanım

Farmasötik preparattan geri kazanım çalışmaları standart ekleme yöntemi ile yapıldı. Bunun için 75 mg clopidogrel içeren Plavix, Karum ve Atervix farmasötik preparatların çözeltileri Bölüm 3.4.'de belirtildiği şekilde 5 µg/mL derişimde tablet çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin spektrumları alındı ve absorbansları okundu. Bu ilaç çözeltilerine üç farklı derişimde (2, 12.5 ve 20 µg/mL) clopidogrel standart çalışma çözeltileri eklendi, karıştırıldı ve spektrumları alınarak absorbans değerleri tespit edildi. Analitik geri kazanım değerleri [(toplam çözeltinin absorbans değeri – eklenen standart çözeltinin absorbans değeri)/farmasötik preparat çözeltisinin absorbans değeri] x 100 formülü kullanılarak elde edildi (Tablo 4.6.).



Şekil 4.10. 5 µg/mL derişimde ilaç çözeltisine eklenen 3 farklı derişimde (2, 12.5 ve 20 µg/mL) clopidogrel standart çalışma çözeltilerinin eklenmesi ile elde edilen çözeltilerin spektrumları

Tablo 4.6. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi yönteminin analitik kazanım değerleri (n=3)

Ticari Preparat	Preparat çözeltisi (µg/mL)	Eklenen (µg/mL)	Ortalama±SS (µg/mL)	Geri kazanım %	BSS %
Plavix	5	2.5	7.45±0.08	99.0	1.07
		12.5	17.52±0.21	100.4	1.20
		20	24.82±0.31	96.4	1.25
Karum	5	2.5	7.53±0.07	100.6	0.93
		12.5	17.55±0.09	101.0	0.51
		20	24.90±0.40	98.0	1.61
Atervix	5	2.5	7.52±0.08	100.4	1.06
		12.5	17.37±0.07	97.4	0.41
		20	24.92±0.48	98.4	1.93

λ: dalga boyu, SS: standart sapma, % BSS: bağıl standart sapma

4.2.3.f. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Geliştirilip geçerlilik testleri yapılan UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi yönteminin uygulanabilir olduğunu görmek amacıyla, 75 mg clopidogrel etkin maddesini içeren piyasada mevcut olan üç ticari ilaçta (Plavix, Karum ve Atervix) geliştirilen mevcut yöntem ile clopidogrel miktar tayini yapıldı.

5. TARTIŞMA

Analitik kimyada, herhangi bir maddenin analizi için kullanılacak analitik tekniklerin üstünlükleri, sınırlamaları hakkında yeteri kadar bir bilgi donanımına ve iyi bir karar verme yetisine sahip olmak gerekir. Bunlara ilaveten de çalışılacak konu ile ilgili iyi bir literatür taramasının yapılmış olması gerekmektedir. Aslında analitik bir tekniğin nasıl seçileceği konusunda net bir şey söylemek mümkün değildir, çünkü laboratuvar koşullarına bağlı olarak kullanılacak teknikler değişebildiğinden dolayı her zaman en iyi yol sadece bir tane olamayabilir. Analitik yöntem seçimi yapıldıktan sonra da bu yöntem ile analitin farklı ortamlarda miktar tayini için uygulanabilir olduğunu göstermek amacıyla doğruluk, kesinlik, tekrarlanabilirlik, seçicilik, spesifiklik, hassaslık ve analiz süresinin kısa olması gibi yöntem geçerlilik testlerinin (validasyonunun) yapılması gereklidir. Yöntem geçerlilik testleri yapılırken bileşimi tam olarak bilinen güvenilir standart numuneler kullanılmaktadır. Kullanılan standart numunelerin hem bileşim bakımından hem de analit derişimi bakımından analizi yapılacak numune ile benzer olması gerekir.

İlaç analizlerinde, analizin yapılacağı ortama (farmasötik preparat veya biyolojik sıvılar) göre literatür bilgilerine de dayanarak analitik yöntem seçiminin yapılması gerekmektedir. Bu bilgiler ışığında yöntem seçimini gerçekleştirmeden önce iyi bir literatür taraması yapılmalıdır. Literatür çalışması ışığı altında antitrombosit olarak kullanılan clopidogrelinin farmasötik preparatlarda miktar tayini için UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi ve HPLC yöntemleri geliştirilip geçerlilik testleri yapıldı.

