**A, E VE K VİTAMİNLERİNİN FARMASÖTİK PREPARATLARDA, İNSAN PLAZMASINDA VE TAVŞAN PLAZMASINDA FARKLI ANALİTİK YÖNTEMLERLE MİKTAR ANALİZİ**

**Fatma DEMİRKAYA**

**DOKTORA TEZİ**

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI**

**Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU**

**2009**

**Her hakkı saklıdır.**

**T. C.**
**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ**
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**
**ECZACILIK FAKÜLTESİ**
**ANALİTİK KİMYA**
**ANABİLİMDALI**

# A, E VE K VİTAMİNLERİNİN FARMASÖTİK PREPARATLARDA, İNSAN PLAZMASINDA VE TAVŞAN PLAZMASINDA FARKLI ANALİTİK YÖNTEMLERLE MİKTAR ANALİZİ

**Fatma DEMİRKAYA**

**TEZ YÖNETİCİSİ**

**Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU**

Doktora Tezi

**ERZURUM-2009**

**Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU**'un danışmanlığında, **Fatma DEMİRKAYA** tarafından hazırlanan bu çalışma 12.06.2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından, Analitık Kimya Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr.Yücel KADIOĞLU *imza*

Üye : Prof. Dr. Samih BAYRAKÇEKEN *imza*

Üye : Prof. Dr. Nuran ÖZALTIN *imza*

Üye : Prof. Dr.Sacide ALTINÖZ *imza*

Üye : Prof Dr.Hülya AKSOY *imza*

Yukarıdaki sonucu onaylarım

(imza)

Prof. Dr.İsmail CEYLAN

Enstitü Müdürü

# İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER ..... i
TEŞEKKÜR ..... vi
ÖZET ..... vii
SUMMARY ..... viii
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... xi
TABLOLAR DİZİNİ ..... xiv
**1. GİRİŞ VE AMAÇ ..... 1**
2. GENEL BİLGİLER… ..... 3
2.1. Vitaminler ..... 3
2.1.1. E Vitamini ..... 4
2.1.1.1. E Vitamininin Kimyasal Bileşimi ..... 4
2.1.1.2. E Vitamininin Keşfi ..... 5
2.1.1.3. α-Tokoferol ..... 5
2.1.1.4. E vitamininin (α-Tokoferol) Biyokinetiği ..... 6
2.1.1.5. α-Tokoferolün Antioksidan Özelliği ..... 6
2.1.2. A Vitamini ..... 7
2.1.2.1. A Vitamininin Kimyasal Bileşimi.. ..... 7
2.1.2.2. A Vitamininin Keşfi ..... 8
2.1.2.3. β-Karoten ..... 8
2.1.2.4. A Vitamininin (β-karoten, Retinol, Retinal) Biyokinetiği ..... 9
2.1.2.5. A Vitamininin Antioksidan Özelliği ..... 10
2.1.3. K Vitamini ..... 11
2.1.3.1. K Vitamininin Kimyasal Bileşimi ..... 11
2.1.3.2. K Vitamininin Keşfi ..... 12
2.1.3.3. K Vitamininin (Filokinon, Menakinon, Menadion) Biyokinetiğ ..... 13
2.1.3.4. K Vitamininin Oksidan Özelliği ..... 14
2.2. Kanser ..... 15
2.2.1. Mesane Kanseri ..... 15
2.3. Litaratür Özetleri ..... 16
2.3.1. A, E ve K Vitaminleri ile İlgili Çalışmalar ..... 16

2.3.1.1. A Vitamini ..... 16
2.3.1.2. E Vitamini ..... 18
2.3.1.3. K Vitamini ..... 19
2.3.1.4. A ve E Vitaminleri ..... 19
2.3.2. A, E ve K Vitaminleri ile İlgili Analiz Çalışmaları ..... 22
2.3.2.1. A Vitamini ..... 22
2.3.2.2. E Vitamini ..... 29
2.3.2.3. K Vitamini ..... 36
2.3.2.4. A ve E Vitaminleri ..... 43
2.3.2.5. A ve K Vitaminleri ..... 55
2.3.2.6. A, E ve K Vitaminleri ..... 55
2.4. Spektrokimyasal Yöntemler ..... 57
2.4.1. Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi ..... 57
2.5. Türev Spektrofotometri Yöntemi ..... 60
2.6. Kromatografik Yöntemler ..... 63
2.6.1. Kromatografinin Dayandığı Temeller ..... 63
2.6.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) ..... 64
2.6.2.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Cihazı ..... 64
2.7. Yöntem Geliştirme ve Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon) ..... 66
2.7.1. Yöntem Geliştirme ..... 66
2.7.2. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon). ..... 67
2.7.2.1. Stabilite (Stabilty) ..... 68
2.7.2.2. Özgünlük (Belirleyicilik)/Seçicilik ( Specificity,/Selectivity ) ..... 68
2.7.2.3. Doğruluk (Accuracy) ..... 69
2.7.2.4. Kesinlik (Precision) ..... 69
2.7.2.5. Doğrusallık ( Linearity ) ve Çalışma aralığı (Range) ..... 70
2.7.2.6. Duyarlılık Limiti ( Sensitivity Limit) ..... 70
2.7.2.7. Sağlamlık /Dayanıklılık ( Robustness/Ruggedness) ..... 71
2.7.3. Özgünlük (Matriks Etkisi) ..... 71
**3. MATERYAL ve YÖNTEMLER ..... 72**
3.1. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler ..... 72
3.2. Cihazlar ..... 73

3.3. Yöntemler ..... 73
3.3.1. Spektrofotometre Yöntem Şartları ..... 73
3.3.1.1. UV Görünür Bölge Spektrofotometre Şartları ..... 73
3.3.1.2. Türev Spektrofotometre Yöntem Şartları ..... 74
3.3.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yöntem Şartları ..... 75
3.4. Ekstraksiyon Prosesleri ..... 76
3.4.1. β-Karoten ve Retinolün Ekstraksiyon Prosesi ..... 76
3.4.1.1. β-K'nın Spektrofotometrik Ölçümleri için Ekstraksiyon Prosesi ..... 76
3.4.1.2. β-K ve Retinolün Kromatografik Ölçümleri için Ekstraksiyon Prosesi ..... 77
3.4.2. α-Tokoferolün (α-T) Ekstraksiyon Prosesi ..... 77
3.4.2.1. α-T'nin Spektrofotometrik Ölçümleri için Ekstraksiyon Prosesi ..... 77
3.4.2.2. α-T'nin Kromatografik Ölçümleri için Ekstraksiyon Prosesi ..... 78
3.4.3. Menadionun Ekstraksiyon Prosesi ..... 78
3.4.3.1. MN'nin Spektrofotometrik Ölçümleri için Ekstraksiyon Prosesi ..... 78
3.4.3.2. MN'nin Kromatografik Ölçümleri için Ekstraksiyon Prosesi ..... 78
3.4.4. Menadion Sodyum Bisülfitin Ekstraksiyon Prosesi ..... 79
3.4.4.1. MBS'nin Spektrofotometrik Ölçümleri için Ekstraksiyon Prosesi ..... 79
3.4.4.2. MBS'nin Kromatografik Ölçümleri için Ekstraksiyon Prosesi ..... 79
3.4.5. MBS'nin MN'ye Dönüştürülmesi ..... 80
**4. BULGULAR ..... 81**
4.1. Stabilite (Kararlılık ..... 81
4.1.1. β-K, Retinol, α-T, MN ve MBS'nin Standart Çözeltilerinin Stabilitesi ..... 81
4.1.2. β-K, Retinol, α-T, MN ve MBS'nin Plazma Çözeltilerinin Stabilitesi ..... 82
4.1.2.1. Donma ve Erime Stabilitesi ..... 82
4.1.2.2. Uzun Dönem Stabilitesi ..... 82
4.1.2.3. Kısa Dönem Stabilitesi ..... 82
4.1.2.4. Hazırlama Sonrası Stabilite ..... 83
4.2.UV-Görünür Bölge, Birinci-,İkinci-Türev Spektrofotometri Yöntemi ..... 86
4.2.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması ..... 86

4.2.2. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri Yöntemi ..... 87
4.2.2.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri Yöntem Geçerlilik Testleri. ..... 87
4.2.2.1.1. Özgünlük (Belirleyicilik). ..... 87
4.2.2.1.2. Doğrusallık/Çalışma Aralığı ..... 90
4.2.2.1.3. Doğruluk/ Kesinlik ..... 93
4.2.2.1.4. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ) ..... 94
4.2.2.1.5. Geri Kazanım ..... 95
4.2.3. Birinci ve İkinci Türev Spektrofotometri Yöntemi ..... 97
4.2.3.1. Birinci ve İkinci Türev Spektrofotometri Yöntem Geçerlilik Testleri ..... 97
4.2.3.1.1. Özgünlük (Belirleyicilik) ..... 97
4.2.3.1.2. Doğrusallık/Çalışma Aralığı ..... 104
4.2.3.1.3. Doğruluk/ Kesinlik ..... 109
4.2.3.1.4. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ) ..... 109
4.2.3.1.5. Geri Kazanım ..... 115
4.3. Kromatografik Yöntemler ..... 120
4.3.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yöntemi ..... 120
4.3.1.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması ..... 120
4.3.1.2. HPLC-DAD Yöntem Geçerlilik Testleri ..... 122
4.3.1.2.1. Özgünlük (Belirleyicilik) ..... 122
4.3.1.2.2. Doğrusallık/Çalışma Aralığı ..... 131
4.3.1.2.3. Doğruluk/ Kesinlik ..... 133
4.3.1.2.4. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ). ..... 135
4.3.1.2.5. Geri Kazanım ..... 135
4.3.1.2.6. Matriks Etkisi ..... 137
4.4. Gerçek Numunelere Uygulama ..... 138
4.4.1. Geliştirilen Yöntemlerin Farmasötik Preparatlara Uygulanması ..... 138
4.4.1.1. Carovit® Yumuşak Kapsül (20 mg β-K / Kapsül) ..... 138
4.4.1.2. Evicap® Yumuşak Kapsül (200 IU(134,23 mg) α-T / Kapsül) ..... 141
4.4.1.3. Libavit K® Ampul (20 mg MBS / 2mL) ..... 142
4.4.1.4. Farmasötik Preparatlarda Elde Edilen Verilerin İstatiksel Analizi ..... 148
4.4.2. Geliştirilen Yöntemlerin Gerçek Numunelere Uygulanması ..... 149

4.4.2.1. Tavşanlarada β-K, Retinol, α-T ve MN'nin Farmakokinetik Parametrelerinin Belirlenmesi ..... 149
4.4.2.1.1. Tavşanda β-K Çalışması ..... 149
4.4.2.1.2. Tavşanlarda α-T Çalışması ..... 151
4.4.2.1.3. Tavşanlarda MBS(MN) Çalışması ..... 153
4.4.2.2. Sağlıklı Gönüllü ve Mesane Kanserli Kişilerde β-K, Retinol, α-T ve MN Plazma Seviyelerinin Belirlenmesi ..... 155
4.4.2.2.1. Numune Alımı Protokolü ve Deneklere Ait Özellikler ..... 155
4.4.2.2.2. Sağlıklı Gönüllülerde ve Mesane Kanserli Hastalarda β-K Çalışması ..... 157
4.4.2.2.3. Sağlıklı Gönüllülerde ve Mesane Kanserli Hastalarda α-T Çalışması ..... 161
4.4.2.2.3. Sağlıklı Gönüllülerde ve Mesane Kanserli Hastalarda MN Çalışması ..... 164
**5. TARTIŞMA VE SONUÇ** ..... 168
**6. KAYNAKLAR** ..... 201
**7. EKLER** ..... 219

# TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışma, Sayın Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU yöneticiliğinde Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya A.B.D.'da gerçekleştirilmiştir.

Başta değerli bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, çalışmalarımı yönlendiren ve tezimin tümünde büyük bir emeği bulunan danışmanım ve değerli hocam Sayın Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU olmak üzere,

Tez süresince desteklerini gördüğüm Tez İzleme Komitesi Üyeleri, Sayın Prof. Dr. Samih Bayrakçeken ve Sayın Prof. Dr. Leyla YILDIZ'a

Çalışmalarımın her aşamasında büyük emekleri olan ve her konuda bana destek veren sevgili arkadaşım Sayın Onur ŞENOL'a

Tavşan kanlarının alınmasında yardımcı olan Abim Sayın Arş. Gör. A. Kürşat DEMİRKAYA'ya ve Sayın Arş. Gör. Murat Öztürk'e

Çalışmamıza katılan sağlıklı gönüllü arkadaşlarıma ve mesane kanserli hastalara ve kanların alınmasında yardımcı olan ablam Sayın Dr. Ülkü GÜNDOĞDU ve kardeşim Sayın Dr. Gülşah DEMİRKAYA'ya Tıp Fakültesi Üroloji A.B.D'dan Sayın Doç. Dr. Yılmaz AKSOY ve Sayın Arş. Gör. Dr. Hasan Rıza AYDIN'a teşekkür ederim.

Her zaman beni destekleyen, güvenen ve inanan aileme, özellikle annem ve babam Sıdıka DEMİRKAYA ve Mahmut DEMİRKAYA'ya ve Sayın Arş. Gör. Özkan MİLOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Erzurum, 2009 Fatma DEMİRKAYA

## ÖZET

**A, E ve K vitaminlerinin farmasötik preparatlarda, insan plazmasında ve tavşan plazmasında farklı analitik yöntemlerle miktar analizi.**

Vücudumuzda çeşitli görevleri olan vitaminler, küçük miktarlarda alınması gereken temel besinlerdir. β-karoten (β-K), provitamin A olması yanında serbest oksijen radikallerini söndüren antioksidanlardan biridir. α-tokoferol (α-T) zincir kırıcı özelliği ile serbest radikalleri söndürür ve biyolojik sistemlerde en önemli antioksidanlardan biri olarak bilinir. Kanın pıhtılaşma proteinlerinin (faktör 2, 7, 9 ve 10) karboksilasyonunda kofaktör olarak görev alan K vitaminin ise son zamanlardaki çalışmalarda antikanser aktivite gösterdiği belirtilmektedir.

Çalışmamızda, farmasötik preparatlarda, insan ve tavşan plazmasında A (β-K ve retinol), E (α-T) ve $K_3$ (menadion sodium bisulfit (MBS) ve menadion (MN)) vitaminlerinin belirlenmesi için farklı kromatografik ve spektrofotometrik yöntemler geliştirildi ve valide edildi (UV-Görünür Bölge, Birinci ve İkinci Türev Spektrofotometri ve HPLC-DAD yöntemleri). β-K, α-T ve MBS için geliştirilen ve valide edilen yöntemler, her bir vitamini ayrı ayrı içeren farmasötik preparatlara başarı ile uygulandı. Bu vitaminler için geliştirilen yöntemlerden elde edilen sonuçlar ayrı ayrı *F*-testi ile karşılaştırıldı ve istatiksel olarak bir fark belirlenemedi. Ayrıca, önerilen kromatografik yöntemler ile, tavşanlara ayrı ayrı tek doz olarak β-K (100 mg), α-T (400 IU) ve MBS (100 mg) verilen ve verildikten sonra belirlenen zamanlarda toplanan plazma örneklerinde, β-K, retinol, α-T ve MN analizleri yapıldı ve Retinol, α-T ve MN'nin plazma derişim-zaman grafikleri ve farmakokinetik parametreleri elde edildi. Tavşan çalışmasından sonra, geliştirilen ve geçerlilik testleri yapılan kromatografik yöntemler, tek doz olacak şekilde ayrı ayrı β-K (Carovit® yumuşak jelatin kapsül; 20 mg), α-T (Evicap® yumuşak jelatin kapsül; 400 IU) ve MBS'nin (Libavit K® ampul; 40 mg) uygulandığı altı sağlıklı gönüllüden (1. grup) ve altı mesane kanserli hastadan (2.grup) belirlenen zamanlarda toplanan insan plazma örneklerinde β-K, retinol, α-T ve MN'nin belirlenmesinde başarı ile uygulandı. Her biri altı kişiden oluşan bağımsız iki grubun karşılaştırılmasında *Student-t* (%95 güven seviyesinde) testi kullanıldı. Bu istatiksel analiz yönteminden elde edilen sonuçlara göre belirtilen zamanlarda ( β-K ve retinol için 0. ve 2,5. saat, α-T için 0., 12., 24., 48. saat ve MN için 3. ve 5. dakika) 1. ve 2. grubun plazma β-K, retinol, α-T ve MN derişimleri arasında önemli bir fark bulunamazken, 0, ve 10. dakikalarda 1. ve 2. grubun plazma MN derişimleri arasında istatiksel olarak önemli bir fark bulundu. (sırasıyla, p=0.007 ve 0.049).


**Anahtar Kelimeler:** β-karoten ve retinol, α-tokoferol, menadion, spektrofotometri, HPLC

## SUMMARY

**Quantitative analysis of Vitamin A, E and K in pharmaceutical preparations, human and rabbit plasma samples with different analytical methods.**

Vitamins are essential nutrients your body needs in small amounts for various roles in the human body. β-carotene (β-K) is one of antioxidant acting as a potent free radical singlet oxygen scavenger, rather than as pro-vitamin A. α-tocopherol (α-T) has been recognized as a classic free radical scavenger with chain-braking properties and as one of the most important fat-soluble antioxidant in biological systems. Vitamin K served as a cofactor in carboxylation of blood clotting proteins (factors 2, 7, 9 and 10) has been determined to be shown anticancer activite in recent resarch.

Our study, For determination of β-K and retinol (vitamin A), α-T (vitamin E) and menadione sodium bisulphite (MBS) and menadione (MN) (vitamins $K_3$) in pharmaceutical preparations, human and rabbit plasma were developed and validated with spectrophotometric and chromatographic methods (Zero-, first- and second- order derivative spectrophotometry and HPLC-DAD methods).The developed and validated methods for β-K, α-T and MBS could be successfully applied to pharmaceutical preparations containing separately each vitamin. The results obtained from developed methods for these vitamins were separately compared (*F*-test) and no statistically significant difference were found. Furthermore, with proposed chromatographic methods, retinol, α-T, MN analyzed in plasma samples collected at designated time point after single dose separately administration of β-K (100 mg), α-T (400 IU) and MBS (100 mg) to rabbits and the plasma concentration-time profiles and the major pharmacokinetic parameters of retinol, α-T, MN were obtained. After in rabbit studys, the developed and validated chromatographic methods could be successfully applied to the in-vivo determination of β-K, retinol, α-T and MN in human plasma samples collected at designated time point from six healthy volunteers (group 1) and six bladder cancer patients (group 2) following separately administration of single dose of β-K (Carovit® capsule; 20 mg), α-T (Evicap® capsule; 400 IU) and MBS (Libavit K® ampul; 40 mg). *Student-t* test (at 95 % coeffidence level) was used to compare two independent group (1 and 2) each consisting of six subjects. According to data obtained from this statistically analysis, while there was no a significant difference between plasma β-K, α-T, retinol and MN concentrations in group 1 and 2 at the time ( 0 and 2,5$^{th}$ h for β-K and retinol, 0, 12$^{th}$, 24$^{th}$, 48$^{th}$ h for α-T and 3$^{th}$ and 5$^{th}$ min for MN) the difference between plasma MN concentrations in inter-group at 0 and 10$^{th}$ min were statistically significant (p=0.007 and 0.049, respectively).