Çalışmada kullanılan clopidogrel standart etken maddesi Novagenixden temin edildi. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi yöntemi, yüksek duyarlık, orta ve yüksek seçimlilik, yüksek doğruluk, kesinlik, kolaylık ve rahatlık bakımından ilaç endüstrisinde farmasötik preparatlarda ilaç etkin maddelerinin miktar tayininde tercih edilen tekniklerden biri olarak söylenebilir. Bu teknikte, UV-Görünür Bölge Absorpsiyon spektrumu, madde

üzerine gönderilen ışığın dalga boylarına karşı absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile elde edilir. Yani A= f(λ) fonksiyonudur.

UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopi çalışmasında, clopidogrel etkin maddesi için yapılan ön çalışmalarda; asetonitril içerisinde çözünmüş clopidogrelin ölçümleri alındığında maksimum dalga boyunun bu etkin madde için 190 nm'nin altında olduğu gözlemlendi. Ölçümlerin hassas ve güvenilir olabilmesi için maksimum dalga boyunu cihazın ölçüm aralığına almak üzere clopidogrel metanol ile asetonitril 50:50 (h/h) oranında karıştırıldı ve böylece batokromik kayma gerçekleştirilerek maksimum dalga boyu 202 nm'ye çekildi.

Yöntemin doğrusal olduğu 1.25-25 µg/mL derişim aralığında bir seri standart (1.25, 2.50, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20 ve 25 µg/mL) clopidogrel çözeltisinin derişimine karşı okunan absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edildi. Kalibrasyon eğrisinin regrasyon analizinden, regresyon doğrusunun denklemi A=0.0443x+0.0229 (A: Absorbans, x: clopidogrel derişimi) ve korelasyon katsayısı (r) 0.9991, gözlenebilme sınırı (LOD) değeri 0.45 µg/mL ve miktar tayin sınırı (LOQ) değeri 1.25 µg/mL, güniçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik çalışmalarında bağıl standart sapma (% BSS) ve bağıl hata (% BH) değerlerinin % 4.5'dan küçük olduğu ve yöntemin analitik geri kazanım değeri de ortalama % 99.1 olarak tespit edildi. Geliştirilip geçerlilik testleri yapılan UV-Görünür Bölge Absorpsiyon spektroskopi yöntemiyle ticari olarak satılan üç farmasötik preparatta clopidogrel miktar tayini için başarıyla uygulandı.

Kromatografi, miktarı bilinmeyen ve içinde başka maddelerinde olduğu karışımlardaki kimyasal bileşenlerin ayrılması, tanınması ve tayininde çok yaygın olarak kullanılan bir yöntemler bütünüdür. Bu yöntemler içerisinde Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) doğruluk, kesinlik, tekrarlanabilirlik, seçicilik, duyarlılık, geri kazanım, düşük

hacimde numune ile analiz yapılmasına imkân tanıması ve sonuçların hızlı tayin edilebilmesi özellikleri sayesinde diğer yöntemlere kıyasla daha avantajlı bir yöntem olarak göze çarpar. HPLC'nin bu üstünlükleri sebebiyle ilaç endüstrisinde gerek farmasötik preparatlardan miktar tayininde gerekse de biyolojik sıvılardan ilaç etkin maddelerinin analizlerinde oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

HPLC çalışmalarında sıcaklık, kolon, sabit faz, hareketli fazın bileşenleri ve mobil faz içerisindeki bulunma yüzdeleri gibi parametreler analizi yapılacak maddenin analiz süresine etki etmektedir. Bundan dolayı ayrımın iyileştirilmesi ve kabul edilebilir sonuçların alınabilmesi için kromatografik koşulların optimizasyonuna gerek duyulmaktadır. Çalışmada, ters faz C_{18} kolonu (5 µm, 250 x 4.6 mm), hareketli faz olarak (su-metanol oranı: 70:30, 80:20 ve 90:10, h/h) test edildi ve elde edilen sonuçlara göre asetonitril-metanol-su oranının 45:45:10 h/h/h olduğu değer optimum olarak belirlendi. Kolon sıcaklığı değişken, hareketli faz akış hızı 0.9 mL/dak, dalga boyu 230 nm ve enjeksiyon hacmi 10 µL 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, alıkonma zamanları en uygun pikler elde edilmeye çalışıldı. Ayrıca literatürdeki var olan yöntemlere alternatif olabilecek yeni bir HPLC yönteminin ortaya konması amaçlandı.

Çalışmamızda diğer bazı yöntemlerde kullanılan türevlendirme ajanlarına ihtiyaç duyulmadan doğrusallığı oldukça iyi bir kalibrasyon eğrisi elde edildi ve geri kazanım değerleri de baz alındığında tatmin edici bir çalışma olduğu gözlendi.

Standart çözeltilerin 0.25-30 µg/mL derişim aralığında yöntemin doğrusal olduğu belirlendi. Stok çözeltiden 0.25, 0.50, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 22.5, 25 ve 30

µg/mL derişimlerinde bir clopidogrel standart çalışma çözeltileri hazırlandı ve karışıma iç standart olarak 10 µg/mL derişimindeki meloksikam standart çözeltisi eklenerek HPLC'de kromatogramları alındı. Her bir çözeltinin derişimine karşı clopidogrel pik alanının meloksikam pik alanına oranı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edildi. Kalibrasyon eğrisinin regresyon analizinden, regresyon doğrusunun denklemi y= 0.1331x – 0.0251 (y: clopidogrel pik alanı ile IS (meloksikam) pik alanı oranı, x: clopidogrel derişimi); clopidogrel etkin maddesi için korelasyon katsayısı (r) 0.9999 olarak belirlendi. Yöntemin gözlenebilme sınırı (LOD) ve miktar tayin alt sınırı (LOQ) değerleri sırasıyla 0.09 µg/mL ve 0.25 µg/mL olarak tespit edildi ve aynı zamanda güniçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik çalışmalarında güniçi ve günler arası % BSS ve % BH değerlerinin sırasıyla % 3.7 ve % 2.0'den küçük olduğu belirlendi. Geliştirilip geçerlilik testleri yapılan HPLC yönteminin uygulanabilir olduğunu görmek amacıyla ticari olarak satılan üç farmasötik preparatta (Plavix, Karum ve Atervix) clopidogrel miktar tayini HPLC yöntemiyle başarıyla yapıldı. Tabletten ortalama analitik geri kazanım değeri % 99.9 olarak ve % BSS değeri ise % 3.0'den küçük olduğu belirlendi.

Mitokoz ve Panderi,[16] farmasötik preperatlarda clopidogrelin belirlenmesi için bir HPLC yöntemi geliştirip geçerlilik testlerini yapmışlardır. Bu çalışmada C_{18} kolon kullanılmış, akış hızı 0.3 mL/dak olarak belirlenmiştir. İç standart olarak naproksen seçilmiş ve 235 nm dalga boyunda çalışılmıştır. Mobil faz olarak sodyum dihidrojen fosfat-asetonitril (35:65, h/h) kullanılan çalışmada clopidogrelin ve IS alıkonma zamanları sırasıyla 6.28 ve 3.08 dakika olarak belirlenmiştir. Bizim geliştirdiğimiz yöntemde ise clopidogrel ve IS alıkonma zamanları sırasıyla 3.1 ve 1.2 dakika olarak elde edildi. Kullandığımız yöntemin analiz süresinin literatürlerdeki diğer yöntemlere göre daha kısa olması ayrı bir üstünlük sağlamaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, clopidogrel etkin maddesinin standart çözeltilerde ve farmasötik preparatlarda miktar tayini için literaratürdeki yöntemlere alternatif olacak UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopisi ve HPLC yöntemleri geliştirilip geçerlilik testleri yapıldı.