**Keyword:** β-carotene, retinol, α-tocopherol, menadione, Spectrophotometry, HPLC

# ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kimyasal yapı A) Tokoferol B) Tokotrienol .....5
Şekil 2.2. α-Tokoferolün kimyasal yapısı .....6
Şekil 2.3. Kimyasal yapı A) Retinol B) Retinal .....7
Şekil 2.4 β-karotenin kimyasal yapısı .....9
Şekil 2.5. β-karotenden, retinal ve retinolün meydana gelişi .....10
Şekil 2.6. Kimyasal yapı A) Filokinon B) Menakinon ($K_2$ vitamini) C) MN ($K_3$ vitamini) .....12
Şekil 2.7. Kanserin oluşum şeması .....15
Şekil 2.8. Moleküllerin UV-Görünür Bölge spektrumları ve elektronik geçişleri .....58
Şekil 2.9. Spektrofotometre cihazının basit bir diyagramı .....60
Şekil 2.10. Absorbans ve türev eğrisi spektrumları .....62
Şekil 2.11. Tek bileşenli bir bileşik için tipik bir kromatogram .....63
Şekil 2.12. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi cihazının şematik görünüşü. .....64
Şekil 3.1. MBS'in MN'ye dönüşüm reaksiyonu .....80
Şekil 4.1. Farklı derişimlerde β-K'nın UV-Görünür Bölge spektrumları: A) Standart çalışma çözeltileri B) Plazma çözeltileri .....88
Şekil 4.2. Farklı derişimlerde α-T'nin UV-Görünür Bölge spektrumları: A) Standart çalışma çözeltileri B) Plazma çözeltileri .....88
Şekil 4.3. Farklı derişimlerde MN'nin UV-Görünür Bölge spektrumları: A) Standart çalışma çözeltileri B) Plazma çözeltileri .....89
Şekil 4.4. Farklı derişimlerde MBS'nin UV-Görünür Bölge spektrumları: A) Standart çalışma çözeltileri B) Plazma çözeltileri .....89
Şekil 4.5. Farklı derişimlerde 0,01M HCl çözeltisinden ekstrakte edilen çözeltilerin UV-Görünür Bölge spektrumları: A) MN'ye dönüştürülmüş MBS çözeltileri B) MN çözeltileri .....90
Şekil 4.6. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yöntemi ile elde edilen standart çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrileri: A) β-K B) α-T C) MN D) MBS .....92
Şekil 4.7. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yöntemi ile elde edilen plazma çözeltilerinin kalibrasyon eğrileri: A).β-K B) α-T C) MN D) MN'a dönüştürülmüş MBS .....92
Şekil 4.8. Farklı derişimlerde β-K'nın 1D- spektrumları: A) Standart çalışma çözeltileri B) Plazma çözeltileri .....98

Şekil 4.9. Farklı derişimlerde β-K'nın 2D- spektrumları: A) Standart çalışma çözeltileri B) Plazmadan çözeltileri ..... 99
Şekil 4.10. Farklı derişimlerde α-T'nin 1D- spektrumları: A) Standart çalşıma çözeltileri B) Plazma çözeltieri ..... 99
Şekil 4.11. Farklı derişimlerde α-T'nin 2D- spektrumları: A) Standart çalışma çözeltileri B) Plazma çözeltileri ..... 100
Şekil 4.12. Farklı derişimlerde MN'nin 1D- spektrumları: A) Standart çalışma çözeltileri B) Plazma çözeltileri ..... 100
Şekil 4.13. Farklı derişimlerde MN'nin 2D- spektrumları: A) Standart çalışma çözeltileri B) Plazma çözeltileri ..... 101
Şekil 4.14. Farklı derişimlerde MBS'nin 1D- spektrumları: A) Standart çalışma çözeltileri B) MN'ye dönüştürülmüş MBS'nin plazma çözeltileri ..... 102
Şekil 4.15. Farklı derişimlerde MSB'nin 2D-spektrumları: A) Standart çalışma çözeltileri B) MN'ye dönüştürülmüş MBS'nin plazma çözeltileri ..... 102
Şekil 4.16. Farklı derişimlerde 0,01M HCl çözeltisinden ekstrakte edilen çözeltilerin 1D-spektrumları: A) MN'a dönüştürülmüş MBS çözeltileri B) MN çözeltileri ..... 102
Şekil 4.17. Farklı derişimlerde 0,01M HCl çözeltisinden ekstrakte edilen çözeltilerin 2D-spektrumları: A) MN'ye dönüştürülmüş MBS çözeltileri B) MN çözeltileri ..... 103
Şekil 4.18. 1D-Spektrofotometri yöntemi ile elde edilen standart çalışma çözeltilerin kalibrasyon eğrileri: A) β-K B) α-T C) MN D) MBS ..... 106
Şekil 4.19. 2D-Spektrofotometri yöntemi ile elde edilen standart çalışma çözeltilerin kalibrasyon eğrileri: A) β-K B) α-T C) MN D) MBS ..... 106
Şekil 4.20. 1D-Spektrofotometri yöntemiyle plazmadan ekstrakte edilen çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrileri: A) β-K B) α-T C) MN, D) MN'ye dönüştürülmüş MBS…107
Şekil 4.21. 2D-Spektrofotometri yöntemiyle plazmadan ekstrakte edilen çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrileri: A) β-K B) α-T C) MN, D) MN'ye dönüştürülmüş MBS .... 107
Şekil 4.22. Trifenilfosfin iç standardı içeren farklı derişimlerde standart β-K'nın HPLC-DAD kromatogramları (A) 260 nm'de trifenilfosfin (B) 450 nm'de β-K ..... 123
Şekil 4.23. $K_2$ vitamini iç standardı içeren farklı derişimlerde standart retinolün HPLC-DAD kromatogramları (325 nm) ..... 123
Şekil 4.24. $K_2$ vitamini iç standardı içeren farklı derişimlerinde standart α-T'nin HPLC-DAD kromatogramları (292nm) ..... 124

Şekil 4.25. $K_2$ vitamini iç standardı içeren farklı derişimlerde standart MN'nin HPLC-DAD kromatogramları (330nm) ..... 124
Şekil 4.26. Diazepam iç standardı içeren farklı derişimlerde standart MBS'nin HPLC-DAD kromatogramları (230 nm) ..... 125
Şekil 4.27. $K_2$ vitamini iç standardı içeren 0,01 M HCl çözeltisinden ekstrakte edilen çözeltilerin HPLC-DAD kromatogramları A) MN B)MN'ye dönüştürülen MBS (330nm) ..... 125
Şekil 4.28. $K_2$ vitamini iç standardı içeren farklı derişimlerde β-K'nın plazma çözeltilerinin HPLC-DAD kromatogramları A) 245 nm'de $K_2$ vitamini, B) 450 nm'de β-K.... 126
Şekil 4.29. $K_2$ vitamini iç standardı içeren farklı derişimlerde retinolün plazma çözeltilerinin HPLC-DAD kromatogramları (325 nm) ..... 127
Şekil 4.30. $K_2$ vitamini iç standardı içeren farklı derişimlerde α-T'nin plazma çözeltilerinin HPLC-DAD kromatogramları (292 nm) ..... 127
Şekil 4.31. $K_2$ vitamini iç standardı içeren farklı derişimlerde plazma çözeltilerinin HPLC-DAD kromatogramları A) MN B) MN'ye dönüştürülen MBS (330 nm) ..... 128
Şekil 4.32. Retinol çalışmasında boş plazmanın HPLC-DAD kromatogramları A) Blank plazma B) İç standart içeren boş plazma ..... 128
Şekil 4.33. β-K çalışmasında boş plazmanın HPLC-DAD kromatogramları A) 245 nm'de boş plazma B) 450 nm'de boş plazma C) 245 nm'de iç standart içeren boş plazma D) 245 nm'de iç standart içeren boş plazma ..... 129
Şekil 4.34. α-T çalışmasında boş plazmanın HPLC-DAD kromatogramları A) Boş plazma B) İç standart içeren boş plazma ..... 130
Şekil 4.35. MN çalışmasında boş plazmanın HPLC-DAD kromatogramları A) Boş plazma B) İç standart içeren boş plazma ..... 130
Şekil 4.36. HPLC-DAD yöntemi ile elde edilen standart çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrileri: A) β-K B) Retinol C) α-T D) MN E) MBS..... 132
Şekil 4.37. HPLC-DAD yöntemi ile elde edilen plazma çözeltilerinin kalibrasyon eğrileri: A) β-K B) Retinol C) α-T D) MN E) MN'ye dönüştürülmüş MBS..... 132
Şekil 4.38. 2 ve 4 μg/mL derişimlerde Carovit® ilaç çözeltilerinin: A) UV-Görünür Bölge spektrumları B) 1D- spektrumları C) 2D- spektrumları..... 139
Şekil 4.39. 2 ve 4 μg/mL derişimlerde Carovit® ilaç çözeltilerinin HPLC-DAD kromatogramları A) 260 nm, B) 450 nm..... 140

Şekil 4.40. 10 ve 50 μg/mL derişimlerde Evicap® ilaç çözeltilerinin: A) UV-Görünür Bölge spektrumları B) 1D- spektrumları C) 2D- spektrumları ..... 141
Şekil 4.41. 10 μg/mL derişimdeki Evicap® ilaç çözeltisinin HPLC-DAD kromatogramı ..... 142
Şekil 4.42. 2,5 ve 5 μg/mL derişimlerdeki Libavit K® ilaç çözeltilerinin: A) UV-Görünür Bölge spektrumları B) 1D- spektrumları C) 2D- spektrumları..... 143
Şekil 4.43. 3,05 ve 6,10 μg/mL derişimlerdeki Libavit K® ilaç çözeltilerinin: A) UV-Görünür Bölge spektrumları B) 1D- spektrumları C) 2D- spektrumları ..... 145
Şekil 4.44. 2,5 ve 5 μg/mL derişimlerdeki Libavit K® ilaç çözeltilerinin HPLC-DAD kromatogramı (230 nm)..... 146
Şekil 4.45. 6,10 ve 12,25 μg/mL derişimlerde Libavit K® ilaç çözeltilerinin HPLC-DAD kromatogramı (330 nm)..... 147
Şekil 4.46. Carovit® ilacı (100 mg β-K) verilen tavşan plazmalarının HPLC-DAD kromatogramları A) İlaç uygulanmadan önce B) İlaç uygulandıktan 1 saat sonra..... 150
Şekil 4.47. Carovit® ilacı (100 mg β-K) verilen tavşan plazmasında retinolün derişim-zaman grafiği ..... 151
Şekil 4.48. Evicap® ilacı (400 IU α-T / kapsül) verilen ikinci tavşan plazmasının HPLC-DAD kromatogramları A) İlaç uygulanmadan önce B) İlaç uygulandıktan 72 saat sonra..... 152
Şekil 4.49. Evicap® ilacı verilen tavşan plazmasında HPLC-DAD yöntemi ile α-T derişim zaman grafikleri A) Üç tavşanın ortalama derişim-zaman grafiği B) Üç tavşanın ayrı ayrı derişim-zaman grafiği..... 152
Şekil 4.50. Libavit K® ilacı (100 mg /10 ml) verilen ikinci tavşan plazmasının HPLC-DAD kromatogramları A) İlaç uygulanmadan önce B) İlaç uygulandıktan 2 dakika sonra..... 154
Şekil 4.51. Libavit K® ilacı verilen tavşan plazmasında HPLC-DAD yöntemi ile MN derişim zaman grafikleri A) Birinci tavşanın 0-180 dakika kromatogramı B) Üç tavşanın ortalama derişim-zaman grafiği C) Üç tavşanın ayrı ayrı derişim-zaman grafiği . 155
Şekil 4.52. HPLC-DAD yönteminde Carovit® (20 mg / kapsül) ilacı verilen sağlıklı gönüllü kişilerden EC'nin ilaç uygulanmadan önce ve 2,5 saat sonra β-K plazma kromatogramları..... 158

Şekil 4.53. HPLC-DAD yönteminde Carovit® (20 mg / kapsül) ilacı verilen mesane kanserli hastalardan KT'nin ilaç uygulanmadan önce ve 2,5 saat sonra β-K plazma kromatogramları ..... 158

Şekil 4.54. HPLC-DAD yönteminde, Carovit® (20 mg / kapsül) ilacı verilen kişilerin ilaç uygulanmadan önce ve 2,5 saat sonra retinol plazma kromatogramları A) Sağlıklı gönüllü EC B) Mesane kanserli hasta KT ..... 159

Şekil 4.55. β-K içeren Carovit® (20 mg / kapsül) ilacı sağlıklı gönüllülere ve mesane kanserli hastalara oral olarak uygulandıktan sonra HPLC-DAD yöntemi ile elde edilen β-K ve retinol derişimleri ..... 160

Şekil 4.56. HPLC-DAD yönteminde Evicap® (268,46 mg / kapsül) ilacı verilen sağlıklı gönüllü kişilerden DA'nın ilaç uygulanmadan önce ve sonra 12, 24 ve 48'inci saatlerdeki α-T plazma kromatogramları ..... 162

Şekil 4.57. HPLC-DAD yönteminde Evicap® (268,46 mg / kapsül) ilacı verilen mesane kanserli hastalardan FA'nın ilaç uygulanmadan önce ve sonra 12, 24 ve 48'inci saatlerdeki α-T plazma kromatogramları ..... 162

Şekil 4.58. α-T içeren Evicap® (268,46 mg / kapsül) ilacı sağlıklı gönüllülere ve mesane kanserli hastalara oral olarak uygulandıktan sonra HPLC-DAD yöntemi ile elde edilen α-T derişimleri ..... 163

Şekil 4.59. Libavit K® (40 mg / 4 mL) ilacı verilen kişilerin ilaç uygulanmadan önce ve 5 dakika sonra plazma MN derişimlerinin HPLC-DAD kromatogramları: A) Sağlıklı gönüllü kişi GG B) Mesane kanserli hasta HC ..... 165

Şekil 4.60. MBS içeren Libavit K® (40 mg / 4 mL) ilacı sağlıklı gönüllülere ve mesane kanserli hastalara iv olarak uygulandıktan sonra HPLC-DAD yöntemi ile elde edilen MN derişimleri ..... 166

## TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometre şartları.....73
Tablo 3.2. β-K'nın 1D- ve 2D- Spektrofotometre şartları.....74
Tablo 3.3. α-T'nin 1D- ve 2D- Spektrofotometre şartları.....74
Tablo 3.4. MN ve MBS'nin 1D- ve 2D- Spektrofotometre şartları.....74
Tablo 3.5. β-K ve retinol için HPLC-DAD yöntem şartları.....75
Tablo 3.6. α-T için HPLC-DAD yöntem şartları.....75
Tablo 3.7. MN için HPLC-DAD yöntem şartları.....76
Tablo 3.8. MBS için HPLC-DAD yöntem şartları.....76
Tablo 4.1. β-K, retinol, α-T, MN ve MBS standart kalite kontrol çözeltilerin stabilitesi.....84
Tablo 4.2. β-K, retinol, α-T, MN ve MBS plazma kalite kontrol çözeltilerin uzun dönem stabilitesi.....85
Tablo 4.3. β-K, retinol, α-T, MN ve MBS plazma kalite kontrol çözeltilerin kısa dönem stabilitesi ve hazırlama sonrası (oto örnekleyici üzerinde) stabilitesi.....86
Tablo 4.4. β-K, α-T, MN ve MBS standart çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri.....91
Tablo 4.5. β-K, α-T, MN ve MN'ye dönüştürülen MBS plazma çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri.....91
Tablo 4.6. β-K, α-T, MN ve MBS standart çözeltilerin güniçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)..93
Tablo 4.7. β-K, α-T, MN ve MN'ye dönüştürülen MBS plazma çözeltilerinin güniçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6).....94
Tablo 4.8. β-K, α-T, MN ve MBS standart çözeltilerin gözlenebilme sınırı ve tayin alt sınırı.95
Tablo 4.9. β-K, α-T, MN ve MN'ye dönüştürülen MBS plazma çözeltilerinin gözlenebilme sınırı ve tayin alt sınırı.....95
Tablo 4.10. β-K, α-T, MN ve MN'ye dönüştürülen MBS plazma çözeltilerinin gözlenebilme sınırı ve tayin alt sınırı.....96
Tablo 4.11. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminin güniçi ve günler arası plazma yüzde geri kazanım değerleri (n=6.....97
Tablo 4.12. 1D- Spektrofotometri yöntemi ile β-K, α-T, MN ve MBS standart çalışma çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri...105

Tablo 4.13. 1D- Spektrofotometri yöntemi ile β-K, α-T, MN ve MBS plazma çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri ..... 108
Tablo 4.14. 2D- Spektrofotometri yöntemi ile β-K, α-T, MN ve MBS standart çalışma çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri.. 108
Tablo 4.15. 2D- Spektrofotometri yöntemi ile β-K, α-T, MN ve MBS plazma çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri..... 109
Tablo 4.16. 1D- Spektrofotometri yöntemi ile β-K, α-T, MN ve MBS standart çözeltilerinin güniçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)..... 110
Tablo 4.17. 1D- Spektrofotometri yöntemi ile β-K, α-T MN ve MBS plazma çözeltilerinin güniçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)..... 111
Tablo 4.18. 2D- Spektrofotometri yöntemi ile β-K, α-T, MN ve MBS standart çözeltilerinin güniçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)..... 112
Tablo 4.19. 2D- Spektrofotometri yöntemi ile β-K, α-T MN ve MBS plazma çözeltilerinin güniçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)..... 113
Tablo 4.20. 1D- Spektrofotometri yöntemi ile β-K, α-T, MN ve MBS standart çözeltilerinin gözlenebilme sınırı ve tayin alt sınırı..... 114
Tablo 4.21. 1D- Spektrofotometri yöntemi ile β-K, α-T MN ve MN'ye dönüştürülen MBS plazma çözeltilerinin gözlenebilme sınırı ve tayin alt sınırı..... 114
Tablo 4.22. 2D- Spektrofotometri yöntemi ile β-K, α-T, MN ve MBS standart çözeltilerinin gözlenebilme sınırı ve tayin alt sınırı..... 114
Tablo 4.23. 2D- Spektrofotometri yöntemi ile β-K, α-T MN ve MN'ye dönüştürülen MBS plazma çözeltilerinin gözlenebilme sınırı ve tayin alt sınırı..... 115
Tablo 4.24. Farmasötik preparatlara katım yapılan çözeltilerin 1D- Spektrofotometri yöntemiyle elde edilen güniçi ve günler arası geri kazanım değerleri (n=6)..... 116
Tablo 4.25. Farmasötik preparatlara katım yapılan çözeltilerin 2D- Spektrofotometri yöntemiyle elde edilen güniçi ve günler arası geri kazanım değerleri (n=6)..... 117
Tablo 4.26. Plazmaya katım yapılan çözeltilerin 1D-Spektrofotometri yöntemiyle elde edilen güniçi ve günler arası geri kazanım değerleri (n=6) ..... 118
Tablo 4.27. Plazmaya katım yapılan çözeltilerin 2D-Spektrofotometri yöntemiyle elde edilen güniçi ve günler arası geri kazanım değerleri (n=6) ..... 119
Tablo 4.28. HPLC-DAD yöntemi ile β-K, α-T, MN ve MBS standart çalışma çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri ..... 133

Tablo 4.29. HPLC-DAD yöntemi ile β-K, α-T, MN ve MN'ye dönüştürülen MBS plazma çözeltilerden elde edilen kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri..... 133
Tablo 4.30. HPLC-DAD yöntemiyle β-K, α-T, MN ve MBS standart çözeltilerinin güniçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6) ..... 134
Tablo 4.31. HPLC-DAD yöntemiyle β-K, retinol, α-T, MN ve MBS plazma çözeltilerinin güniçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6) ..... 134
Tablo 4.32. HPLC-DAD yöntemi ile çalışılan etkin maddelerin standart çözeltilerinin gözlenebilme sınırı ve tayin alt sınırı..... 135
Tablo 4.33. Farmasötik preparatlara katım yapılan çözeltilerin HPLC-DAD yöntemiyle elde edilen geri kazanım değerleri (n=6). ..... .....136
Tablo 4.34. HPLC-DAD yöntemiyle elde edilen güniçi ve günler arası plazmadan geri kazanım değerleri (n=6) ..... 137
Tablo 4.35. HPLC-DAD yöntemi ile matriks etkisi..... 138
Tablo 4.36. β-K (20 mg) içeren Carovit® yumuşak kapsülün miktar tayini..... 140
Tablo 4.37. α-T içeren (200 IU/134,23 mg) Evicap ® yumuşak kapsülün miktar tayini ..... 142
Tablo 4.38. MBS içeren (20 mg) Libavit K® ampulün miktar tayini ..... 143
Tablo 4.39. MBS (6,1 mg MN) içeren Libavit K® ampulün farklı pH'larda miktar tayini..... 144
Tablo 4.40. MBS (20 mg) içeren Libavit K® ampulün miktar tayini ..... 145
Tablo 4.41. HPLC-DAD yöntemiyle MBS (20 mg) içeren Libavit K® ampulün miktar tayini…….. 146
Tablo 4.42. HPLC-DAD yöntemiyle MBS (20 mg) içeren Libavit K® ampulün miktar tayini..... 147
Tablo 4.43. Farmasötik preparatlarda β-K, α-T, MBS'nin belirlenmesi için uygulanan yöntemlerin birbirleri ile karşılaştırılması (*F*-testi) MBS (20 mg) içeren Libavit K® ampulün miktar tayini ..... 148
Tablo 4.44. Carovit ilacı (100 mg β-K) verilen tavşanda (n=1) retinolün farmakokinetik parametreleri β-K (20 mg) içeren Carovit® yumuşak kapsülün miktar tayini ..... 150
Tablo 4.45. Evicap ilacı (400 IU α-T / kapsül) verilen tavşanlarda (n=3) α-T'nin farmakokinetik parametreleri..... 153
Tablo 4.46. Libavit K ilacı (100 mg / 10ml) verilen tavşanlarda (n=3) MN'nin farmakokinetik parametreleri ..... 154
Tablo 4.47. Çalışmaya alınan sağlıklı ve mesane kanserli gönüllü kişilerin özellikleri..... 156

Tablo 4.48. β-K içeren Carovit® (20 mg / kapsül) ilacı sağlıklı gönüllülere ve mesane kanserli hastalara oral olarak uygulandıktan sonra HPLC-DAD yöntemi ile elde edilen β-K ve retinol derişimleri ..... 159

Tablo 4.49. β-K içeren Carovit® (20 mg / kapsül) ilacı sağlıklı gönüllülere ve mesane kanserli hastalara oral olarak uygulandıktan sonra her iki gruptan elde edilen verilerin istatistiksel (*t*-testi) olarak karşılaştırılması ..... 160

Tablo 4.50. α-T içeren Evicap® (268,46 mg / kapsül) ilacı sağlıklı gönüllülere ve mesane kanserli hastalara oral olarak uygulandıktan sonra HPLC-DAD yöntemi ile elde edilen α-T derişimleri ..... 163

Tablo 4.51. α-T içeren Evicap® (268,46 mg / kapsül) ilacı oral olarak uygulanan sağlıklı gönüllülerden ve mesane kanserli hastalardan elde edilen verilerin istatistiksel (*t*-testi) olarak karşılaştırılması ..... 164

Tablo 4.52. MBS içeren Libavit K® (40 mg / 4 mL) ilacı sağlıklı gönüllülere ve mesane kanserli hastalara iv olarak uygulandıktan sonra HPLC-DAD yöntemi ile elde edilen MN derişimleri ..... 166

Tablo 4.53. MBS içeren Libavit K® (40 mg / 4 mL) ilacı iv olarak uygulanan sağlıklı gönüllülerden ve mesane kanserli hastalardan elde edilen verilerin istatistiksel (*t*-testi) olarak karşılaştırılması ..... 167

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde teknolojinin gelişmesiyle birlikte çevre kirliliğinin artması, hayat şartlarının giderek ağırlaşmasıyla artan stres ve sigara gibi insan hayatını olumsuz yönde etkileyen pek çok etken serbest radikal oluşmasına, buna bağlı olarakta hücrelerin değişmesine ve kontrolsüz olarak çoğalmasına (kansere) neden olmaktadır.