Geliştirilen bu yöntemlerin hassas, duyarlı, seçici, doğru ve kesin olduğu geçerlilik testleri ile gösterildiğinden dolayı yöntemlerin farmasötik preparatlarda kalite kontrol amaçlı çalışmalarda başarıyla uygulanabilir olduğu sonucuna varıldı. Bu çalışmadan elde edilen verilerin ileriki çalışmalara da yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Akgün H, Balkan A, Bilgin Aa, Çalış Ü, Gökhan N, Dalkara S, Erdoğan H, Demir Erol D, Ertan M, Özkanlı F, Palaska E, Saraç S, Şafak C, Tozkoparan B. *Farmasötik Kimya* Baskı. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 2004.

2. Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 8. bask›. *Ankara: Hacettepe-Tafl Kitapçılık*, 1998.

3. Demir M, Tekgündüz E. Antitrombotik ve Antikoagülan Kullanım İlkeleri. *Trakya Univ Tip Fak Derg*, 2010, 27: 69-73.

4. Kalyoncu N. Antitrombotik İlaçlar: Antikoagülan İlaçlar, Antitrombositik (Antiplatelet) İlaçlar, Fibrinolitik (Trombolitik) İlaçlar. *Turkiye Klinikleri Journal of Pharmacology Special*, 2004, 2: 0.

5. Güray Y, Güray Ü, Korkmaz Ş. Klopidogrel direnci. 2009.

6. Bolayır E. Yeni Antiagreganlar: Tiklopidin ve Klopidogrel. *Journal of Inonu University Medical Faculty*, 2010, 10: 163-165.

7. Cingi I, Erol K. Anadolu Üniversitesi Açık Öğretim Fakültesi Sağlık Personeli Önlisans Eğitimi. 1996.

8. Moshfegh K, Redondo M, Julmy F, Wuillemin WA, Gebauer MU, Haeberli A, Meyer BJ. Antiplatelet effects of clopidogrel compared with aspirin after myocardial infarction: Enhanced inhibitory effects of combination therapy. *Journal of the American College of Cardiology*, 2000, 36: 699-705.

9. Tan C. Antitrombotik Bir Etkin Madde İçeren Tablet Formülasyonunun Geliştirilmesi Üzerine Çalışmalar. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmosötik Teknoloji Anablim Dalı. Yüksek lisans tezi, Ankara: Gazi Üniversitesi, 2007.

10. Mehta SR, Yusuf S, Peters RJG, Bertrand ME, Lewis BS, Natarajan MK, Malmberg K, Rupprecht HJ, Zhao F, Chrolavicius S. Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study. *The Lancet*, 2001, 358: 527-533.

11. Steinhubl SR, Berger PB, Mann III JT, Fry ETA, DeLago A, Wilmer C, Topol EJ. Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 2002, 288: 2411-2420.

12. Chen Z, Jiang L, Chen Y, Xie J, Pan H, Peto R, Collins R, Liu L. COMMIT (ClOpidogrel and Metoprolol in Myocardial Infarction Trial) collaborative group. Addition of

clopidogrel to aspirin in 45,852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, 2005, 366: 1607-1621.

13. Yusuf S, Bijsterveld N, Moons A. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation: the Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent recurrent Events Trial Investigators. *The New England journal of medicine*, 2001, 345: 494-502.

14. Bertrand ME, Rupprecht HJ, Urban P, Gershlick AH, Investigators C. Double-blind study of the safety of clopidogrel with and without a loading dose in combination with aspirin compared with ticlopidine in combination with aspirin after coronary stenting - The Clopidogrel Aspirin Stent International Cooperative Study (CLASSICS). *Circulation*, 2000, 102: 624-629.

15. Taniuchi M, Kurz HI, Lasala JM. Randomized comparison of ticlopidine and clopidogrel after intracoronary stent implantation in a broad patient population. *Circulation*, 2001, 104: 539-543.

16. Mitakos A, Panderi I. A validated LC method for the determination of clopidogrel in pharmaceutical preparations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2002, 28: 431-438.

17. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease - Reply. *New England Journal of Medicine*, 2005, 353: 429-430.

18. Pereillo JM, Maftouh M, Andrieu A, Uzabiaga MF, Fedeli O, Savi P, Pascal M, Herbert JM, Maffrand JP, Picard C. Structure and stereochemistry of the active metabolite of clopidogrel. *Drug Metabolism and Disposition*, 2002, 30: 1288-1295.