İnsan hayatını olumsuz etkileyen kanserle birlikte diğer birçok hastalığın önlenmesinde ve tedavisinde vitaminler önemli bir yere sahiptir. Vitaminler genellikle besinlerle, gerektiği takdirde de ilaç olarak alınabilmektedir.

Vitaminler, suda ve yağda çözünen vitaminler olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. A, E ve K vitaminleri yağda çözünen vitaminlerdendir. E vitamini; hücre zarını ve taşıyıcı moleküllerin lipid kısmını stabilize ederek hücreyi serbest radikaller, zehirli bileşikler, ilaç ve radyasyonun zararlı etkilerinden koruyan antioksidan vitaminlerden birisidir. Karotenoid türevi olan β-karoten (A vitamini, β-K) güçlü singlet $O_2$ temizleyicisi olup peroksi ve alkoksi radikalleriyle reaksiyon vererek lipit peroksidasyon zincir reaksiyonunu önleyen ve E vitamini ile sinerjik etki gösteren diğer bir antioksidan vitamindir. Kanın pıhtılaşma proteinlerinin (faktör 2, 7, 9 ve 10) karboksilasyonunda kofaktör olarak görev alan $K_3$ vitamini (menadion) ise, yüksek dozlarda çeşitli kanser hücrelerinde oksidatif bir mekanizma ile sitotoksik aktivite göstermektedir.

Literatürde, β-K'nın, retinolün, α-tokoferolün (α-T), menadionun (MN) ve menadion sodyum bisülfitin (MBS) plazma ve ticari preparatlarda miktar tayinine yönelik çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Ancak UV-Görünür Bölge, Birinci- ve İkinci-Türev Spektrofotometri yöntemleriyle farmasötik preparatlarda türevlendirmeksizin β-K ve MN'nin miktar tayinine yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Günümüzün ölümcül hastalıklarından önemli bir yere sahip olan kanserin önlenmesi için yapılan çalışmalarda beslenme alışkanlıklarının önemi ve vitamin tüketiminin koruyucu etkisi çok açık olmasa da gösterilmiştir. Mesane kanserli hastaların kandaki A ve E vitamini seviyelerinin kontrol grubuna göre belirlendiği çalışmalardan elde edilen sonuçlar ile A ve E vitamin tüketimi ile kansere yakalanma riski arasındaki ilişkinin belirlendiği çalışmalardan elde edilen sonuçlar birbirleri ile uyumsuzdur. Mesane kanserli hastalarda K vitaminin kan seviyesinin kontrol grubuna göre belirlendiği herhangi bir çalışmaya da rastlanılmamıştır. Ayrıca, vitaminlerin metabolizmasının ve farmakokinetiğinin birçok anlaşılamaz yönleri olduğu klinik olarak yapılan çalışmalarda belirtilmiştir.

Çalışmamızda, β-K, retinol, α-T, MN ve MBS'nin farmasötik preparatlarda (Carovit®, Evicap® ve Libavit K®) ve plazmada düzeylerinin belirlenmesi için Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC), UV-Görünür Bölge, Birinci Türev ve İkinci Türev Spektrofotometri yöntemleri geliştirilip geçerlilik testlerinin yapılması amaçlanmıştır. Geliştirilip geçerlilik testleri yapılan yöntemlerin uygulama aşamasında ise A, E ve K vitaminlerinin ilaç formülasyonlarının tek doz olarak yüksek dozlarda ayrı ayrı tavşana uygulayarak vitaminlerin sistemik dolaşıma geçme oranı ve farmakokinetik paramatrelerin belirlenmesi esastır. Ayrıca, hayvan çalışmalarından elde edilen veriler doğrultusunda mesane kanserli ve sağlıklı kişilere de ayrı ayrı tek doz uygulayarak A, E ve K vitaminlerin plazma düzeylerinin belirlenmesi ve sistemik dolaşımdaki davranışlarının incelenmesi amaçlanmıştır. Buna ilaveten sağlıklı kişiler ile kanserli kişilerin plazmasında A, E ve K vitaminlerinin düzeylerinin karşılaştırılması hedeflenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen bilgilerin mesane kanserinin önlenmesi ve tedavisi ve gelişimi aşamasındaki ileriki çalışmalara yardımcı olacağı düşünülmektedir.

# 2. GENEL BİLGİLER

## 2.1. Vitaminler

Vitaminler, sağlıklı beslenme için küçük miktarlarda alınmaları zorunlu olan, herhangi birinin eksikliğinde spesifik bir bozukluk veya hastalık meydana gelen organik maddelerdir.

James Lancaster, 1601 yılında gemi tayfalarının diyetlerine turunçgil meyvelerini eklediğinde gemiciler arasında oldukça yaygın olan diş etlerinin kanaması, dişlerin düşmesi ve genel durumun bozulmasıyla belirlenen bir hastalığa karşı koruyucu bir etkinin olduğunu belirlemiştir. 1882 yılında Takaki'de Japon gemicilerin diyetlerine et, arpa, meyve eklendiğinde beriberi olarak bilinen deri hastalığının tedavi edildiğini gözlemlemiştir. 1912 yılında da Hopkins, süt içermeyen, karbonhidrat, yağ, protein ve tuzlardan ibaret sentetik bir diyetle beslenen sıçanların normal olarak büyümediklerini; fakat diyetlerine hayvan başına günde 2 mL süt eklemekle büyümenin normale döndüğünü ve süt eklenmiş diyetle beslenen sıçanların diyetinden sütün çıkarılmasıyla büyümede durmanın olduğunu tespit etmiştir. Hopkins, bu gözlemlerinden sütte hayvanın büyümesi ve yaşaması için gerekli faktör veya faktörlerin bulunduğu sonucunu çıkarmış; büyüme ve yaşama için gerekli bu faktörlere vitaminler demiştir.[1]

Vitaminler, suda ve yağda çözünen vitaminler olmak üzere iki sınıfa ayrılır; ayrıca doğada vitamin benzeri bileşikler de mevcuttur.

***Suda Çözünen Vitaminler:*** Kimyasal yapıları birbirinden çok farklı olan $B_1$ vitamini (tiamin), $B_2$ vitamini (riboflavin), nikotinik asit (niasin), $B_5$ vitamini (pantotenik asit), $B_6$ vitamini (pridoksin), biotin (vitamin H), folik asit, $B_{12}$ vitamini ve C vitamini (askorbik asit) suda çözünen polar yapılı vitaminlerdir. Suda çözünen

vitaminlerden $B_{12}$ ve C vitaminin dışındaki vitaminler depolanamadıklarından dolayı sürekli olarak besinle alınmaları gereklidir.

***Yağda Çözünen Vitaminler:*** A, D, E ve K vitaminleri yağda çözünen vitaminler olup hepsi izopren türevi apolar moleküllerdir.

***Vitamin Benzeri Bileşikler:*** Kolin, karnitin, α-lipoik asit, p-aminobenzoat (PABA), inozitol, koenzim Q gibi vitamin benzeri bileşikler suda çözünürler ve bazı biyokimyasal tepkimelerde katalitik etki gösterirler. Vücutta sentezlenemediklerinden dolayı dışarıdan besinlerle alınmaları gerekir.[1,2]

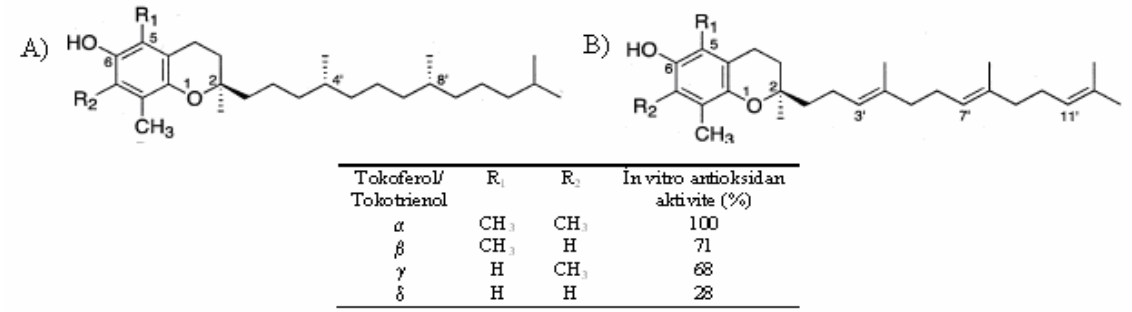
### 2.1.1. E Vitamini

#### 2.1.1.1. E vitamininin Kimyasal Bileşimi

Tokol (2 metil,-2 fitil-6-hidroksi kronom) basit yapısına sahip olan dört tokoferol ve dört trienolden oluşan sekiz moleküllü bir aile için E vitamini terimi kullanılır. Tokoferoller 5, 7 ve 8 pozisyonlarında metil gruplarının farklı substitasyonu ile bir kronom zincirinden ve 16 karbonlu doymuş bir fitil yan zincirinden oluşur (Şekil 2.1A) ve birçok izomerleri mevcuttur.

Tokotrienoller ise tokoferoller ile aynı şekilde sübstütie olmuş metil gruplarını içeren bir kronom zincirinden ve 3, 7 ve 11 pozisyonlarında çift bağlı 16 karbonlu doymamış bir isoprenoid yan zincirinden oluşur[3] (Şekil 2.1B).

Bitkisel yağlar ve tohumlar zengin E vitamini kaynaklarıdır. Yer fıstığı, soya fasulye, ayçiceği çekirdeği, kuru fasulye, badem, pamuk yağı ve keten tohumunda bol miktarda; yumurta, tahıl, balık, zeytinyağı, süt ve süt ürünlerinde ise az miktarda bulunur.[4]




| Tokoferol/ Tokotrienol | $R_1$ | $R_2$ | İn vitro antioksidan aktivite (%) |
|---|---|---|---|
| α | $CH_3$ | $CH_3$ | 100 |
| β | $CH_3$ | H | 71 |
| γ | H | $CH_3$ | 68 |
| δ | H | H | 28 |

Şekil 2.1: Kimyasal yapı A) Tokoferol B) Tokotrienol

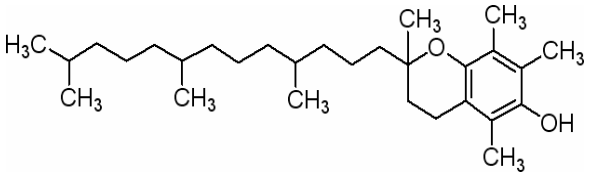
### 2.1.1.2. E Vitamininin Keşfi

1922'de ilk olarak Evans ve Bishop tarafından hamile sıçanlarda fetüsün normal gelişimi için faktör X olarak adlandırılan bir bileşiğe ihtiyacın olduğu belirlenmiş ve daha sonra bu bileşik E vitamini ve tokoferol olarak adlandırılmıştır. E vitamini aktivitesine sahip α-, β- ve γ-T olarak adlandırılan bileşikler daha sonraki çalışmalarda izole edilmiştir. 1937'de α-T'nin yapısı açıklanmış, bir sene sonra sentezi yapılmış ve E vitamininin biyokimyasal fonksiyonlarının tam olarak belirlenmesi daha sonraki çalışmalara konu olmuştur.

E vitamini ilk zamanlarda sıçanlardan biyoanaliz yöntemleri ile analiz edilirken daha sonra Emmerie-Engel tarafından geliştirilen yöntem ile analiz edilmeye başlanmış ve uzun yıllar boyunca bu yöntem kullanılmıştır. Bu yöntem 2,2'-dipridil ile $Fe^{+3}$'ün $Fe^{+2}$'ye indirgenmesi ve kolorimetrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır.[5]

### 2.1.1.3. α-Tokoferol

α-Tokoferol, E vitaminin yaklaşık olarak % 80'ini oluşturan ve biyolojik aktivitesi ile antioksidan etkisi en fazla olan bir E vitamini bileşenidir.[5,6,7] 5, 7, 8 trimetiltokol yapısında olup (Şekil 2.2) yapısındaki fenolik hidroksil guruplu aromatik halka vitaminin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturmaktadır.[6]




Şekil 2.2 : α-Tokoferolün kimyasal yapısı

α-Tokoferolün molekül formülü $C_{29}H_{50}O_2$ olup molekül ağırlığı 430,71'dir. Rengi sarı-kırmızı, sıvı formda ve yoğunluğu 0,950 g/mL (20°C)'dir. Hekzan, DMSO ve alkolde çözünürken; suda çözünmez. 292 nm ve 298 nm dalga boyunda maksimum absorbans gösterir ve 2–8°C'de depolanmalıdır.[8]

**2.1.1.4. E Vitamininin (α-Tokoferol) Biyokinetiği**

E vitamini ince bağırsaktan pasif difüzyonla emilerek lenf sistemine oradan da β-globüline bağlanarak kan yoluyla karaciğere taşınır. Hücre mebranının etrafını sararak koruyucu bir tabaka oluşturur. E vitamini karaciğerden çok yağ dokularında depolanır. Çok az miktarda da kalp, adele dokusu, testis, uterus, böbrek üstü bezi ve beyinde depo edilir. Depolanmayan kısmı ise genellikle dışkı ile atılır.

Vücutta biyolojik ve kimyasal proseslerin yüksek derecede meydana geldiği karaciğer, beyin, böbrek ve dalak gibi organlarda oluşabilecek oksidatif hasarlardan bu organların korunmasında E vitamininin büyük bir rolü vardır. E vitamininin plazma düzeyi 5–18 μg/mL arasında değişirken; serum derişimi ise ortalama olarak 10,76 μg/mL'dir.[7] R,R,R-α-T'nin eliminasyonu yaklaşık olarak 48 saat olup α- ve γ-tokotrienoller için bu süre yaklaşık olarak 4 saattir.[1,3]

**2.1.1.5. α-Tokoferolün Antioksidan Özelliği**

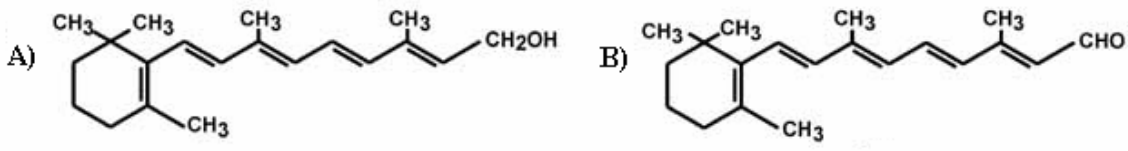
Zincir kırıcı antioksidan bir özelliğe sahip olan E vitamini, hücre membran fosfolipitlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikal ($O_2^{*-}$, OH*,

singlet $O_2$, lipit peroksit radikalleri ve diğer radikaller) etkisinden koruyan ilk savunma elemanı olup bir molekül E vitamini 100 molekül yağ asidi peroksidasyonunu engelleyebilmektedir.[9,10] Serbest radikallerin kanserin başlamasında rol aldığı ve E vitamininin diğer antioksidanlar gibi antikanserojen etki göstererek kanserin yayılmasını ve gelişmesini önlediği bildirilmektedir.[3,9,10]

### 2.1.2. A Vitamini

#### 2.1.2.1. A Vitamininin Kimyasal Bileşimi

A vitamini besinler içinde çeşitli vitaminler ve prekürsörleri halinde bulunurlar. A vitaminlerin vücutta en yaygın ve önemlisi retinoldür. Kimyaca izopren birimlerinden oluşan doymamış alifatik zincirinin ucunda β-iyon (siklohekzenil) halkası içeren ve yağda çözünen primer bir alkoldür (Şekil 2.3A). Işığın varlığında retinol ve onun türevleri izomer karışımlarına dönüşürler. Bütün retinoidler özellikle geçiş elementlerinin varlığında oksidasyona ve peroksidasyona hassastırlar. Retinal, retinolün oksidasyonu sonucu oluşan bir aldehittir (Şekil 2.3B).[11]




Şekil 2.3: Kimyasal yapı A) Retinol B) Retinal

Retinoik asit vücutta indirgenmez ve bu yüzden de retinol ve retinale dönüşemez. Retinoidlerin yan zincirindeki doymamış bağlar etrafında meydana gelen

konfigürasyonlar sonucu birçok cis-trans izomerleri oluşur.[11] A vitamini kaynağı genelikle besinlerle alınan karotenoidlerdir.

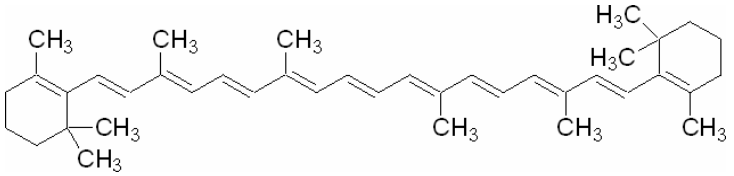
Karotenleri içeren bitkisel besinler; sarı ve kırmızı renkli bazı sebze ve meyveler (havuç, domates, patates, elma, kayısı, şeftali ve bazı kavun türleri) ve bazı yeşil yapraklı sebzeler (ıspanak, pancar yaprağı vb) dir. Bunların yanında karaciğer, balık, süt ve yumurta sarısında da A vitamini bulunur.[12]

**2.1.2.2. A Vitamininin Keşfi**

Renkli bitki pigmentleri olan karotenoidler 1800'lü yılların başlarından itibaren biyoloji ve kimya bilim dallarının ilgi konusu olmuş, tanınması ve kimyasal sınıflandırmaları ise ilk olarak 1920'de gerçekleştirilmiştir. Karotenoidler üzerine ilk bilimsel çalışma da 1971'de yapılmıştır.[11,13]

**2.1.2.3. β- Karoten**

A vitamini prekürsörü olan karotenoidler (provitamin A) bitkisel besinlerde bulunur. Bunların başlıcaları α, β, γ ve δ karotenlerdir. Diğer yaygın karotenoidler, farklı zincir sistemleri içeren ve izole edilmiş çift bağların sayısında çeşitlilik gösteren hidroksi, aldehit, okso veya epoksi sübstitientlerinden oluşur. Son zamanlarda yapılan araştırmalara göre 563 farklı karoten vardır ve bunlara ek olarak all-trans karotenoidlerinin çoğunun cis izomerleri de vardır. Karotenoidler içinde en etkili ve en önemlisi β-K'dır. β-K molekülü iki uç kısmında 2 β-ionon halkası ve 11 konjuge çift bağ içeren 8 izopren biriminden oluşan 40 karbonlu simetrik bir moleküldür (Şekil 2.4). β-K, A vitamini prekürsörü olması yanında biyolojik olarak lipitte çözünen antioksidan olması ve serbest oksijen radikallerini nötralize etmesi yönünden iki önemli özelliğe sahiptir. Karotenoidler ışığa ve sıcaklığa hassas olup hemen parçalanırlar.[11]



Şekil 2.4: β-Karotenin kimyasal yapısı

β-K molekül formülü, $C_{40}H_{56}$ olup molekül ağırlığı 536,87'dir. Rengi kırmızı, kristal formdadır.[14] Hekzan, DMSO ve klorofomda çözünürken suda çözünmez.