19. Clarke TA, Waskell LA. The metabolism of clopidogrel is catalyzed by human cytochrome P450 3A and is inhibited by atorvastatin. *Drug Metabolism and Disposition*, 2003, 31: 53-59.

20. Kam PCA, Nethery CM. The thienopyridine derivatives (platelet adenosine diphosphate receptor antagonists), pharmacology and clinical developments. *Anaesthesia*, 2003, 58: 28-35.

21. Lagorce P, Perez Y, Ortiz J, Necciari J, Bressolle F. Assay method for the carboxylic acid metabolite of clopidogrel in human plasma by gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 1998, 720: 107-117.

22. Taubert D, Kastrati A, Harlfinger S, Gorchakova O, Lazar A, von Beckerath N, Schomig A, Schomig E. Pharmacokinetics of clopidogrel after administration of a high loading dose. *Thrombosis and Haemostasis*, 2004, 92: 311-316.

23. Yıldırım M. *İnsan anatomisi*. Baskı. Nobel Tıp Kitabevleri, 2003.

24. Savi P, Pereillo JM, Uzabiaga MF, Combalbert J, Picard C, Maffrand JP, Pascal M, Herbert JM. Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel. *Thrombosis and Haemostasis*, 2000, 84: 891-896.

25. Herbert JM, Frehel D, Vallee E, Kieffer G, Gouy D, Berger Y, Necciari J, Defreyn G, Maffrand JP. Clopidogrel, A Novel Antiplatelet And Antithrombotic Agent. *Cardiovascular Drug Reviews*, 1993, 11: 180-198.

26. Mitakos A, Panderi I. Determination of the carboxylic acid metabolite of clopidogrel in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 505: 107-114.

27. Comerota AJ. Effect on platelet function of cilostazol, clopidogrel, and aspirin, each alone or in combination. *Atherosclerosis Supplements*, 2005, 6: 13-19.

28. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Ramirez C, Sabate M, Jimenez-Quevedo P, Hernandez R, Moreno R, Escaned J, Alfonso F, Banuelos C, Costa MA, Bass TA, Macaya C. Influence of Aspirin resistance on platelet function profiles in patients on long-term Aspirin and Clopidogrel after percutaneous coronary intervention. *American Journal of Cardiology*, 2006, 97: 38-43.

29. Lindgren P, Stenestrand U, Malmberg K, Jonsson B. The long-term cost-effectiveness of clopidogrel plus aspirin in patients undergoing percutaneous coronary intervention in Sweden. *Clinical Therapeutics*, 2005, 27: 100-110.

30. Cavuşoğlu E. The use of clopidogrel in patients with coronary artery disease. *Anadolu kardiyoloji dergisi: AKD= the Anatolian journal of cardiology*, 2004, 4: 63.

31. Bousquet A, Castro B, Saint-Germain J. Polymorphic form of clopidogrel hydrogen sulphate. 2003.

32. Savi P, Combalbert J, Gaich C, Rouchon MC, Maffrand JP, Berger Y, Herbert JM. THE Antiaggregating Activity Of Clopidogrel is Due To A Metabolic-Activation By The Hepatic Cytochrome P450-1A. *Thrombosis and Haemostasis*, 1994, 72: 313-317.

33. Reist M, Roy-De Vos M, Montseny JP, Mayer JM, Carrupt PA, Berger Y, Testa B. Very slow chiral inversion of clopidogrel in rats: A pharmacokinetic and mechanistic investigation. *Drug Metabolism and Disposition*, 2000, 28: 1405-1410.

34. Schrör K. Clinical pharmacology of the adenosine diphosphate (ADP) receptor antagonist, clopidogrel. *Vascular Medicine*, 1998, 3: 247-251.

35. Gachet C. ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thrombosis And Haemostasis-Stuttgart-*, 2001, 86: 222-232.

36. Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang RB, Nurden P, Nurden A, Julius D, Conley PB. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature*, 2001, 409: 202-207.

37. Savi P, Nurden P, Nurden AT, Levy-Toledano S, Herbert JM. Clopidogrel: a review of its mechanism of action. *Platelets*, 1998, 9: 251-255.

38. Jafary FH, Kimmelstiel CD. Antiplatelet therapy in interventional cardiology: I. Newer oral antiplatelet agents. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 2000, 9: 157-162.

39. McEwen J, Strauch G, Perles P, Fowler G, Moreland T, Dickinson J, Montels R, Mosser J, Neccian J. Clopidogrel bioavailability is unaffected by food or antacids. *J Clin Pharmacol*, 1996, 36: 856.

40. Caplain H, Donat F, Gaud C, Necciari J. Pharmacokinetics of clopidogrel. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 1999, 25: 25-28.

41. Coukell AJ, Markham A. Clopidogrel. *Drugs*, 1997, 54: 745-750.

42. Jacobson AK. Platelet ADP receptor antagonists: ticlopidine and clopidogrel. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 2004, 17: 55-64.

43. Lenz TL, Wilson AF. Clinical pharmacokinetics of antiplatelet agents used in the secondary prevention of stroke. *Clinical Pharmacokinetics*, 2003, 42: 909-920.

44. Cattaneo M. Aspirin and clopidogrel - Efficacy, safety, and the issue of drug resistance. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2004, 24: 1980-1987.

45. Hankey GJ. Clopidogrel and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Lancet*, 2000, 356: 269-270.

46. Garg A, Radvan J, Hopkinson N. Clopidogrel associated with acute arthritis. *British Medical Journal*, 2000, 320: 483-483.

47. Ng FH, Wong SY, Chang CM, Chen WH, Kng C, Lanas AI, Wong BCY. High incidence of clopidogrel-associated gastrointestinal bleeding in patients with previous peptic ulcer disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2003, 18: 443-449.

48. Willens HJ. Clopidogrel-induced mixed hepatocellular and cholestatic liver injury. *American journal of therapeutics*, 2000, 7: 317.

49. Khambekar SK, Kovac J, Gershlick AH. Clopidogrel induced urticarial rash in a patient with left main stem percutaneous coronary intervention: management issues. *Heart*, 2004, 90.

50. Zaazaa HE, Abbas SS, Abdelkawy M, Abdelrahman MM. Spectrophotometric and spectrodensitometric determination of Clopidogrel Bisulfate with kinetic study of its alkaline degradation. *Talanta*, 2009, 78: 874-884.

51. Serra H, Bronze MR, Simplício AL. Simultaneous determination of clopidogrel and its carboxylic acid metabolite by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B,* 2010, 878: 1480-1486.

52. Nageswara Rao R, Narasa Raju A, Nagaraju D. Development and validation of a liquid chromatographic method for determination of enantiomeric purity of citalopram in bulk drugs and pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 2006, 41: 280-285.

53. Ksycinska H, Rudzki P, Bukowska-Kiliszek M. Determination of clopidogrel metabolite (SR26334) in human plasma by LC-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 2006, 41: 533-539.

54. Takahashi M, Pang H, Kawabata K, Farid NA, Kurihara A. Quantitative determination of clopidogrel active metabolite in human plasma by LC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 2008, 48: 1219-1224.

55. Fayed AS, Weshahy SA, Shehata MA, Hassan NY, Pauwels J, Hoogmartens J, Van Schepdael A. Separation and determination of clopidogrel and its impurities by capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2009, 49: 193-200.

56. Gündüz T. *İnstrümental Analiz*. Gazi Kitapevi, Ankara, 2002: 101.

57. Holler F, Nieman T, Skoog D. Principles of instrumental analysis. *Saunders College Publishing, Philadelphia,* 1998.

58. Hollas JM. *Modern spectroscopy*. 4th Baskı. Chichester ; Hoboken, NJ, J. Wiley, 2004.

59. Wiberg K. *Multivariate spectroscopic methods for the analysis of solutions*. Baskı. Institutionen för analytisk kemi, Univ., 2004.

60**.** Analitik Kimya II Laboratuvar Aletli Analiz Deneyleri Hacettepe Üniv., Ecz.Fak. Analitik Kimya A.B.D.,Ankara, 2005.