450 nm ve 478 nm dalga boylarında maksimum absorbans gösterir ve -20°C'de depolanmalıdır.[11]

**2.1.2.4. A Vitamininin (β-karoten, Retinol, Retinal) Biyokinetiği**

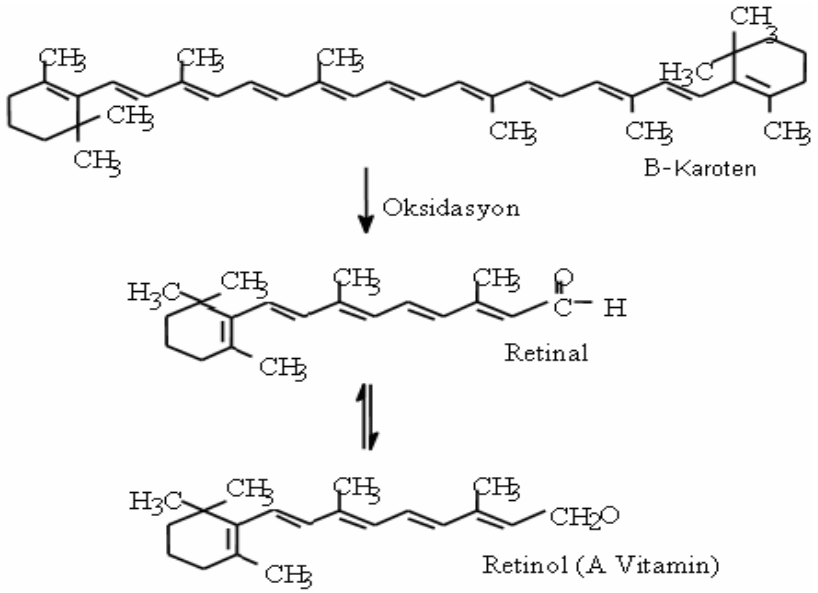
β-Karoten, oksijen ve safra tuzlarının mevcudiyetinde β-K-dioksigenaz enzimin etkisi ile orta kısmından ikiye parçalanması sonucunda oluşan retinal; bağırsak mukozasında retinal redüktaz enziminin etkisi ile retinole, küçük bir kısmı da retinoik aside dönüşür. Retinol ve retinaller birbirlerine kolaylıkla dönüşebilmektedirler (Şekil 2.5). Retinol, doymuş yağ asitleriyle ester yaparak lenf şilomikronları yolu ile kan dolaşımına girerken retinoik asitte plazmada albümine bağlanarak taşınır.

Besin içinde bulunan β-K'nın kısmen absorbe edilmesi ve kısmen retinole dönüşmesi nedeniyle vitaminin biyoyararlanımı, kimyasal olarak oluşturabileceği maksimum retinol miktarının ancak 1/6'sıdır.

Retinol ince bağırsakta epitel hücrelerinde kolaylaştırılmış difüzyon ile absorbe edilirken, β-K basit difüzyon ile absorbe edilir.[7,15,16]

Özellikle A vitamini eksikliğinde karanlıkta görme kusuru, körlük ve çeşitli organların epitel dokularında keratinizasyona neden olur ve gözlerde kseroftalmi meydana gelir.

β-Karotenin toksisitesi bildirilmemiş fakat fazla miktada alınan β-K ihtiyaca göre A vitaminine dönüştüğü için büyük bir zararı olmadığı sadece ciltte pigment birikiminden dolayı geçici bir sararma meydana geldiği, çok fazla miktarda alındığında ise karaciğer hasarı başta olmak üzere çeşitli toksik etkilerinin olabileceği belirtilmektedir. A vitaminin erişkinlerde günlük alım ihtiyacı 2–6 mg (≈3350 IU) arasında değişmektedir. Bu alım miktarı 8 mg'ı aştığı zaman bulantı, saç dökülmesi ve baş ağrısı, çok daha yüksek dozlarda ise karaciğer hasarı oluşabilmektedir.[12]




Şekil 2.5: β-Karotenden, retinal ve retinolün meydana gelişi

### 2.1.2.5. A Vitamininin Antioksidan Özelliği

Son derece güçlü singlet $O_2$ temizleyicisidir. Ayrıca peroksi ve alkoksi radikalleriyle de doğrudan reaksiyon vererek lipit peroksidasyon zincir reaksiyonunu önleyebilir. Serbest radikallerle doğrudan reaksiyona girer. Özellikle düşük oksijen

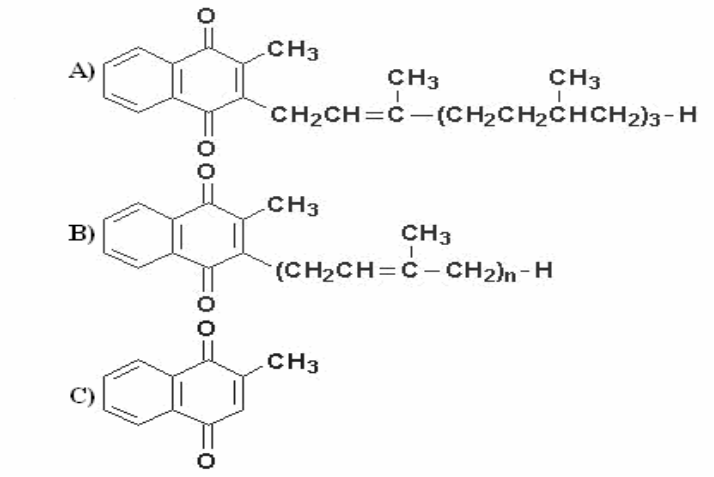
basınçlarında çok etkilidir ve E vitamini ile sinerjik etki gösterir. Toksik oksijen radikallerinden singlet oksijeni inaktif oksijene indirger. Örneğin yüksek dozlarda β-K anormal porfirin birikimi olan hastalarda ışığa duyarlılığı azaltır ve yine yüksek dozda insanlarda kanser gelişimini önleyebilir.[17]

Burton ve Ingold,[18] β-K'nın organizmada A vitamininin ölçütü olması yanında bir antioksidan olarak görev yaptığını belirtmiştir. Yine aynı çalışmada β-K'nın bir lipit peroksi radikali ile güçlü bir şekilde reaksiyon verdiğini bildirmişlerdir. Krinsky[19] ise β-K'nın iki, üç ve hatta dört radikali birden söndürebileceğini bildirmiştir.

### 2.1.3. K Vitamini

#### 2.1.3.1. K Vitamininin Kimyasal Bileşimi

2-metil-1,4-naftokinon grubu içeren ve poli izoprenoid bir zincirle substitüe edilmiş olan çeşitli naftokinon türevleri K vitamini etkinliği gösterir ve genelde K vitamini olarak isimlendirilmektedir.[20] K vitamini üç formda bulunur, bunlardan ikisi doğaldır. 1- $K_1$ vitamini (fitonadion, filokinon) 2-metil-3-fitil-1,4-naftakinon (Şekil 2.6 A) kimyasal yapısına sahip olan öncelikle yiyeceklerden alınan ve alındığı formuyla dolaşıma katılan K vitamin türüdür.[21] 2- $K_2$ vitamini (menakinon) naftokinonun üçüncü pozisyonunda multi izopren üniteleri ile birçok vitaminleri kapsar (MK-1, MK-14) (Şekil 2.6B). Fermente edilmiş yiyeceklerde ve bağırsaklarda bulunur. Bağırsak mikroflorası tarafından sentez edilmektedir.[22,23] 3- $K_3$ vitamini (menadion, 2-metil-1,4-naftokinon) yağda çözünen sentetik olarak üretilen en basit yapılı K vitamini türevidir (Şekil 2.6C). Bu vitaminden türeyen MBS ve menadion sodyum difosfat suda çözünen K vitamini türevidir.[21]




Şekil 2.6: Kimyasal yapı A) Filokinon B) Menakinon ($K_2$ vitamini) C) MN ($K_3$ vitamini)

Menadionun alkol çözeltileri nötraldir. 120°C ye kadar ısıtıldığında bozunmadan kalabilirken ışıkta bozunmaktadır. MN molekül formülü, $C_{11}H_8O_2$ olup molekül ağırlığı 172,2'dir. Rengi sarı, kristal formdadır. Hekzan, DMSO ve alkolde çözünürken suda çözünmez. 245 nm, 251 nm ve 333 nm dalga boyunda maksimum absorbans gösterir ve 2–8°C'de depolanmalıdır.[24] K vitamini yaprak şeklindeki bitkisel besinlerin genellikle hepsinde (özellikle ıspanak ve lahana), karnıbahar, domates, bezelye, patates, zeytinyağı, soya yağı ve hububat türlerinde, ayrıca karaciğer, balık yağı, yumurta sarısı ve inek sütünde de bulunmaktadır.[2,7]

**2.1.3.2. K Vitamininin Keşfi**

İlk olarak, Henrick Dam K vitaminini tanımlamış ve 1934 yılında Nobel Barış Ödülü'nü almıştır. K vitamininin saf hali olan filokinon 1939 yılında bitkilerden elde edilmiş ve azalmış protrombin seviyesi ile belirlenen beslenme eksikliğinin tedavisi için kullanılmıştır.[25]

### 2.1.3.3. K Vitamininin (Filokinon, Menakinon, Menadion) Biyokinetiği

K vitamini, yağda çözünen diğer vitaminlere benzer şekilde, besinlerdeki yağların absorbsiyonuna benzer bir mekanizma ile absorbe edilmektedir. K vitamini oral veya parenteral yolla uygulanır. Safra tuzlarının varlığında gastrointestinal kanaldan absorbe edilir. Yağ absorbsiyonunu bozan durumlar ile yağdan fakir beslenenlerde K vitamini absorbsiyonu azalır. Fakat bu şartlarda sentetik K vitamininin absorbsiyonu bozulmaz.

K vitamininin günlük alınım ihtiyacı, 6 aydan küçük bebeklerde 5 µg/gün, 1–3 yaş çocuklarda 15 µg/gün, 10 yaşa kadar 30 µg/gün, erişkin bayan ve erkeklerde sırası ile 90 ve 120 µg/gün ve 65 yaş ve üstü yaşlılarda ise kemik kırılması ve osteoporoz riskine karşı 250 µg/gün olup yaşa bağlı olarak değişmektedir.[2,7]

K vitamini, kan koagülasyonunda önemli bir rol oynar. Osteokalsin ve matriks Gla proteinleri ile birlikte aktif protrombin (faktör II), prokonvertin (faktör VII), plazma tromboplastin kompenenti (faktör IX) ve stuart faktörü (faktör X) sentezinde gerekli olan bir kofaktördür. K vitaminin diğer önemli fakat belki de az bilinen diğer bir rolü antikoagülant olarak işlev gören protein C ve protein S'in sentezinde görev almasıdır.[26] Bu vitamin K'ya bağlı olan proteinler kalsifikasyon ve homeostasisde önemli rol oynarlar. Ek olarak bazı araştırmalarda, kemik sağlığında K vitamininin önemli bir rolü olduğu belirtilmekte ve K vitamini içeren modifiye edilmiş bir diyetin osteoporozu önlediği[27] (insanlarda[28] ve kemirgen hayvanlarda[29]) ve kemik erimesini azaltığı belirtilmektedir. K vitamininin kemik deformasyonunu onardığı ve kortikosteroidlerin sebep olduğu kemik kaybını önlediği belirtilmektedir[30,31]. Başka bir çalışmada sentetik $K_3$ vitamininin (MN), yüksek dozlarda çeşitli kanser hücrelerine karşı antitümör aktivite gösterdiği bulunmuştur.[32,33]

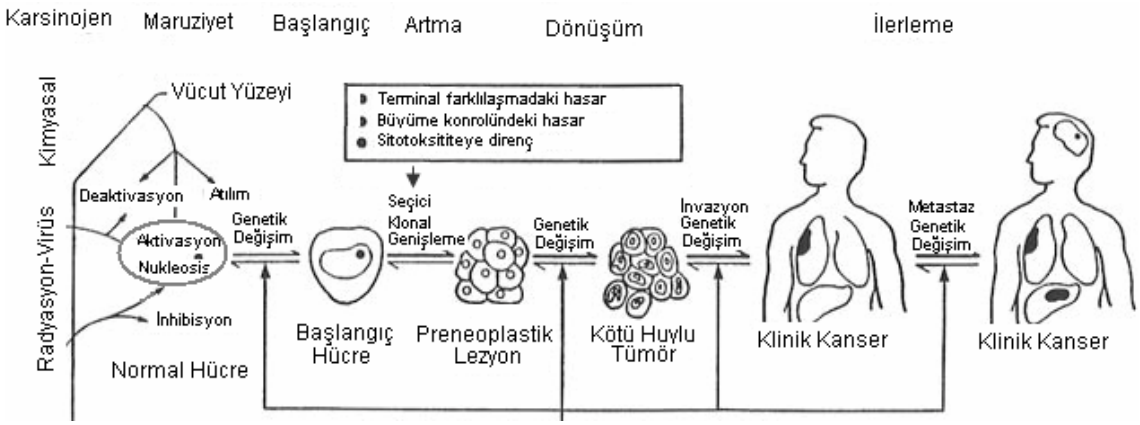
### 2.1.3.4. K Vitamininin Oksidan Özelliği

$K_3$ vitamini, tirazin fosforilasyonu aracılığı ile hücreler arası iletişimi etkiler.[34] MN hücre kültür çizgilerinin değişikliklerine karşı sitotoksik aktivite gösterir ve osteoklast ve osteoblast gibi kültür hücrelerinin peroksit ve süperoksit radikal seviyelerini yükselterek apoptosisi artırabilir.[32,33]

Bu teoriyi destekleyen MN'nin malign hücrelerde oksidatif stresi artırdığı gözlemlenmiştir. Oksidatif stres MCF–7 (kanser hücresi) hücre kültüründe MN'nin varlığında üretilen hidroksil radikallerinin DNA'yı bozduğu tespit edilmiştir. Hidroksil radikalleri değişik geçiş metalleri ve bir Fenton reaksiyonu ile süperoksit radikallerden ileri gelir. Aynı zamanda bu teoriyi destekleyen glutatyon ve enzimler (katalaz ve süperoksit dismutaz) gibi antioksidanların MN'nin oksidatif stresini azaltan süperoksit ve hidrojen peroksiti bastırdığı gösterilmiştir. Oksidatif stresde azalmanın MN'nin antikanser etkisini azalttığı gösterilmiştir. Kısaca, yapılan çalısmalarda $K_3$ vitamininin hücre içine girdiğinde yabancı bir madde olarak algılandığı ve hücreden uzaklaştırılabilmek için çesitli enzimler yardımı ile redoks döngüsüne girdiği belirlenmiştir. Döngü sırasında $K_3$ vitamini, elektronunu kaybederek yükseltgenmesi ve sonra ortamda bulunan oksijen ile reaksiyona girerek, hücre içinde reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşmasına sebep olduğu tespit edilmiştir. Hücre içinde bulunan ROT miktarının artması sonucunda hücre ölümü gerçekleştiği ve oluşan olumsuz koşulların hücre döngüsünü baskıladığı belirtilmiştir. Bununla birlikte, askorbik asit ile kombine edildiğinde MN'nin etkinliğinin arttığı söylenmiştir..[34] $K_3$ vitamini için oksidatif etki mekanizmasının başka bir yönüde MN tarafından hücre içindeki tiollerin glutatyon ve/veya sülfidril içeren proteinlerin azalması ile sonuçlanan direkt arilasyonlarını içerir.[35]

## 2.2. Kanser (Neoplazi)

Sözcük anlamı, yeni gelişme, yeni büyümedir (neo: yeni; plazi: gelişme, büyüme). Kanser, bazı etkilerle değişime uğramış hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalıp büyümelerinin sonucu oluşan kötü huylu hastalıklar grubudur (Şekil 2.7). Kanser hemen hemen her organda görülmektedir.[36]




Şekil 2.7. Kanserin oluşum şeması

### 2.2.1. Mesane Kanseri

İdrar torbası olarak ta bilinen mesane her iki cinste de bulunur. Boş olduğunda simphisis pubis arkasında yer alan, rezarvuar görevi yapan pelvik bir organdır. Erişkinlerde kapasitesi yaklaşık olarak 340–400 mL'dir. [37,38]

Her organda olabildiği gibi mesanede de kötü huylu (malign) ya da iyi huylu (benign) tümörler gelişebilir. Mesane kanseri, genito üriner kanserler içinde en sık görülenidir. Beyaz ırkta daha fazla görülür. Dünyada erkeklerde görülen maligniteler sırasında dördüncü sırada, ülkemizde ise üçüncü sırada yer almaktadır. Kadınlarda ise

mesane kanseri üriner sistemde en sık görülen tümör olup genel kanser sıralamasında sekizinci sırayı almaktadır. Mesane kanseri tüm malign hastalıkların % 4–10'unu, üroepitelyal tümörlerin ise % 90'ını oluşturmaktadır. Ortalama görülme yaşı atmışbeş olup atmış yaşından sonra görülme sıklığı gittikçe artar. Kırk yaşın altında % 1 oranında görülür. Son yıllarda mesane kanseri insidansında artış gözlenmektedir. Bu artış sanayileşmenin hızla ilerlemesine ve sigara içme oranındaki artışa bağlıdır. Mesane kanseri nedeniyle yılda ortalama yüz bin kişinin hayatını kaybettiği tahmin edilmektedir. Bu sayı maliginitelerin neden olduğu tüm ölümlerin % 5'ini oluşturmaktadır. Tanı konulduğunda % 85 oranında lokalize iken % 15 oranında uzak metastazlar mevcuttur.[39,40]

Mesane kanserinin etiyolojisi diğer kanserlerde olduğu gibi tam olarak belirlenememiş olmakla birlikte, bazı risk faktörleri ve potansiyel karsinojenler üzerinde durulmaktadır. Bu faktörler; çevresel faktörler ve beslenme alışkanlıkları,[41] genetik predispozisyon,[42] triptofan metabolitleri[41], sigara,[43] endüstriyel karsinojenler,[40,43] enfeksiyon ve irritasyondur.[40,43]

## 2.3. Litaratür Özetleri

### 2.3.1. A, E ve K Vitaminleri ile İlgili Çalışmalar

#### 2.3.1.1. A Vitamini

Mettlin ve Graham,[44] diyetle düşük A vitamini alan kişilerin mesane kanserine yakalanma riskinin daha yüksek olduğunu; La Vecchia ve ark.[45] havuç ve yeşil sebze tüketiminin az olduğu durumlarda mesane kanserine yakalanma riskinin arttığını; Paganini Hill ve ark.[46] yüksek miktarda β-K tüketen insanlarda yaşla ilişkili mesane kanseri görülme insidansının daha düşük seviyede olduğu belirlemişlerdir.

Kolonel ve ark.[47] mesane, akciğer ve prostat kanseri ile A ve C vitaminlerinin alımı arasındaki ilişkiyi araştırmışlar ve mesane kanserli hastaların her iki vitamin alımının kontrol grubuna göre daha az olduğunu ve A ve C vitaminlerinin mesane kanseri üzerinde koruyucu bir etkisinin olduğunu belirtmişlerdir.

Steineck ve ark.[48] beslenmelerinde vitamin takviyesi içermeyen kişilerde yaptıkları çalışmada, C vitamini ve β-K alımı ile mesane kanseri arasında ilişki bulamamışlardır.

Nomura ve ark.[49] erkeklerde koyu yeşil sebzelerin bayanlarda ise C vitaminin tüketiminin artması ile kanser oluşma riskinde bir azalma olduğunu belirlemişlerdir.

Wald ve ark.[50] Londra'da 22000 erkeğin katıldığı bir çalışmada erkeklerin serum örneklerini toplamışlar, uzun süre depoladıktan sonra β-K analizi yapmışlar ve kanser gurubundaki ortalama β-K seviyesinin kontrol gurubundan istatistiksel olarak önemli derecede daha düşük olduğunu belirtmişlerdir.

Knekt ve ark.[51] 1968–1977 yılları arasında mesane kanserli hastaların ve kanser oluşmamış kontrol gurubu kişilerin dondurulmuş serum örneklerinde retinolü, retinole bağlanan proteini ve β-K derişimlerini ölçmüşler ve retinol ve β-K ile kanser arasında bir ilişkinin olduğunu belirtmişlerdir.

Stähelin ve ark.[52] 1971–1973 yılları arasında 2974 erkeğin katıldığı çalışmalarında, A, C ve E vitaminleri ile birlikte karotenin plazma derişimlerini ölçmüşlerdir. Tüm kanserlerde A vitamini ve karotenin düşük plazma seviyelerini ve özellikle yaşlı kişilerde retinolün düşük plazma seviyesi ile kaydedeğer artmış bir risk ile ilişkilendirmişlerdir.

Comstock ve ark.[53] 1974-1975 yılları arasında Washington'da 25802 gönüllünün serum örneklerini analiz etmişler ve mesane kanserinde yüksek serum β-K seviyesinin

anlamlı koruyucu bir etkisinin olduğunu ve yüksek serum E vitamini seviyesinin ise etkili bir ilişkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Hung ve ark.[54] mesane kanseri ile plazma vitamin derişimi arasındaki ilişkiyi belirlemişler ve sigara içimi ile karotenoidlerin etkilerini değerlendirmişlerdir. Plazmada lutein, zeaksantin, β-kriptoksantin, likopen, α-K, β-K, retinol, α-T ve γ-T miktar analizlerini HPLC yöntemiyle gerçekleştirmişlerdir. Sonuçta, hastaların yaşları, cinsiyeti, eğitimi ve sigara içmeleri göz önüne alınmış olup mesane kanseri üzerinde karotenoidlerin koruyucu etkisinin olduğunu ve aynı zamanda vitaminlerle beslenen sigara içenlerin mesane kanserine yakalanma riskinin daha az olduğunu belirtmişlerdir.