61. Krstulovıc A.M, Brown P.H. Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatograpy Teory, *Practive and Biomedical Applications*, 1982

62. Hamilton RJ, Sewell PA. Introduction to High Performance Liquid Chromatography, 1981

63. Huber L. Application of Diode-Array Dedection in HPLC, Hewlett Packard Co, France, 1989

64. Jalalizadeh H, Souri E, Farsam H, Ansari M. A high-performance liquid chromatographic assay for the determination of losartan in plasma. 2003.

65. Özgen H. *LC–2 HPLC'ye Giriş ve Ayırım Teknikleri* Dolunay Eğitim Merkezi, 2001

66. Şenyuva H.Z, Özden T. *Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisine Giriş*, 2002
67. Skoog D.A and West D.M. *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 1982
68. Skoog DA, Leary JJ, *Principles of Instrumental Analysis*, 4th Edition, Harcourt Brace College Publishers, New York, 1992.
69. Validation of Analytical Procedures. Proceedings of the International Conference on Harmonisation (ICH). Commision of the European Communities, 1996.
70. Burchfield HP, Storss E.E. Biochemical Applications of Gas–Chromatography. Academic Press, Nw York and London, *Fourth printing*, 1970: 1–239.
71. Tunçbilek İ, Gaz kromatografisi–kütle spektrometresi tekniği kullanılarak doping amacıyla kullanılan hidroksietil nişastanın (hes) idrardan analizi üzerine bir çalışma. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans tezi Ankara, 2005.
72. Smith RM, *Gas and Liquid Chromatography in Analytical Chemistry*. John Wiley and Sons Ltd., New York, 1988: 37–51.
73. Douglas F, "GC/MS Analysis'' Scientific Testimony An online journal, (http://sites.netscape.net/dougfrm)
74. Electronic Pressure Control in Gas Chromatography–Mass Spectrometery, Elsevier Science Publisher, 1988: 11–35.
75. Stofford SS, Klein KJ, Larson PA, Firror RL, Wylie PL, Aplication of Electronic Pressure Control in Capillar Gas Chromatography, 1991: 128–141.
76. Willet JE, *Gas Chromatography Analytical Chemistry by Open Learning*, 5th Ed., Kealey, D. (Ed). London, 1991: 65–73.
77. David DJ, *Gas Chromatographic Detectors*, Wiley, New York, 1974.
78. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM) May 2001 BP (http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.htm)

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı	Ömer Faruk KOÇAK
Doğum Tarihi	05.03.1987
Doğum yeri	Çankaya
Medeni hali	Evli
Uyruğu	T.C.
Adres	Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya ABD, 25240 ERZURUM
Tel	0532 6818085
e-mail	omer_f_kocak@hotmail.com
EĞİTİM	
Lise	Erzurum Özel Aziziye Koleji (2004)
Lisans	Atatürk Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Kimya Bölümü (2005-2010)
Yüksek Lisans	Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı (2010-2012)
YABANCI DİL BİLGİSİ	
İngilizce	Orta Derece

EK-2. ETİK KURUL ONAYI

"2012. 3.1/ 6 "SAĞLIK BİLİMLERİ ETİK KURUL KARARI 24.07.2012

3/1.6- Enstitümüz Eczacılık Analitik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Ömer Faruk KOÇAK' ın **" Clopidogrel' in Biyoanalitik Yöntem Validasyonu"** tez konusu görüşüldü;
İlgilinin tez konusunun etik değerlere uygun olduğu mevcudun oybirliği ile,

ADI SOYADI	GÖREVİ	İMZA
Prof. Dr. Funda BAYINDIR	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Başkanı	
Doç. Dr. Ayşe OKANLI	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Başkan Yardımcısı	
Prof. Dr. Samih DİYARBAKIR	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Prof.Dr.Yavuz Selim SAĞLAM	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Prof. Dr. H. İnci GÜL	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Doç.Dr. Ahmet YILDIZ	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Doç. Dr.Abdulkadir YILDIRIM	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Yrd.Doç.Dr.Engin SAYGIN	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	**Katılmadı**
Yrd. Doç. Dr. İlhan ŞEN	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi ve Raportör	