**2.3.1.2. E Vitamini**

1982'de, α-T sussinat kanser hücrelerinin büyüme inhibisyonunda bir rolü olduğu gösterilen ilk E vitamini analoğu olduğu belirtilmiş ve bugüne kadar bu etki birçok kanser hücresinde gösterilmiş fakat insan prostat kanser hücrelerinin büyüme inhibisyonunda rasemik α-T ve α-T asetattan daha etkin olduğu belirtilmiştir. α-T'nin ise diyetle yüksek seviyede alınmasının mesane kanseri gelişme riskini önemli derecede azalttığı ve Amerikada α-T'den daha fazla tüketilen γ-T'nin mesane kanseri üzerine koruyucu etkisinin olmadığı belirtilmiştir.[55,56]

Mirvish,[57] hayvanlar üzerinde yaptığı çalışmalar sonunda, bir antioksidan olarak E vitamininin mesane kanserinin oluşumunda yardımcı olan nitrozo bileşiklerini indirgediğini ve böylece mesane kanseri oluşma riskini azalttığını belirtmiştir.

Ayrıca, γ-T'nin DU-145 prostat karsinoma hücrelerinin hücre döngü prosesinin inhibisyonunu gerçekleştirdiği[58] başka bir çalışmada da γ-T ile sinyal veren (1–10 μM) ve daha küçük boyuttaki α-T (50 μM) ile ilişkili benzer bir etki PC-3 prostat kanser hücresi dizisinde olduğu gösterilmiştir.[59]

### 2.3.1.3. K Vitamini

K vitaminin antitümör etkisi 1947'den beri inceleme altındadır.[35,60] MN'nin antikanser aktivitesinin hem kemirgenlerin[61-63] hem de insanların[64-66] kanser hücrelerinde yapılan birkaç in vitro çalışmada gösterilmiştir. Ayrıca, MN birçok ilaca dirençli lösemik hücrelerine karşı etkin olduğu bildirilmektedir.[64] Yapılan başka bir çalışmada, $K_3$ vitamini ile C vitamini kombinasyonunun kemoterapi ve radyoterapi verilmeksizin kullanımı, hem in vivo hem de in vitro anti kanser etkileri gösterilmiştir.[67,68]

Venugopal ve ark.[67] 100/1 oranındaki C ve $K_3$ vitaminlerinin karışımının ürolojik kanser hücre sayısını azalttığını belirlemişlerdir. Benzer sonuçları Ervin ve ark.[68] 2,13 μM $K_3$ vitamini ile 212 μM C vitamini karışımının sitotoksik etkisi, bir CD50 (% 50 sitotoksik doz) değeri ile mesane karsinoma hücrelerinde ve androjenden bağımsız insan prostat hücrelerinde gözlemlenmiştir. $K_3$ ve C vitaminlerinin karışımının uygulaması ile sadece $K_3$ vitaminin uygulaması karşılaştırıldığında $K_3$ ve C vitamininin birlikte uygulanmasının sitotoksik etkiyi 5 ila 20 kat artırdığı belirlenmiştir.[67]

### 2.3.1.4. A ve E Vitaminleri

Helzlsouer ve ark.[69] mesane kanser gelişimi ve serum besinleri arasındaki ilişkiyi incelemek için, 1974'de Washington'da 25802 kişiden toplanan serumlarda selenium, α-T, likopen, β-K, retinol ve protein bağlı retinol derişimlerini belirlemişlerdir. 12 yıllık takip periyodunda α-T derişiminin mesane kanseri gelişmiş kişilerin kontrol grubuna göre önemsiz seviyede düşük olduğunu göstermişlerdir. Mesane kanseri gelişmiş gruplarda ve kontrol guruplarında, retinol, proteine bağlı retinol ve β-K'nın derişimlerini benzer değerlerde belirlemişlerdir.

Holland ve ark.[70] Fin'li sigara içen sağlıklı erkeklerde mesane kanseri üzerine β-K ve E vitamininin koruyucu etkisini araştırmış ve bu vitaminlerin mesane kanseri gelişiminde önleyici etkisinin olmadığını saptamıştır.

Michaud ve ark.[71], sigara içen erkekler arasında yaptıkları bir çalışmada mesane kanser riski ile meyve ve sebze diyeti ile alınan A, E ve C vitaminleri arasındaki ilişkiyi 11 yıl boyunca araştırmışlardır. Çalışılan grubların yaş, sigara içme ve enerji alımı dikkate alınmış olup meyve ve sebze tüketimi ile mesane kanser riski arasında bir ilişiki belirlenememiştir (relatif risk: 1,28, % 95 güven aralığında). Ayrıca, α-T, β-K, likopen, lutein/zeakstin, β-kritokzantin, folat ve E, A ve C vitaminleriyle mesane kanserine yakalanma riski arasında da bir ilişki belirleyememişlerdir.

Albanes ve ark.[72] kanserin önlenmesi ve kanserin görülme sıklığı üzerine α-T ve β-K'nın etkilerini araştırmışlardır. 2x2 faktoriyel çalışma tasarımında yaşları 50–69 arasında olan 29133 gönüllü erkeği rastgele ikiye bölmüşler ve 50 mg α-T ile 20 mg β-K vermişlerdir. β-K verilen grup vitamin almayan gruplar ile karşılaştırıldığında, akciğer, prostat ve mide (sırasıyla 402'de 474, 112'de 138 ve 56'da 70) kanserine yakalanmada bir artış gözlenirken, mesane kanseri ve diğer kanser türlerinde bir artış gözlemlenmemiştir. E vitamini verilen grup ile vitamin almayan gruplar karşılaştırıldığında, prostat ve kolerektum kanserine yakalanma riskinin daha az (151'de 99 ve 81'de 68), mide kanserine yakalanma riskinin daha çok (56'da 70) olduğunu belirtmişlerdir.

Ross ve ark.[73] iskoç erkeklerinin plazmasında, major karotenoidlerin miktarını HPLC yöntemi ile ölçmüşler ve sigara içme alışkanlığının etkilerini araştırmışlardır. Karotenoidlerin ve E ve C vitaminlerinin derişimini yaşça benzer (50–59 yaş arası) olan 50 sigara içen erkek ve 50 sigara içmeyen erkekten alınan plazma örneklerinde

belirlemişlerdir. Sigara içenlerin plazmasında içmeyenlere kıyasla kayda değer daha az α-K, β-K, β-kriptoksantin ve C vitamin miktar düzeyleri belirlenmiş, likopen, lutein/zeaksantin ve E vitamininden elde edilen değerlerin her iki gurupta da benzer olduğunu belirtmişlerdir.

Liang ve ark.[74] mesane kanseri riski ile serum vitaminleri arasındaki ilişkinin üzerine yapılmış mevcut çalışmaların sonuçlarının uyumsuz olduğunu belirtmişlerdir. Bu yüzden bir vaka-çalışma grubu oluşturduklarını, bu vakalardan topladıkları plazmalarda E vitaminini (α-T ve γ-T) ve A vitaminini (retinol) HPLC yöntemi ile belirlediklerini ve bu vitaminlerin mesane kanseri ile ilişkisini değerlendirdiklerini belirtmişlerdir. 386 mesane kanserli hasta ile kontrol grubu olarak 389 sağlıklı kişi çalışmada yer almış ve hasta grubundaki ortalama plazma α-T ve retinol derişiminin (23,93 μg/mL ve 1,41 μg/mL), kontrol gurubundan (27,48 μg/mL ve 1,53 μg/mL) düşük olduğunu belirlemişlerdir ($P<0,001$). Artan plazma α-T ve retinol seviyesi ile mesane kanserine yakalanma riskinde anlamlı bir azalma olduğunu ve bu bileşenlerin plazma seviyeleri ile diyet alımları arasında anlamlı bir kolerasyonun olduğunu belirtmişlerdir.

Boonsiri ve ark.[75] Kuzeydoğu Thai'de yaşayan sağlıklı kişilerin serumlarında α-T, β-K ve likopen derişimlerinin belirlenmesini amaçlamışlardır. Yaşları 23–75 arasında değişen 294 kişiden elde edilen serumda α-T, β-K ve likopen seviyelerini HPLC ile belirlemişlerdir. Ortalama serum β-K, likopen ve α-T seviyelerini sırasıyla 0,53 ± 0,32 μmol/L, 0,57 ± 0,37 μmol/L ve 26,64 ± 14,85 μmol/L olarak ve ayrıca bayanlardaki serum β-K ve likopen derişimlerinin (n=118) erkeklerin derişimlerinden (n=176) anlamlı şekilde daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Bununla birlikte erkeklerdeki α-T derişimi (28,60 ± 14,34 μmol/L) bayanlarınkinden daha yüksek (23,72 ± 15,16

μmol/L) olduğunu (p=0,006) ve β-K derişiminin, likopen (r=0,63, p<0,001) ve α-T (r=0,22, p<0,001) derişimleri ile pozitif şekilde ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

### 2.3.2. A, E ve K Vitaminleri ile İlgili Analiz Çalışmaları

#### 2.3.2.1. A Vitamini

Kelm ve ark.[76] $CO_2$ ile zengin olan bir bölgede yetişen lahanayı tüketen kişilerin plazmasında A vitamini, retinol, lutein, β-K'nın işaretli C-13 izotopunun ve endojen β-K'nın derişimlerini belirlenmek için LC/PB-MS ve GC-MS yöntemlerini geliştirmişlerdir. LC/PB-MS yönteminde bütün analitlerin analizleri negatif kimyasal ionizasyon modunda gerçekleştirilmiştir. İç standart olarak 2-8-β-K kullanmışlar ve plazma β-K derişimlerini belirlemişlerdir. HPLC yöntemi ile elde edilen fraksiyonlardan toplanan retinolün analizi ise trimetil silil esterlerleri oluşturularak GC-MS yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

Xiong ve ark.[77] β-K içeren çiğneme ve kapsül tabletleri 150 mg olacak şekilde tek doz rastgele çapraz olarak erkek sağlıklı gönüllülere verilerek serumlarında β-K miktar tayini, HPLC yöntemi ile yapılmış ve β-K'nın bağıl biyoyararlanımını inceleyerek iki ilaç preparatının serum derişim-zaman grafiklerini elde etmişlerdir. Çalışmada β-K'nın iki ticari formu arasındaki $t_{max}$ ve $t_{1/2}$ paremetreleri arasında önemli bir farkın olmadığı ve AUC $_{0\text{-}24h}$ ve $C_{max}$ paremetreleri arasında ise önemli farkın olduğu ve çiğneme tabletinin bağıl biyoyararlanımının kapsülünkinden daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

Rajendran ve ark.[78] insan serumunda β-K'ı içeren 21 karotenoidin belirlenmesi için C-30 kolon, metanol ve metilen kloritten oluşan hareketli faz, gradient elüsyon, 476 nm dalga boyu çalışma parametrelerini kullanarak bir HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Trans β-K, trans likopen, trans lutein, trans α-kriptoxantin, trans β-kriptoksantin, trans

α-K ve trans zeaksantinin serum derişimlerini sırasıyla 256,3-864,2 ng/mL, 64,4-569.2 ng/mL, 137,9-450,3 ng/mL, 55,7-188,2 ng/mL, 43,1-134,5 ng/mL, 20,0-122,1 ng/mL ve 9,1-21,3 ng/mL aralığında belirlemişlerdir.

Rushin ve ark.[79] ters faz HPLC yöntemi ile insan serumunda karotenin trans ve cis izomerlerini belirlemişlerdir. Depolama ve çalışma esnasında örneklerde oluşabilecek izomerleri belirlemek için taze hazırlanmış çözeltiler ile bekletilmiş çözeltilerin analizleri yapılmış ve geri kazanımları hesaplanmıştır. 9-cis ve 13-cis β-K'nın ortalama geri kazanımları her ikisi içinde % 101 olarak belirlenmiş ve ayrıca kan örnekleri alındıktan sonra cis-izomerlerinin oluşmadığı ve insan kan dolaşımında β-K'nın cis izomerinin önemli bir derişimde olduğunu tespit etmişlerdir.

Van Bremen,[80] karotenoidlerin belirlenmesi için LC/MS-ES yöntemi geliştirmiştir. Kromatografik ayırım, 1 mL/dak. akış hızında metanol-metil tersiyer bütil eter-amonyum asetat içeren hareketli faz karışımı ile $C_{30}$ ters faz kolonda gerçekleştirilmiştir. HPLC kolonundan çıkan elüentler önce DAD dedektörden geçirilmiş ve daha sonra elektrosprey iyonizasyonlu kütle spektrometrisine gönderilmiştir. Bu şekilde yapılan analiz sonucunda maksimum hassasiyet elde ettiklerini belirtmiştir. β-K ve lutein için gözlenebilme sınırlarını sırasıyla 1 ve 2 pmol olarak belirlemiştir.

Van Bremen,[81] diğer bir çalışmasında ise, karotenoidlerin biyoyararlanımını belirlemek için LC/MS/MS ve stabil izotop işaretleme yöntemlerini kullanarak deneysel bir dizayn oluşturmuştur. İlaç verilmeden önce ve sonra çeşitli zaman aralıklarında kan örnekleri toplanmış ve serumda, $C_{18}$ kolon kullanılan HPLC yöntemi ile β-K'ı da içeren karotenoidlerin derişimi belirlenmiştir. Oral olarak verilen β-K'nın retinole biyodeğişim miktarını belirlemişlerdir.

Franko ve ark.[82] plazmada, α-K, trans β-K, β-kriptoksantin ve likopenin belirlenmesi için termal lens spektrometri (TLS) dedektörlü HPLC yöntemi geliştirmiş, geçerlilik testleri yapmış ve HPLC-UV yöntemi ile karşılaştırmışlardır. Plazma örneklerinde α-K, trans β-K, β-kriptoksantin ve likopenin tayin alt sınırlarını sırasıyla 85 pg/mL, 100 pg/mL, 70 pg/mL ve 120 pg/mL olarak belirlemişlerdir.

Khachik ve ark.[83] insan plazmasında karotenoidlerin ve oksidatif ürünlerinin tanınması ve ayrılması için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. E vitaminin üç formunu (α-T ve γ-T), A vitaminini ve onsekiz karotenoidi silika bazlı nitril kolonda ayırmışlar ve ters faz $C_{18}$ kolonunda kromatografik analizini gerçekleştirmişlerdir.

Hosotani ve Kitegawa,[84] insan serum ve rat karaciğerinde β-K ve retinolün birlikte belirlenmesi için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. İnsan serumundan ve homojenize edilmiş rat karaciğerinden ekstraksiyon n-hekzan ile yapılmış olup örnekler hareketli faz çözücü karışımında analiz edilmiştir. HPLC sisteminde ayırım, $C_{18}$ kolon ve metanol-su-1-bütanol hareketli fazı ile gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyonda kullanılan etanol ve n-hekzana sırasıyla % 0,125 ve % 0,025 derişimde bir antioksidan olan BHT eklenmiş ve serumdaki β-K, retinol ve retinil palmitatın geri kazanımlarını sırasıyla, % 99,7, % 93,7 ve % 98,3 olarak, karaciğerdeki β-K, retinol ve retinil palmitatın geri kazanımlarını ise sırasıyla, % 107,1, % 92,8 ve % 98,8 olarak belirlemişlerdir. β-K ve retinolün güniçi varyasyon katsayısını sırasıyla, serumda % 6,0 ve % 7,1 karaciğerde % 4,7 ve % 5,1 olarak, günler arası varyasyon katsayısını ise serumda % 2,7 ve % 6,4 karaciğerde de her ikisi için % 2,7 olarak belirlemişlerdir.

Van Breemen ve ark.[85] termal olarak kararsız (sıcaklığa duyarlı) ve uçucu olmayan karetonoidlerin ayırımı ve tanımlanması için FAB/LC/MS yöntemini geliştirmişlerdir. Geliştirilen LC/MS ve LC/UV yöntemlerinin tayin alt sınırları

karşılaştırıldığında MS dedektörün daha hassas olduğunu (lutein ve α-K için sırasıyla 40 ng ve 70 ng (UV dedektörüyle) ve 5 ng ve 15 ng (MS dedektörüyle)) belirtmişlerdir.

Nelis ve ark.[86] insan serumunda retinolün belirlenmesi için susuz ters faz sıvı kromatografi temeline dayalı yeni bir analiz yöntemi geliştirmişlerdir. 100 µL serum örneğine retinil propiyonat iç standardını eklemişler, asetonitril ile deproteinizasyonu ve daha sonra hekzan ile ekstraksiyonu gerçekleştirmişlerdir. Yöntemin tayin alt sınırını 15 µg/mL, güniçi ve günler arası kesinlik değerlerini ise sırasıyla % 2,6 ve % 2,7 olarak belirlemiş ve deneysel verileri spektroflorimetri yöntemi ile karşılaştırmışlardır. Geliştirmiş oldukları her iki yöntemi hastanede yatan 135 hastanın serum örneğine uygulamışlardır. Serumda spektroflorimetri yöntemi ile yapılan analizlerde, analitlerin serumdaki interfere maddelerden etkilendiği gösterilmiş ve bu yüzden düşük bir kolerasyon katsayısına sahip (r=0,955) olduğunu ve pratikte yapılan rutin testler için sadece bir yol gösterici yöntem olabileceğini ama geliştirilen sıvı kromatografi yönteminin potensiyel referans yöntemlerle karşılaştırılabileceğini söylemişlerdir.

Krinsky ve ark.[87] insan plazmasında β-K'ı da içeren çeşitli karotenlerin HPLC yöntemi ile analizlerini gerçekleştirmişler ve insan plazmasında 13-cis-zeaksantinin derişimini belirlemişlerdir. Aynı zamanda insan plazmasında yapısal izomerlerin (lutein, α-kriptoksantin ve α-K), karotenoidlerin β ailesinin (zeaksantin, β-kriptoksantin ve β-K) ve β-karotenoidlerin tümünün oranlarını belirlemişler ve bu oranlar arasında belirgin farklılıklar gözlemlemişlerdir.

Stahl ve ark.[88] insan serum ve dokularında iki baskın karoten olan β-K ve likopenin geometrik (cis-trans) izomerlerinin analizi için bir ters faz HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. İnsan plazma ve dokularında β-K'nın beş ve likopenin yedi geometrik izomerini belirlemişler ve analiz etmişlerdir.

Yamanushi ve Igarashi,[89] yüksek β-K alımının kanser risk oranını azaltığını gösteren değişik epidemiyolojik çalışmaların bulunduğunu fakat β-K'nın etki mekanizmasının hala bilinmediğini belirtmişlerdir. β-K'nın biyolojik fonksiyonlarını aydınlatmak için, sıçanlarda all-trans-β-K'nın dağılımını ve metabolizmasını incelemişler ve sıçanların β-K'nın bozulmamış formunu absorbe edemediği rapor edildiğinden intravenöz olarak β-K'ı süspansiyon formunu enjekte etmişlerdir (2,0 mg/rat). Enjeksiyondan sonra, β-K'nın yüksek bir miktarının akciğerlerde oldukça hızlı şekilde (5 dak.'da) birikdiğini sonra karaciğere hareket ettiğini ve 1 hafta sonra yağ dokularına, 2 hafta sonra pankreasa, 3 hafta sonra da kas dokusuna veya testislere dağıldığını belirlemişlerdir.

Yasuda,[90] elektrokimyasal dedektörle kombine edilmiş HPLC yöntemiyle hem sağlıklı hem de değişik hastalığa sahip kişilere karotenoid izomerleriyle all-trans izomerlerini içeren doğal β-K preparatlarının (% 59,7 β-K) ve sentetik all trans β-K izomerlerinin verilmesinden sonra serumdaki β-K seviyelerini belirlemiştir. Sağlıklı erişkin erkeklerde total karoten derişimleri 2,6~56,0 mg/dL (18,2 ± 3,7) ve erişkin bayanlarda 7,5~86,0 mg/dL (32,5 ± 16,4) olarak, erkek çocuklarında toplam serum β-K derişimini ise 55,7 ± 12,2 mg/dL ve kız çocuklarında da 56,8 ± 20,3 mg/dL olarak belirlemişlerdir. 60 mg sentetik all trans β-K'nın uygulanmasından sonra toplam serum β-K seviyesi 40,7 ± 31,6 mg/dL den 104,2 ± 46,2 mg/dL'ye yükselmiş 48 saatlik AUC değeride 2,204 ± 753,5 mg.saat/dL olarak, ayrıca doğal β-K'nın aynı dozunun uygulanmasından sonra toplam serum β-K seviyesi 40,5 ± 24,0 mg/dL'den 70,5 ± 20,4 mg/dL'ye yükselmiş ve 48 saatlik AUC değeri 870,6 ± 358,7 mg.saat/dL olarak tespit etmişlerdir. All trans β-K'nın içecek emülsiyon ve tablet şeklinde verilmelerinden sonra

serum derişimleri kıyaslandığında, toplam serum β-K derişiminin emülsiyon şeklinde verildiği zaman daha hızlı bir yükseliş gösterdiğini ama her ikisininde sağlıklı kişilerde AUC değerlerinin eşit olduğu gözlenmiştir.

Parvin ve ark,[91] β-K'nın A vitaminine dönüşüm ilişkisini elde etmek için sıçanlarda ve çocuklarda yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. Dönüşüm ilişkisini, standart A vitamininin ve β-K'nın oral dozundan sonra plazma A vitamininin derişim-zaman grafiğinde AUC oranını esas alarak belirlemişlerdir. Çocukların ve ratların her ikisine de A vitaminin ve β-K'nın tek dozu ayrı ayrı verildikten sonra 0, 4, 8, ve 12'inci saatlerde kan örneklerini toplamış ve 25-30 μg/dL derişim aralığında bulunan serum A vitamininin bağıl dönüşüm oranını 0,5 ($n=6$, $p<0,05$) olarak belirlemişlerdir. Ayrıca, farklı denemelerde A vitamini ve β-K'nın başlangıç plazma derişimleri arasında pozitif bir korelasyonun olduğunu belirtmişlerdir.

Hagiwara ve ark.[92] serumda likopen, α-K ve β-K'nın birlikte belirlenmesi için APCI/MS ve LC/MS/SIM yöntemlerini geliştirmişlerdir. LC/MS/SIM yöntemi ile karotenoidlerin belirlenmesinde serum kolesterolün interfere edici etkisinden dolayı, karotenoidleri kolestrolden ayırmışlar ve kromatografik ayırımı, ODS-5 (75 mm 34,6 mm ID) kolonunda metanol ve asetonitril (70/30, h/h) hareketli fazı kullanarak başarmışlardır. APCI/MS'in pozitif modunda likopeni, α-K'ı ve β-K'ı 537 m/z'de iç standardı ise 411 m/z'de belirlemişlerdir. 15–150 ng/mL, 25–50 ng/mL ve 7–70 ng/mL derişim aralığında sırasıyla likopen, α-K ve β-K'nın doğrusal olduğunu ve bütün karotenoidlerin tayin alt sınırlarınının 3 ng olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca likopen, α-K ve β-K'nın güniçi kesinlik değerlerinin sırasıyla % 10, % 8,4 ve % 5,3 ve günler arası kesinlik değerlerinin ise sırasıyla % 11,2, % 8,8 ve % 6,5 olarak tespit etmişlerdir.

Başka bir çalışmada da insanlardaki biyolojik fonksiyonları etkileyen karotenoidler ve retinoidlerin farklı doku dağılımlarını anlamak için, insan dokularında ve plazmasında retinol ve β-K'nın belirlenmesi için HPLC yöntemi geliştirilmişdir. Örnek hazırlama adımlarındaki hataları minimize etmek için retinal-*O*-etiloksim ve α-apo-12-karotenal-*O*-*t*-bütilloksim iç standartları ve ikincil referans standartlar kullanılmıştır. Dokular etanolde hazırlanan KOH ile parçalanmış ve doku ve plazma örneklerinden analitler organik çözücülerle ekstrakte edilmiştir. 325 nm dalga boyunda retinol ve 450 nm dalga boyunda β-K izokratik olarak LC sisteminde ayrılmıştır[93].

Oin ve ark.[94] biyolojik örneklerde, 9-cis β-K ve ζ-K derişimlerinin belirlenmesinin, bu bileşiklerin biyolojik aktivitelerini öğrenmek için önemli bir bilgi sağlayabileceğini belirtmişlerdir. 9-cis βK ve ζK'nın sırasıyla 400 nm ve 450 nm'de absorbans gösterdiğini, sadece 9-cis βK'nın 475 nm'de absorbans gösterdiğini tespit etmişler, 9-cis βK ve ζK'nın derişimlerinin belirlenmesi için pik absorbans oranlarını kullanarak bir HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. 9-cis βK/ζK'nın pik alan oranları 475 nm, 450 nm ve 400 nm dalga boylarında belirlenmiş, 9-cis βK derişimi 475 nm dalga boyundaki absorbansa göre değerlendirilmiştir. Daha sonra 9-cis βK'nın 450/475 nm'deki pik absorbans oranı kullanılarak 400 nm'de 9-cis βK'nın katkısı çıkarılmış ve 400 nm'de 9-cis βK/ζK pik absorbans oranından ζK derişimini hesaplamışlardır.

Clarke ve ark.[95] elektrosprey iyonizasyon ve APCI ile kombine edilmiş HPLC yöntemini karotenoidlerin analizi için geliştirmişlerdir. HPLC sisteminde gradient elüsyon ile karotenoidlerin ayırımı 14 dak. içinde gerçekleştirilmiştir. Buna göre β-K dışında yöntemin kesinliği % 6–20 aralığında ve analite bağlı olarak gözlenebilme sınırını 0,1–1,4 ng/μL aralığında değiştiğini göstermişlerdir.

Lacker ve ark.[96] 200–700 aralığında kütle taraması yapılarak HPLC-UV-APCI-MS yöntemiyle β-K'nın cis/trans izomerlerini ve β-K'ı da içeren karotenoidlerin ayırımını ve analizlerini gerçekleştirmişlerdir. HPLC ayırımı, ters faz $C_{30}$ kolonda gerçekleştirilmiş ve β-K'nın gözlenebilme sınırı 1 pmol olarak belirlenmiştir.

Oswald ve Marian,[97] spektrofotometri yöntemiyle insan serumunda β-K ve A vitamininin analizini gerçekleştirmişlerdir. 3 mL serum üzerine 3 mL KOH'un % 90'lık etanoldeki çözeltisi yavaş bir şekilde ilave edilerek oluşturulan karışım 50-60°C su banyosunda 80 dak. ısıtılmış, soğutulmuş ve petrol eteri ilave edilerek karıştırılmıştır. Daha sonra santrifüjlenip organik faz ayrılmış ve spektrofotometre ile 451 nm'de ölçümü alınmıştır. Daha sonrada çözücü uçurulmuş ve kalıntı kloroformda çözülerek 620 nm dalga boyunda transmittansı belirlenmişdir.

Souri ve ark.[98] β-K ve antisiyanosidin birlikte belirlenmesi için üçüncü türev spektrofotometri yöntemini geliştirmişlerdir. β-K için 540 nm dalga boyunda ve antisiyanosidin için 625 nm dalga boyunda ölçümler gerçekleştirilmiş olup 25 µg/mL β-K'nın varlığında antisiyanosidinin 125–750 µg/mL derişim aralığında doğrusal ve 500 µg/mL antisiyanosidin varlığında da β-K'nın 6,25–37,50 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğunu göstermişlerdir. Yöntemin gözlenebilme sınırlarını β-K ve antisiyanosidin için sırasıyla 125 µg/mL ve 6,25 µg/mL olarak belirlemişlerdir.

**2.3.2.2. E Vitamini**

Julianto ve ark.[99] insan plazmasında α-T'nin belirlenmesi için plazma örnekleri, asetonitril-tetrahidrofuran (3/2, h/h) çözücü karışımı ile deproteinize edildikten sonra direk enjeksiyonu yapılan bir UV dedektörlü HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırım, metanol-tetrahidrofuran (94/6, h/h) hareketli fazı ile $C_{18}$ kolonunda, 293 nm'de ve 1,5 mL/dak. akış hızında gerçekleştirilmiştir. Güniçi ve günler

arası kesinliğinin % 9'dan küçük olduğu ve α-T'nin küçük miktarlarda plazma örneklerinin analizi için uygun olduğu belirtilmişdir.

Mottier ve ark.[100] insan plazmasında α-T ve oksidasyon ürünü olan α-T-kinonun (TQ) birlikte belirlenmesi için GC/MS ve LC/MS/MS yöntemlerini geliştirmişlerdir. Her iki yöntemde de tokoferol-d3 iç standart olarak kullanılmıştır. Plazmadan α-T ve TQ hekzan ile ekstrakte edilmiş ve GC-MS ile analizden önce analitler o-trimetil silil türevine dönüştürülmüştür. Her iki yöntemin de hemen hemen aynı doğruluğu gösterdiği (> % 95) ve aynı güniçi kesinliğe (α-T için < % 5 ve TQ için < % 10) sahip olduğu, LC/MS/MS yönteminde günler arası kesinliğinin ve tayin alt sınırının, GC/MS yöntemi ile elde edilen değerlerden daha iyi olduğu gösterilmiştir.

Hıdıroğlu ve Karpinski,[101] oral ve intravenöz şekilde verilen çeşitli E vitamini preparatlarıyla dört tokoferol (D-α-tokoferil asetat, DL-α-T, DL-α-tokoferil asetat ve D-α-T) formülasyonun koyunlarda farmakokinetik dağılımını incelemişlerdir. Koyunlara D-α-tokoferil asetat, DL-α-T, DL-α-tokoferil asetat ve D-α-T vitaminleri oral olarak verildiğinde sırasıyla $C_{max,}$ değerleri 3,11, 2,61, 2,67 ve 5,75 μg/mL; $t_{max}$ değerleri 32, 40, 36 ve 26 saat; başlangıç derişimleri 0,78, 0,83, 0,84 ve 1,16 μg/mL ve AUC değerleri 426,41, 408,05, 419,94 ve 656,03 μg.saat/mL olarak belirlenmiştir. DL-α-tokoferil asetat, D-α-tokoferil asetat intravenöz olarak verildiğinde sırasıyla $C_{max}$ değerleri 3,55 ve 7,74 μg/mL; $t_{max}$ değerleri 62,4 ve 28,2 saat; başlangıç derişimleri 1,20 ve 1,63 μg/mL ve AUC değerleri 771,86 ve 1120,35 μg.saat/mL olarak; DL-α-T intravenöz olarak verildiğinde ise başlangıç derişimi 0,93 μg/mL ve AUC değeri 675,69 μg.saat/mL olarak belirlenmiştir.

Melchert ve Pabel,[102] insan serumunda α, β, γ ve δ tokoferollerin belirlenmesi için floresans dedektörlü normal faz HPLC ve GC/MS yöntemlerini geliştirmişlerdir. İki

basamakta örnek hazırlama yöntemi kullanılarak serum örnekleri hazırlanıp HPLC yöntemi ($\lambda_{eks}$: 295 nm , $\lambda_{em}$: 330 nm) ile örneklerin hazırlama işlemlerinden sonra trimetil silil türevleri (TMS) elde edilerek GC/MS yöntemiyle analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Bütün tokoferollerin geri kazanımlarının % 98 olduğunu göstermişlerdir. α-T için HPLC ile elde edilen tayin alt sınırını 50 pq olarak ve bütün TMS-tokoferollerin GC/MS ile elde edilen tayin alt sınırını da 40 pq olarak belirlemişledir.

Eicher ve ark.[103] D-α-T'nin ve DL-α-T asetatın bağıl biyoyararlanımı ile retinol ve α-T ile beslenen danaların α-T biyoyararlanımı incelemişlerdir. α-T'nin biyoyararlanımını ve biyoyararlanım üzerine A vitamini ile α-T'nin birbirleriyle etkileşimini incelemişlerdir. Birinci deneysel presedürde dört grup oluşturulmuş olup; birinci gruba hiç vitamin verilmemiş, ikinci gruba sadece 442 mg retinil asetat, üçüncü gruba 1342 mg D-α-T, dördüncü gruba ise 442 mg retinil asetat ve 1342 mg D-α-T oral olarak verilmiştir. Kan örnekleri 36 saat boyunca toplanmıştır. Retinil asetat derişiminin bütün danalarda ilaç verildikten sonraki 2–6 saat arasında maksimuma ulaştığı ve sonra da 22–28 saatleri arasında tekrar maksimum derişime ulaştığını, plazma α-T derişiminin ise yalnız α-T verildikten sonra 12–20 saatleri arasında maksimum düzeye ulaştığını belirlemişlerdir. α-T, retinil asetat ile birlikte verildikten sonrada aynı saatler arasında maksimum plazma derişimine ulaştığını fakat maksimum plazma derişiminin daha düşük olduğunu gözlemlemişlerdir. İkinci deneysel presedürde ise DL-α-T asetat toz halinde ve D-α-T ise sıvı halinde danalara gavaj yolla verildikten sonra kan ve doku örneklerini analiz etmişler ve DL-α-T asetat ile beslenen danalardaki α-T'nin plazma ve böbrekteki derişimini D-α-T ile beslenen danaların derişiminden daha düşük olarak belirlemişlerdir. Ayrıca karaciğer, dalak, yağ dokuları, kalp, kas, kan ve bağırsaklardaki

α-T'nin derişiminin, her iki formunda aynı değerlere sahip olduğunu farklılık göstermediğini belirtmişlerdir.

Pedraz ve ark.[104] α-T ve α-T asetatın kolloidal sıvı çözeltilerini çapraz olarak 50 mg/kg dozda erkek tavşanlara intramusküler ve intravenöz olarak uygulayıp biyoyararlanımını incelemişlerdir. Fizyolojik olarak aktif grup olan α-T'nin biyoyararlanımını % 35 ve α-T asetatın biyoyayarlanımını ise % 65 olarak belirlemişlerdir. İntravenöz ve intramuskuler olarak verilen α-T asetat ile α-T'nin kinetik profillerini karşılaştırmışlar ve α-T'nin biyoyararlanımında potansiyel sınırlayıcı bir adım olarak α-T asetatın hidrolizi ve enjeksiyon bölgesinde α-T asetatın absorbsiyonu olduğunu belirtmişlerdir.

Knight ve Roberts,[105] α-T ve α-T asetat olmak üzere E vitamininin iki formunun vücuttaki dağılımını karşılaştırmak için yeni doğan tavşanlara α-T ve α-T asetatı ayrı ayrı tek doz intravenöz olarak vermişler ve dokudaki derişimlerinin önemli derecede farklı olduğunu göstermişlerdir. İlaç verilen tavşanların E vitaminin her iki formununun doku derişimlerinin normal beslenmesini sürdüren ilaç verilmeyen tavşanlardan yüksek olduğunu ve dozdan sonraki 6 gün değişmeden kaldığını göstermişlerdir. Ayrıca α-T asetatının α-T'ye tamamen dönüşmediğini ve uygulamadan sonraki 3 günde sadece % 50'sinin dönüştüğünü belirtmişlerdir.

Vatassery ve ark.[106] insan kırmızı kan hücrelerinde α-T ve α-T-kinonların birlikte belirlenmesi için bir sıvı kromotografi yöntemi tanımlamışlardır. Kırmızı kan hücre membranındaki tokoferollerin ekstraksiyon işlemi boyunca oksidasyona oldukça yatkın olduğunu belirlemişler ve bu yüzden de kırmızı kan hücre örneklerine, bütillenmiş hidroksi toluen, askorbik asit ve progallol'dan oluşan bir karışım eklemişler ve sonra hekzan ile ekstrakte etmişlerdir. Tokoferol bileşiklerinin kromatografik ayırımı

asetonitril-metanol-tampon çözeltisi ($NaH_2PO_4.H_2O$, 7,5 mM) (12/83/5, h/h/h) içeren bir hareketli faz kullanılarak $C_{18}$ kolonda gerçekleştirilmiş ve elektrokimyasal olarak saptanmıştır.

Corrado ve ark.[107] insan serum örneklerinde α-T'nin belirlenmesi için kulorimetri dedektörlü bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Kütle spektrometre ile yabancı iyonlar (bilirubin) tanımlamışlardır. 0,1–200 mg/L derişim aralığında doğrusal, kolerasyon katsayısını 0,999, gözlenebilme sınırını 3 ng/mL ve ekstraksiyon geri kazanımını % 98 ± 1,3 olarak belirlemişlerdir.

Gonzalez-Corbella ve ark.[108] ODS-2 kolon, 1,0 mL/dak. akış hızı, metanol hareketli fazı çalışma parametrelerini kullanarak DAD dedektörlü ters faz HPLC yöntemiyle plazma ve eritrositlerde α-T'nin analizini gerçekleştirmişlerdir. Plazma ve eritrositlerde rutin α-T'nin analizlerinde kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Teissier ve ark.[109] plazma ve lipoproteinler (LDL and HDL) içinde α-T'i analiz etmek için iki yöntem geliştirmişlerdir. Birinci yöntem; plazma veya lipoproteinlerin, θ-T iç standardını içeren etanol ile deproteinize edilmesini, hekzan ve etil asetat karışımı ile ekstrakte edilmesini, organik tabakanın ayrılmasını, buharlaştırılmasını, kalan kısımın metanol ile çözülmesini ve daha sonra ters faz HPLC sisteminde analiz edilmesini içermektedir. İkinci yöntemde ise plazma veya lipoproteinlerin metanol ve aynı iç standardı içeren etanol karışımı ile seyreltilmesini, elde edilen çözeltinin vortekslenmesi, ardından da santrifuj edilmesini ve direkt HPLC sistemine enjekte edilmesini içermektedir. Tokoferoller 1 mL/dak. akış hızında metanol hareketli fazı ile izokratik olarak elüe edilmiş ve analitler floresans dedektör ($\lambda_{eks}$: 295 nm , $\lambda_{em}$: 330 nm) ile saptanmıştır. Geri kazanımlar her iki yöntemde de ortalama % 100 olarak belirlenmiş

ve günler arası varyasyon katsayısı birinci yöntem için % 8,39 ve ikinci yöntem için % 6,55 olarak tespit edilmiştir.

Takeda ve ark.[110] sıçan plazması veya eritrositlerinde α-T ve α-T kinonun birlikte belirlenmesi için çoklu kulorimetri çalışma elektrotları (ÇE) ile kombine edilmiş bir HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. α-T ve α-T kinonların ayrımı için 40 μM sodium perklorat içeren methanol su karışımını (96/4, h/h) içeren bir hareketli faz ve bir ters faz $C_{18}$ kolon kullanılmıştır. Bu maddelerin birlikte belirlenebilmesi için dört ÇE'dan oluşan bir seri kullanılmış ve redoks modunda gerçekleştirilmiştir. Bu tespit modunda, birinci, ikinci ve üçüncü ÇE, parazitleri engellemek ve reaksiyonu başlatmak için −0,45 V'a ayarlanmış ve dördüncü ÇE ise bir paladyum referans elektroduna karşı +0,40 V'da gerçek ölçümü için kullanılmıştır. α-T ve α-T kinonun gözlenebilme sınırları sırasıyla 50 pg ve 100 pg olarak tespit edilmişdir.

Lodge[111] sigara içenlerde özellikle koroner kalp hastalıklarının artış gösterdiği ülkelerde E vitaminin (doğal ve sentetik) biyoyararlanımının bilinmesinin önemli olduğunu söylemişler ve yaptıkları çalışmada daha önceki yapılan çalışmalarla karşılaştırmalı bir yaklaşım kullanmışlardır. Doğal ve sentetik E vitaminlerinin biyoyararlanımının biyopotansiyel oranını daha önceki yapılan çalışmalarda 1,36/1, bu çalışmada da 2/1 olarak belirlemişlerdir. Ayrıca AUC ve $C_{max}$ oranları sigara içmeyenlerde 1,3/1 iken sigara içenlerde bu oran 0,9/1 olarak tespit edilmiştir.

Cheeseman ve ark.[112] RRR-α-T, α-tokoferil asetat ve sussinat esterlerinin oral olarak verilmesinden sonra RRR-α-T'nin biyoyararlanımı sağlıklı insan örneklerinde incelemişlerdir. RRR-α-T'nin ve RRR-α-tokoferil asetatın eşit molar karışımını içeren bir jelatin kapsülün oral verilmesinden sonra venöz kan örnekleri 51. saate kadar periodik olarak alınmıştır. RRR-α-T, hem serbest fenolde hemde asetat esterlerinde

benzer oranlarda absorbe edilmiş ve maksimum plazma seviyeleri örneklerin çoğunda 12. saatte ortaya çıkmıştır. RRR-α-T'nin absorbsiyonu örnekler arasında önemli şekilde faklılıklar göstermiş olmasına rağmen tokoferolün iki formunun nispi absorbsiyonu belirgin şekilde uyumlu olmuş ve plazmada nispi biyoyararlanım parametrelerinde 1,0'lik bir oran tespit edilmiştir. Her iki formda da RRR-α-T derişimini kırmızı kan hücrelerinde yaklaşık 27. saatte maksimuma ulaştığını fakat plazmada gözlenen derişimlerin bireyler arasında büyük faklılıklar içerdiğini belirtmişlerdir.

Pyka ve Sliwiok[113] ters faz yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (RP-HPTLC), normal faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi (NP-HPLC), ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi ($C_{18}$, RP-HPLC) ve gaz kromatografisi (GC) yöntemleri ile tokoferollerin (α, β, γ ve δ tokoferol) ayırımını gerçekleştirmişlerdir.

Melchert ve ark.[114] lipofilik jel kromatografi yöntemiyle tokoferollerin, tokoferol kinonların ve tokoferol hidrokinonların ayırımını yapmışlar ve daha sonra da bu bileşiklerin trimetil silil (TMS) türevleri oluşturularak GC-MS yöntemi ile miktar analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Ayrıca, TMS türevleri oluşturulmuş olan tokoferollller için gözlenebilme sınırını 40 pg, tayin alt sınırını ise 80 pg olarak belirlemişlerdir.

Colleen ve ark.[115] plazmadan sıvı-sıvı ekstraksiyon ile ayrılan α-T'i, O-metil silil ile silil türevine dönüştürdükten sonra analizi kuadropol iyon seçici kütle spektrofotometri dedektörlü GC/MS/MS yöntemiyle, penta-metil 6 kromazol iç standardını kullanarak DB-5 kapiler kolonda gerçekleştirmişlerdir. 1,9–1073 ng/mL çalışma aralığında yöntemin doğrusal olduğunu, yöntemin gözlenebilme sınırını 89,6 fg, tayin alt sınırını 350 fg, güniçi ve günler arası kesinliğini ise sırasıyla % 5,8 ve % 11,3 olarak tespit etmişlerdir. Yöntemin uygulama aşamasında ise, hamile koyuna ve

fetusuna α-T enjeksiyon edilmiş sonra α-T-d3 ve α-T-d6 için plazma kinetik eğrileri elde edilmiştir.

Martinek,[116] serumda E vitamininin belirlenmesi için spektrofotometrik bir yöntem geliştirmiştir. E vitamininin direk spektrofotometrik tayini 295 nm dalga boyunda belirlenmesine rağmen interfere edici maddelerin varlığı ve düşük hassasiyetinden dolayı pratik olmadığı belirtmiş ve 2,4,6 tripüridil-5-trazin (TPTZ) kullanarak serumdaki $Fe^{+2}$, E vitamini ile $Fe^{+3}$'e indirgenmesi gerçekleştirilerek vitamin derişimini belirlediğini belirtmiştir.

Karyen ve ark.[117] orijinal Emmerie-Engel reaksiyon modifikasyonuna dayanan yöntemlerinde, kırmızı kan hücrelerinde (RBC) toplam tokoferolün spektrofotometrik analizini tanımlamışlardır. Bu yöntemin en önemli özelliğinin tokoferolün saflaştırması için TLC kullanımının olduğunu, ekstraksiyon aşamaları ve saponifikasyon sırasında yüksek miktarlarda antioksidanın (pirogallol veya askorbik asid) ilave edilmesi olduğunu belirtmişlerdir. Geliştirdikleri yöntem ile kontrol grubu kişilerden, abetalipoproteinemia hastalarından alınan plazma ve eritrositlerde toplam tokoferol seviyesini belirlemişlerdir. Buldukları sonuçlara göre, tokoferol derişiminin kontrol grubu kişilerde geniş bir aralığa sahip, fakat RBC tokoferol/plazma tokoferol oranının nispeten sabit olduğunu göstermişlerdir.

**2.3.2.3. K Vitamini**

Stanley,[118] post kolon çinko indirgeni kullanarak sentetik hayvansal besinlerde $K_3$ vitamininin suda çözünen sodyum bisülfit tuzunun florimetrik belirlenmesi için HPLC yöntemini geliştirmiştir. MBS'yi, metanol ve n-pentan ile ekstrakte etmiş ve sonra sodyum karbonat ile yağda çözünen MN'e çevirmiştir. 425 nm emisyon, 325 nm eksitasyon dalga boylarında floresans olarak $K_3$ vitaminini belirleyebilmek için çinko

indirgeni ile 1,4 dihidroksi anologuna çevirmiştir. Floresans cevabın 1–100 ng derişim aralığında doğrusal olduğunu ve 20 μg/kg gözlenebilme sınırı ile GC/FT/IR yönteminden daha hassas olduğunu göstermiştir.

Hu ve ark.[29] bir antikanser ajan olan MN'i yüksek dozda tavşanlara vermişler ve sonra plazma ve kırmızı kan hücrelerinde farmakokinetik özelliklerini incelemişlerdir. Menadiol sodyum difosfat içeren preparat, aşırı yüksek dozda (75 mg) intravenöz olarak enjekte edildikten sonra preparatın major metaboliti olan MN'nin analizi HPLC yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Hem plazma hemde kırmızı kan hücrelerindeki MN'nin kinetik özellikleri kısa bir eliminasyon yarı ömrü, yüksek klirens ve yüksek bozulma hacmi şeklinde kendini göstermiş olup MN'nin plazma ve kırmızı kan hücrelerinde, yarılanma ömrü, klirensi, bozulma hacmi ve AUC'si sırasıyla, 27,17 ± 10,49 dak. ve 35,22 ± 11,82 dak., 0,822 ± 0,254 L/dak. ve 0,407 ± 0,152 L/dak., 30,833 ± 12,835 L ve 20,488 ± 9,401 L, 32,453 ± 9,785 μg.dak./mL ve 67,219 ± 24,449 μg.dak./mL olarak belirlenmiştir. Menadiol kanda hızlı bir şekilde MN'ye dönüştüğünü ve MN'nin değişmez formasyon oranı (kf) plazmada 0,589 ± 0,246 L/dak. iken kırmızı kan hücrelerinde 1,520 ± 1,345 L/dak. olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmada MN'nin antikanser ilaç olarak kullanılması için 1 μg/mL plazma seviyesinin sürdürülmesine ihtiyaç duyulduğunu ve tahmini MN dozunun saatte 19,7 mg/kg olduğunu söylemişlerdir.

Castello,[119] 1977 de yaptığı bir çalışmada MN'yi GC yöntemi ile belirlemiştir.

Rizk,[120] demir ve nikel ile MN'nin anyon komplekslerini oluşturmuş ve iyon membranlarının derişimi başına 58,2–51,4 mV uygulayarak $K_3$ vitaminin belirlenmesi için potansiyometrik bir yöntem geliştirmiştir. Her iki sensörde de hızlı cevap zamanı (20–30 sn), düşük gözlenebilme sınırı ($2x10^{-5}$ M ), iyi stabilite (4-6 hafta) belirlenmiştir.

Yöntemin statik ve hidrodinamik modlarında, MN sırasıyla % 0,6 ve % 1,3 standart sapma ile % 98,8 ve % 98,5 doğruluk gösterdiğini bildirmiştir.

Huang ve ark.[121] biyolojik sıvılarda ve farmasötik preparatlarda sülfat içeren ilaçlar olan analjini ve MBS'yi kemilüminisans akış sistemi ile belirlemişlerdir. Yöntem, asidik rodamin 6G'nin varlığında çözülmüş oksijen ile ilaçlarda sülfit grubunun oksidasyonu sonucu, zayıf kemilüminisans göstermesi temeline dayanmıştır. 0,05–50 μg/mL derişim aralığında MBS alkali ortamda sodyum bisülfite çevrilerek, 0,05–50 μg/mL derişim aralığında analjin ise direk analiz edilmiştir. Gözlenebilme sınırları sırasıyla 0,01 μg/mL ve 0,003 μg/mL olarak belirlenmiştir.

Poulsen ve Birks[122] K vitamininide içeren kinonların belirlenmesi için basit bir post kolon fotokimyasal dedektörlü HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemin, reaksiyonun minimize edilmiş bir bant genişliği ve çok kısa bir zamanda gerçekleştirilmesi gibi avantajlara sahip olduğu belirtilmişler ve çoğu kinon türevinin gözlenebilme sınırının iyi bir seçicilik ile pg seviyede olduğunu göstermişlerdir.

Vire ve ark.[123] MN'yi belirlemek için bir siklik voltametri yöntemini geliştirmişlerdir. İndirgenmiş formun okside forma göre daha kuvvetli şekilde adsorbe edileceği için adsorbe edilmiş bir tabakanın voltamogramı daha az negatif değer yönünde potansiyel tarama ve azalmış bileşiklerin başlangıç derişimlerinden sonra bu molekülün tanınmasına uygulandığını söylemişlerdir. Karıştırma kullanıldığı zaman yüksek etkili adsorbsiyon meydana geldiğini ve karıştırmanı durduğu zaman adsorbe edilen materyalin bir kısmının kaybolduğunu belirtmişlerdir. Kare bir dalga modu ile de yüksek hassasiyeti ve tarama boyunca desorpsiyonu minimize etmişlerdir. Bu yöntemle, $K_3$ vitamininin $2x10^{-10}$ M - $5x10^{-7}$ M derişim aralığında belirlenebileceğini belirmişler ve gözlenebilme sınırını $1,3x10^{-10}$ M olarak belirlemişlerdir.

Hu ve ark.[124] bir antikanser ilaç olan $K_3$ vitamininin plazmada belirlenmesi için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Yüksek dozlarda sentetik $K_3$ vitamininin değişken insan kanser hücrelerine karşi antitümör aktivite sergilediğini belirlemişlerdir. Kromatografik ayırım, metanol su hareketli fazı, 265 nm dalga boyunda ODS kolonunda gerçekleştirilmiştir. MN, n-hekzan ile plazma örneklerinden ekstrakte edilmiştir. Azot ile n-hekzanın uçurulması esnasında MN'nin büyük oranda kaybolduğunu belirtmişler ve MN'nin kaybını engellemek için sanrifuj ve ekstraksiyondan sonra çözücü ekstraktına metanol ilave etmişlerdir. Mutlak geri kazanımın % 82,4 ± 7,69 (n=7), plazmadan elde edilen MN'nin güniçi ve gün arası kalibrasyon eğrilerinin kabul edilebilir kesinliğe sahip olduğunu ve iyi bir doğrusallık (0,01–10,00 mg/mL; 0,01–5,00 mg/mL) gösterdiğini ve gözlenebilme sınırının 10 ng/mL olduğunu belirtmişlerdir. Geliştirilen yöntem, intravenöz olarak 75 mg gibi yüksek dozda menadiol sodyum difosfat verilen tavşanlarda MN'nin farmakokinetik paremetrelerinin belirlenmesi için uygulanmıştır. Farmakokinetik parametrelerden ortalama yarılama ömrünü, eliminasyon yarı ömrünü, bozulma hacmini ve plazma klirensini sırasıyla 2,60 ± 0,12 dak., 26,3 ± 2,97 dak., 25,7 ± 0,78 L ve 0,68 ± 0,10 L/dak. olarak belirlemişlerdir.

Akman ve ark.[125] $K_3$ vitamininin plazmada belirlenebilmesi için bir diferansiyel pulse polarimetrik yöntem geliştirmişlerdir. MN, eter ile plazmadan ekstrakte edilmiş ve eter azot gazı altında uçurulmuşur ve daha sonra kalan kalıntılar elektrolit çözeltisinde (metanol/0,2 M borat tamponu (pH 6,8), (9/1, h/h)) çözülmüş ve diferansiyel pulse polarogram ile -0.32 V'da ölçülmüştür. Yöntemin, 0,6–10 μM derişim aralığında doğrusal olduğu gösterilmiştir. Yöntemin uygulama aşamasında ise 20 mg/m$^2$ tek doz menadiol sodyum difosfat intramuskuler olarak iki hastaya uygulanmış, 0,5. ve 1.

saatlerde plazma örnekleri alınmış ve $K_3$ vitamin seviyelerinin sırasıyla 0,5 µg/mL ve 0,3 µg/mL olduğu tespit edilmiştir.

Helaleh,[126] standart ve farmasötik preparatlardaki MN'nin belirlenmesi için MN, NaOH ile reaksiyona sokularak 450 nm dalga boyunda absorbans veren renkli bir kompleksi haline dönüştürülerek analiz edilmesi esasına dayanan kinetik bir yöntem geliştirmiştir. Kompleks formda NaOH ile MN oranı 3/2 olarak verilmiş olup oluşum sabiti $8,37.10^{15}$ ve molar absorbivite katsayısı $6,55.10^2$ L/mol.cm olarak belirlenmiştir.

Ruiz ve ark.[127] MN'nin belirlenmesi için UV ışığı ile radyasyonsuz dodesil sülfat üzerinde MN'nin indirgenmesi temeline dayanan akış enjeksiyonlu florometri yöntemini geliştirmişlerdir. Yöntemin 2,42-245 ng/mL derişim aralığında doğrusal ve gözlenebilme sınırının 0,18 ng/mL olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca, geliştirdikleri yöntemin farmasötik preparatlarda MN'nin analizi için uygulanabilir olduğunu belirtmişlerdir.

Laffi ve ark.[128] hayvansal besinlerde MN'nin belirlenmesi için nomal faz sıvı kromatografi yöntemi geliştirmişlerdir. $K_3$ vitamini ekstrakte edildikten sonra MN'ye çevrilerek analiz edilmiştir. Pik alanı ve yüksekliği 251 nm'de ölçülmüş ve örneklerdeki MN analizi, çalışma çözeltileri ile karşılaştırılarak yapılmıştır. Geliştirilen yöntem ile 2,5 ppm gözlenebilme sınırı, % 97,3–98,3 (standart çözeltiler için) ve % 93,7–96,8 (yiyecek maddeleri için) arasında geri kazanım değerleri elde edilmiştir.

Pérez-Ruiz ve ark.[129] K vitaminlerini belirlemek için, bu vitaminlerin bir post kolonda hidrokinon formuna indirgeme temeline dayanan floresans dedektörlü ters faz HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Fotokimyasal reaksiyon ürünlerinin, metanol ve sodyum dodesil sülfatın varlığında düşük basınçta civa lambasının etrafında dolandırılmış PTFE telinde oluşturulduğunu ve analizlerini yaptıklarını belirtmişlerdir.

Fotokimyasal reaksiyonun oranını etkileyen faktörler optimize edilmiştir. Geliştirmiş oldukları bu yöntemle sebze (ıspanak, bürülsel lahanası), farmasötik preparat ( Konakinon, Caprofides, Vitaendil) ve bebek maması gibi birkaç gerçek örnekte filokinon, MN ve menakinon-4'ü belirleyerek yöntemin uygulanabilirliğini göstermişlerdir.

Nagaraja ve ark.[130] iki farklı spektrofotometrik yöntemle MN ve MBS'yi belirlemişlerdir. Birinci yöntem, MN ve MBS'nin NaOH ortamında 3-metil-2-benzotiazolin hidrazon HCl (MBTH) ile türevlendirme esasına dayandırılmıştır. Bu reaksiyonda MN ve MBS, bir saatten daha fazla kararlı olan ve 625 nm'de maksimum absorbans gösteren mavi renkli bir ürüne dönüştürülmüştür. 0,4–16 µg/mL derişim aralığında yöntemin doğrusal olduğu belirtilmiştir. İkinci yöntem ise MN ve MBS'nin derişik $H_2SO_4$ ortamında resorkinol ile türevlendirme esasına dayandırılmıştır. Bu işlemde 520 nm'de maksimum absorbans gösteren üç saatten daha fazla kararlı olan mavi renkli bir ürünün oluştuğu ve yöntemin 1–24 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu belirtilmiştir. Bütün ölçümler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiş ve geliştirilen yöntemler farmasötik preparatlarda MN ve MBS'nin belirlenmesinde uygulamışlardır.

Robert va ark.[131] K vitaminini, Ti (III) ile naftokinonları naftohidrokinonlara indirgeme esasına dayanan spektrofotometrik bir yöntemle belirlemişlerdir. Çalışmada, kompleks oluşum süresi, Ti (III), Ti (IV) ve sülfirik asit derişimlerinin etkileri incelenmiştir. Yöntemin $10^{-5}$ M civarında doğrusal olduğu belirtilmiştir.

Sastry ve ark.[132] MN'nin demir klorit varlığında 3-metil-2-benzotiazolin hidrozon (MBTH) ile indirgenerek verdiği koyu mavi renkteki ürünün 650-670 nm dalga boyunda maksimum absorbans göstermesi temeline dayanan spektrofotometrik bir yöntem ile farmasötik preparatlarda ve büyük miktarlardaki örneklerde MN'yi (veya

MBS) analiz etmişlerdir. Yöntemin 0,6–7,5 µg/mL derişim aralığında doğrusal ve % 1,7 standart sapma ile % 99 geri kazanıma sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Pérez-Ruíz ve ark.[133] bir akış sistemi içinde kemilüminisans ve fotokimyasal reaksiyonu birleştirerek $K_3$ vitaminin belirlenmesini sağlamışlardır. Yöntemin, hematin ile katalizlenmiş ve luminol ile kemilüminisans reaksiyonunu gösteren hidrojen peroksit ürününe, etanolde hazırlanan $K_3$ vitamininin foto oksidasyonu temeline dayandığı belirtilmiştir. Saatte 30 analizin yapılabildiğini ve $K_3$ vitamininin $10^{-7}$–$10^{-4}$ mol/L derişim aralığında tespit edilebileceğini göstermişlerdir. Yöntemin uygulanabilirliği ise farmasötik preparatlarda $K_3$ vitamininin belirlenmesi ile gösterilmiştir.

Gil Torró ve ark.[134] immobilize çinko içeren katı-faz reaktörü ile kombine edilen bir akış enjeksiyonu kullanarak MN'nin belirlenmesi için bir spektroflorometrik yöntem geliştirmişlerdir. Akış enjeksiyon sisteminde, MN'nin bazik ortamda sodyum sülfit türevine hidrolizi ve asidik ortamda çinko reaktörde üretilmiş MN'nin indirgenmesi olmak üzere iki adımda naftahidrokinonun üretildiğini göstermişler ve elde edilen floresans ürünü, spektroflorometri yöntemiyle ($\lambda_{eks}$: 325 nm , $\lambda_{em}$: 425 nm) ölçmüşlerdir. Kalibrasyon eğrisinin % 1,6 kesinlik değeri ile 0,1–18 µg/mL arasında doğrusal ve gözlenebilme sınırının 0,005 µg/mL olduğunu belirlemişledir. Yöntemi, MN'nin belirlenmesinde üç farklı farmasötik preparata uygulamışlar ve yabancı bileşiklerin etkilerini incelemişlerdir.

Liu ve ark.[135] suda çözünen MN'nin amperometrik dedektör ile belirlenmesi için çift cam karbon elektrot serileri ile birleştirilmiş bir ters faz HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. MN, alt kısımda bulunan (üretici) çalışma elektrodunda -0,3 V'da indirgenmiş ve üst kısımda bulunan (toplayıcı) çalışma elektrodunda +0,2 V'da okside edilmiştir. Kromatografik ayırım 0,2 mol/L asetat tamponu (pH 5,50) ve metanol

hareketli faz karışımı (6/4, h/h) ile başarılmış olup yöntemin 0,9997 korelasyon katsayısı ile 35 ng–15 μg aralığında doğrusal ve gözlenebilme sınırının 15 ng olduğunu göstermişlerdir.

Li ve ark.[136] luminol ve potasyum periodat reaksiyon karışımına MBS eklenerek ikinci bir kemilüminisans emiyon olarak tanımlanan yeni bir kemilüminisans yöntemini geliştirmişlerdir. Yöntemin $2.10^{-9}$–$4.10^{-5}$ g/L derişim aralığında doğrusal olduğunu göstermişlerdir.

Berzas Nevado ve ark.[137] MN'nin floresans özelliği göstermediğini fakat indirgendiği zaman ve ayrıca b-silodekstrin (b-CD) ile kompleks yaptığı zamanda floresans ürünler verdiğini belirtmişlerdir. Ölçümler, $6{,}4.10^{-4}$ mol/L derişimde b-CD ve 0,1 mol/L sitrat tampon çözeltisi eklenerek pH 6,2'de gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrisinin % 2,2 tekrarlanabilirlik ile 0,1–2,0 mg/L derişim aralığında doğrusal, gözlenebilme sınırını 0,022 mg/L ve tayin alt sınır değerininde 0,073 mg/L olduğunu belirlemişler ve sonra geliştirdikleri yöntemi farmasötik preparatlara uygulamışlardır.

**2.3.2.4. A ve E Vitaminleri**

Zaman ve ark.[138] retinol, α-T, α-K, β-K, kriptoksantin, lutein/zeaksantin ve likopenin birlikte belirlenmesi için bir tes faz HPLC yöntemini geliştirmişler, genç ve yaşlı sağlıklı kişilerin plazmalarında bu vitaminlerin derişimlerinin belirlenmesi için uygulamışlardır. 50 μL enjeksiyon hacmi, ODS-1 kolonu, A/B hareketli faz karışımı (A: metanolde hazırlanan 100 mmol/L amonyum asetat-asetonitril, (80/20, h/h); B: suda hazırlanan 100 mmol/L amonyum asetat) ve 2 mL/dak. akış hızı çalışma parametreleri kullanılmıştır. Retinol, α-T, α-K, β-K, kriptoksantin, lutein/zeaksantin ve likopen için yöntemin günler arası kesinlikleri sırasıyla, % 2,3, % 3,3, % 2,8, % 3,6, % 3,6 ve % 3,0 olarak belirlenmiştir.

Thumham ve ark.[139] 0,25 mL plazma örneğinde retinol, α-T, α-K, β-K, β-kriptoksantin ve likopenin birlikte belirlenmesi için bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Sodyum dodesil sülfat ile karıştırılan plazma örneği tokoferol asetat içeren etanol ile deproteinize edilmiş ve heptan ile ekstrakte edilmiştir. Daha sonra organik faz uçurulmuş ve hareketli faz karışımı ile ( metanol-asetonitril-kloroform, 47/47/6, h/h/h) kalıntılar çözülmüş ve ODS-2 kolonuna enjekte edilmiştir. Retinol 325 nm'de, tokoferoller 292 nm'de ve karotenoidler 450 nm'de belirlenmiştir. Retinol, α-T, α-K, β-K, likopen ve β-kriptoksantin güniçi kesinlikleri sırasıyla % 1,7, % 2,3, % 4,1, % 10,4, % 6,4 ve % 3,6 olarak, günler arası kesinlikleri ise onbir haftada otuz farklı durumda ölçüm alınarak belirlenmiş ve bütün bileşikler için yaklaşık % 10 olarak bulunmuştur.

Talwar ve ark.[140] ODS kolonu, 0,6 mL/dak. akış hızı, metanol-asetonitril-tetrahidrofuran (75/20/5 h/h/h) hareketli fazı çalışma parametrelerini kullanarak UV dedektörlü izokratik HPLC yöntemiyle plazmada retinol, α-T ve major karotenoidlerin (β-K, kriptoksantin, likopen, lutein) miktar tayinini gerçekleştirmişler ve sağlıklı insanlarda bu vitaminleri belirlemişlerdir. Retinol için retinol asetat, α-T ve karotenoid için ise tokoferol asetat iç standardı kullanılmış olup örnekler ve ekstrakte edilmiş materyallerin stabilitesinde askorbik asidin koruyucu etkisi belirlenmiştir.

Karppi ve ark.[141] retinol, α-T ve altı karotenoidin insan plazmasında belirlenmesi için izokratik ters faz HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Yöntemin geri kazanım değerini % 80 ile % 103 arasında, güniçi kesinliğini % 1,1 ile % 9,0 arasında ve günler arası kesinliğini ise % 5,3 ile % 8,8 arasında belirlemişlerdir.

Siluk ve ark.[142] insan plazmasında all-trans retinol ve α-, β- ve γ- tokoferollerin belirlenmesinde floresans dedektörlü HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. $C_{18}$ kolununda,

metanol ve asetonitril ihtiva eden hareketli faz karışımı ile tek bir adım gradient elüsyon kullanılarak ayırımı gerçekleştirilmiştir. All-trans retinol ve α-, β- ve γ- tokoferollerin tayin alt sınırları sırasıyla 20 ng/mL, 500 ng/mL, 10 ng/mL ve 20 ng/mL'dir.

Karpinska ve ark.[143] sağlıklı çocukların ve diyet tedavisi gören çocukların plazmalarında all-trans retinol, α-T ve ubikinonun birlikte belirlenmesi için HPLC-UV yöntemi geliştirmişlerdir. RP-18 kolon, metanol-hekzan (72/28, h/h) hareketli fazı, all-trans retinol, α-T ve ubikinon için sırasıyla 324 nm, 292 nm ve 276 nm dalga boylarını kullanılarak kromatografik ayırım gerçekleştirmişlerdir. All-trans-retinolün 0,35–70 μM aralığında, α-T'nin 0,23–44 μM aralığında ve ubikinonun ise 0,12–23 μM aralığında doğrusal olduğunu belirtmişlerdir. Deproteinize edilmiş plazma örnekleri, analizden önce hekzan ile ekstrakte edilmiştir. Yöntemin güniçi ve günler arası kesinlikleri sırasıyla all-trans retinol için % 1,5 ve % 3,7, α-T için % 4,0 ve % 5,8 ve ubikinon için ise % 2,3 ve % 3,1 olarak, geri kazanım değerleride % 91 (retinol), % 86 (α-T) ve % 88 (ubikinon) olarak tespit edilmiştir.

Rodriguez-Delgado ve ark.[144] retinol ve α-T'nin belirlenmesi için HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Vitaminlerin ayrımını, metanol hareketli fazı ile izokratik elüsyon kullanılarak gerçekleştirmişlerdir. Yöntemin sağlamlılık testi yapılmış olup bağıl standart sapması % 3'den küçük bulunmuştur.

Andreoli ve ark.[145] serumda retinol, α-T ve β-K'nın birlikte belirlenmesi için $C_8$ kolon, metanol ve diklormetan (95/5, h/h) hareketli fazı kullanılan LC/APCI/MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Retinol, α-T ve β-K'nın tayin alt sınırları sırasıyla, 1,7 nM, 2,3 nM ve 4,1 nM olarak tespit etmişlerdir. Geliştirilen yöntem ile retinol, α-T ve β-K'nın derişimlerini, kışın 122 sağlıklı gönüllüden alınan serumlarda sırasıyla 2,48 μM,

38,07 μM ve 0,50 μM olarak, yazın 66 sağlıklı gönüllüden alınan serumlarda da sırasıyla 2,69 μM, 45,8 μM ve 0,90 μM olarak tespit etmişlerdir.

Paulo ve ark.[146] multivitamin ilaç formülasyonlarında, retinil asetat, propionat ve palmitat, β-K, askorbik asit ve DL-α-T'nin belirlenmesi ve kromatografik ayrımı için izokratik bir sıvı kromatografi yöntemi tanımlamışlardır. Örnekler, RP-kolonu (LiChrospher 100 RP–18), hareketli faz olarak metanolü ve UV dedektörü kullanılarak analiz edilmiştir. Bu vitaminlerin ayırımı 25 dak. içinde gerçekleştirilmiş olup tayin alt sınırları 7 ng/mL (β-K)–65 ng/mL (askorbik asit) aralığında bulunmuştur.

Barbas ve ark.[147] n-hekzan ile sıçan dokularından A ve E vitaminlerinin ekstraksiyonu ile birlikte belirlenmesi için HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. A vitaminini UV dedektör ile E vitaminini ise floresans dedektör ile belirlemişlerdir. Yöntemin, A vitamini için 3,1 nmol/g – 9,4 nmol/g derişim aralığında, provitamin A için 8,2 nmol/g – 24,7 nmol/g derişim aralığında, E vitamini için ise 0,6 nmol/g – 1,7 nmol/g derişim aralığında doğrusal olduğu, korelasyon katsayılarının 0,99'dan daha yüksek olduğu ve güniçi kesinliğinin % 1,48 – % 7,25 arasında, günler arası kesinliğinde % 4,99 – % 7,03 arasında olduğunu, geri kazanım değerlerinin de % 94.0 ± 8 – % 107 ± 5 arasında olduğunu tespit etmişlerdir.

Gimeno ve ark.[148] ODS-2 analitiksel kolon, 45°C sıcaklık, metanol, bütanol ve sudan oluşan hareketli faz, , 325 nm (retinol), 292 nm (α-T) ve 450 nm (β-K) dalga boyları ile α-T asetat iç standardı ve 2 mL/dak. akış hızı çalışma parametrelerini kullanarak HPLC yöntemiyle insan plazmasında ve LDL'de (düşük yoğunluklu lipoprotein) retinol, α-T ve β-K'ı birlikte analiz etmişlerdir.

Ruperez ve ark.[149] anestezi ile bayıltılan sıçanların plazmasında A vitamini (retinol) ve E vitamininin (α-, β- ve γ-T) belirlenmesi için bir HPLC yöntemini

geliştirmişlerdir. Yöntemin ana hedefi, küçük miktarda (50 µL) örneklerle çalışmak ve aseton ile tek adımda ekstraksiyon yapmak olarak göstermişler ve elde edilen geri kazanım değerini ise % 100 olarak belirlemişlerdir. Yöntem, $C_{18}$ kolonunda, metanol-su (95/5, h/h) hareketli fazında, DAD dedektör, floresans dedektör ve elektrokimyasal dedektörde gerçekleştirilmiştir. Elektrokimyasal dedektörde hareketli fazın elektriği iletmesi için 50 mM asetat tamponu, sodyum tuzu ve $LiClO_4$ eklenmiş ve Ag/AgCl elektroda karşı 700 mV'da karbon elektrot üzerinde analiz gerçekleştirilmiştir. Floresans dedektörde ise 295 nm eksitasyon ve 350 nm emisyon dalga boyları seçilmiştir.

Quesada ve ark.[150] HPLC yöntemi ile insan serumunda A, E ve $D_3$ vitaminlerinin belirlenmesi için katı faz ekstraksiyonunun otomatik sistemi ile bağlanmış bir sıvı faz ekstraksiyon sistemi ve DAD dedektörlü sıvı kromatografisinden oluşan bir yöntem geliştirmişlerdir. $D_3$ vitamini (metaboliti ile birlikte), E ve A vitamini sırasıyla 265 nm, 291 nm ve 325 nm dalga boylarında toplam 35 dak.'lık analiz süresinde, standart ekleme yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrilerinin korelasyon katsayılarının 0,996 ile 0,989 arasında, eğimin standart sapmasının ise % 4 ile % 4,9 arasında, yöntemin tekrarlanabilirliğinin % 4 ile % 6 arasında, yeniden üretilebilirliğin % 10,1'den daha düşük ve analitlerin tayin alt sınırlarının 3 ng/mL ($D_3$ vitamininin metaboliti), 10 ng/ml ($D_3$ vitamini), 100 ng/mL (A vitamini) ve 2 µg/mL (E vitamini) olduğunu belirlemişlerdir.

Zhao ve ark.[151] insan plazmasında β-K'nın, E ve C vitaminlerinin birlikte belirlenmesi için DAD dedektörlü HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edilen bu üç vitaminin ayırımı, RP–18 kolonunda, metanol-asetonitril-tetrahidrofuran (75/20/2, h/h/h) hareketli fazı ile 1,2 akış hızında

gerçekleştirilmiştir. C vitamini, E vitamini ve β-K'nın tayin alt sınır değerleri sırasıyla, 100 μg/mL, 0,25 μg/mL ve 0,25 μg/mL, doğrusal aralığın sırasıyla 100–5000 μg/mL, 0.25–5 μg/mL ve 0.25–5 μg/mL arasında, günçi ve günler arası kesinliklerini de sırasıyla % 15,3 ve % 16,2 olarak tespit etmişlerdir.

Mata-Granados ve ark.[152] 24R, 25 hidroksivitamin $D_3$'ün ve 25 hidroksivitamin $D_3$'ün, α-T'nin ve retinolün serumda belirlenmesi için HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Standart ekleme yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrilerinin korelasyon katsayılarının 0,999 ve 0,996 arasında, eğimin standart sapmasının % 3,2 ve % 1,6, yöntemin tekrarlanabilirliğinin % 4 ve % 6, yeniden üretilebilirliğin % 10'dan düşük ve bütün vitaminler için gözlenebilme sınırının 1 ng/mL'den düşük olduğunu belirtmişler ve yöntem ile 18-80 yaş arası sağlıklı insanların vitamin düzeylerini belirlemişlerdir.

Alvarez ve Mazancourt,[153] plazmada 25 hidroksivitamin $D_3$, 25 hidroksivitamin $D_2$, α-T ve retinolün birlikte belirlenmesi için HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Çalışmada D vitamini için 267 nm, α-T için 292 nm olmak üzere iki dalga boyu kullanılmışlardır. % 81'den daha yüksek ekstraksiyon geri kazanımı elde ettiklerini göstermişlerdir. Çalışılan dört vitamin için gözlenebilme sınırının 1,5 μg/L'den daha küçük, korelasyon katsayısının 0,999'dan büyük ve günler arası kesinliklerini de % 10,825 (hidroksivitamin $D_3$), % 11,825 (hidroksivitamin $D_2$) ve % 11,9 (α-T) olarak belirlemişlerdir.

Unalacak ve ark.[154] diyabet, bozulmuş glukoz toleransı ve bozulmuş açlık glukozu olan hastaların serumunda MDA, α-T ve β-K düzeylerini spektrofotomerik yöntem ile belirlemişlerdir. 99 hasta ve 37 sağlıklı kişi çalışmaya dahil edilmiştir. α-T'i serumdan n-heptan ile ekstrakte etmişler sonra üzerine α-α-dipridil ekleyerek 460 nm de köre karşı % T değerini okumuşlardır. Daha sonra demir-3-klorür eklemişler 510 nm de köre

karşı % T değerini okumuşlar ve [(log 519 nm -1,36)-0,32 x log 460 nm] - 0,4680 formülü ile serum α-T derişimini belirlemişlerdir. β-K'ı ise serumdan n-hekzanan ile ekstrakte ederek 450 nm de köre karşı % T değerine göre serum β-K derişimini belirlemişlerdir.

Lee ve ark.[155] insan plazmasında tokoferolleri, tokotrienolleri, karotenoidleri ve retinolü birlikte belirlemek için bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada kullanılan parametreler: sıvı-sıvı ekstraksiyon, UV dedektör, floresans dedektör, asetonitril-metanol (65/35, h/h) hareketli faz, 35°C kolon sıcaklığı ve $C_{18}$ kolon'dur. UV dedektör HPLC yönteminin tayin alt sınırlarını 0,02 mg/L (β-K, lutein, zeakzantin ve kanazantin için), 0,01 mg/L (retinol, β-kritokzantin, α-K ve likopen için) ve 0,1 mg/L (tokoferol ve tokotrienoller için) olarak tespit etmişlerdir. Floresans dedektörlü HPLC yönteminin gözlenebilme sınır değerlerinin UV dedektörlü sistemden elde ettikleri değerlerden 25 kat daha düşük olduğunu belirtmişlerdir. Bütün maddeler için geri kazanım değerlerini de % 10 ile % 90 arasında belirlemişlerdir

Nierenberg ve Nann,[156] yağda çözünen yedi vitamini (retinol, α-T, lutein, kriptoksantin, likopen, α- ve β-K) plazma ve doku örneklerinde belirlemek ve derişimleri arasındaki ilişkiyi göstermek için bir UV dedektörlü HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemde, tokoferol nikotinat iç standart olarak kullanılmış olup doku örneklerinden bu bileşiklerin belirlenmesi, mekanik homojenizasyonu takiben enzimatik bir reaksiyon ile başarılmıştır. Plazma ve katı doku örneklerinde yöntemin doğruluk ve hassasiyeti belirlenmiş olup bu değerler literatürde bulunan yöntemden elde edilen değerlerle karşılaştırılmıştır. Yöntemin uygulama aşamasında ise, kanser hastaların plazmasında ve değişken doku örneklerinde bileşiklerin derişimlerini belirlemişlerdir.

Bortolotti ve ark.[157] yeni doğan bebeklerin plazmasında retinol, α-T ve retinil palmitatın birlikte belirlenmesi için bir ters faz HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Plazma etanol ile deproteinize edildikten sonra bileşikler n-hekzan ile ekstraksiyonları gerçekleştirilmişdir. Çalışmada RP–$C_{18}$ kolon, su-asetonitril-etilasetat-2-propanol hareketli faz karışımı, gradient elüsyon ve 305 nm dalga boyu parametreleri kullanılmıştır. Yöntemin tayin alt sınırları, 0,1 μg/mL (retinol için), 1,3 μg/mL (α-T için) ve 0,95 μg/mL (retinil palmitat için) ve tüm analitler için doğruluk ve kesinlik değerlerinin % 8'den küçük olduğu belirtilmiştir.

Finckh ve ark.[158] kulorimetrik elektrokimyasal dedektörlü HPLC yöntemiyle 5 veya 10 μL yeni doğan çocukların plazmasında α-T, γ-T, ubikinol-10, ubikinon-10, β-kriptoksantin ve β-K gibi lipofilik antioksidanları belirlemişlerdir. İnternal standart olarak kullanılan γ-tokotrienol, ubikinon-7, ubikinol-9, ubikinon-9 ve etil β-apo-8′-karotenoat ile birlikte analitlerin ekstraksiyonları gerçekleştirilmiş ve daha sonra bu bileşikler bir RP $C_2/C_{18}$ kolonu üzerinde ayrılmıştır. Kulorimetrik elektrokimyasal dedektörün indirgenme ve yükseltgenme modu (−0,60 V, −0,15 V, +0,60 V) kullanılarak bileşikler analiz edilmiştir. Tüm bileşiklerin tayin alt sınırlarının plazma çözeltilerinde 0,004–0,012 μmol/L derişim aralığında ve standart çözeltilerinde ise 21–60 fmol/L derişim aralığında olduğunu, yöntemin güniçi kesinlik değerinin % 3 ile % 14 arasında değiştiğini göstermişlerdir.

Lane ve ark.[159] insan plazmasında retinolün, tokoferollerin ve karotenlerin birlikte belirlenmesi için ters faz HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Tek bir enjeksiyonla β-K'nın mono-cis geometrik izomerlerini, retinol, retinyl asetat, α-T γ-T, α-T asetat, all-trans-α-K ve all-trans-β-K'ı ayırmayı başarmışlardır. Analitik ayrılmalar 60 dak.'lık bir zaman içinde 0,8 mL/dak. akış hızında metanol-metil tersiyel butil eter-su (80/20/5,

h/h/h) hareketli faz karışımı ile Suplex pKb–100 ters faz analitik kolonu üzerinde 0°C'de gerçekleştirilmiştir.

Göbel ve ark.[160] 100 µL plazmada, retinol ve tokoferollerin düşük derişimlerini belirlemek için izokratik ters fazlı bir HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Retinol, UV-Görünür Bölge detektör ile belirlenirken, tokoferoller floresans dedektör ile belirlenmiştir. Retinol ve α-T için güniçi ve günler arası doğruluk değerleri sırasıyla % 3,7 – % 4,3 ve % 2,3 – % 6,1 arasında, kesinlik değerleri ise sırasıyla % 0,2 – % 6,0 ve % 3,0 – % 5,5 arasında belirlenmiştir.

Steghens ve ark.[161] serumda β-K içeren yedi karotinoidi, retinol, α-T ve iki iç standardın (tokol and ekinenon) birlikte analizi için ters faz HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Çalışmada, $C_{18}$ (3 µm, 250×4,6 mm) kolon, gradient elüsyon, % 0,05 asetik asit içeren asetonitril-metanol hareketli faz çalışma parametreleri kullanılmıştır. Kromatogramlar dört farklı dalga boyunda (292 nm, 325 nm, 450 nm ve 473 nm) elde edilmiştir.

Weinmann ve ark.[162] prematüre yeni doğanlardan alınan 100 µL serum örneklerinde retinol ve tokoferolün birlikte belirlenmesi için izokratik HPLC yöntemi kullanmışlardır. Retinol ve retinil asetat florometrik olarak saptanmış olup toplam analiz süresinin 4 dak. olduğunu göstermişlerdir. Güniçi ve günler arası % BSS değerleri; retinol için % 5,6 ve % 8,1 olarak ve tokoferol için % 3,6 ve % 6,7 olarak bulunmuştur.

Sobczak ve ark.[163] insan serumunda bulunan retinol ile α- ve γ-tokoferollerin birlikte belirlenmesi bir floresans dedektörlü basit bir ters fazlı HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırım, 1,5 mL/dak. akış hızında, A ve B hareketli faz karışımının (A: asetonitril – bütanol (95/5, h/h), B: su) gradient elüsyonu ile başarılmıştır.

Erhardt ve ark.[164] 20 μL plazmada retinolün, tokoferollerin, β-K'nın, C vitaminin ve homosisteinin analiz edilebilmesi için varolan yöntemleri modifiye etmişlerdir. Kan örnekleri deriye yarık atılarak elde edilmiş olup HPLC analizleri izokratik elüsyon ve ön kolon türevlendirilmesi ile başarılmıştır. Geliştirilen yöntemde, güniçi ve günler arası varyasyon katsayısı % 8'in altında ve regresyon katsayısı tüm analitler için 0,99'dan daha iyi olduğu tespit edilmiştir.

Epler ve ark.[165] insan serumunda retinol, retinil palmitat, α-, γ- ve δ-T ile 6 major karotenoidin (lutein, zekzantin, β-kriptoksantin, likopen, α- ve β-K) analizi için bir sıvı kromatografi yöntemini geliştirmişlerdir. Retinoidler ve karotenoidlerin belirlenmesi için UV dedektör kullanılırken tokoferollerin analizlerinde floresans dedektör kullanılmıştır. Vitaminlerin ayırımı, asetonitril, metanol ve etil asetat içeren bir hareketli faz kullanmışlardır. Geliştirilen bu yöntem ile polar karotenoidleri (2',3'-anhidrolutein, alfa-kriptoksantin, likopenin geometrik izomerleri ve β-K) birbirinden ayırmışlar ve yöntemin aynı zamanda yiyeceklerin analizlerinde de uygulanabilir olduğunu söylemişlerdir.

Heudi ve ark.[166] 40 aylık bebek yiyeceklerinde A, D ve E vitaminlerinin birlikte belirlenmesi için LC/APCI/MS yöntemini önermişlerdir. 5,7 dimetiltokol (DMT) iç standart olarak kullanılmış ve vitaminlerin belirlenmesi için SIM modu seçilmiştir. Kalibrasyon eğrileri sırasıyla, 0,15 – 12mg/L (A vitamini), 5 – 400 μg/L ($D_3$ vitamini), 0,25 – 20 mg/L (E vitamini) derişim aralıklarında çizilmiş olup korelasyon katsayılarının 0,996'dan daha büyük olduğunu ve tayin alt sınırlarının ise 1,4 ng'nin aşağısında olduğunu belirtmişlerdir. Tekrarlanabilirlik değerlerinin sırasıyla % 2,3 (A vitamini), % 2,6 (E vitamini) ve % 5,9 ($D_3$ vitamini) olduğunu ve 6 günde yapılan

günler arası kesinlik değerinin ise her üç vitamin için % 2,4 – % 6,9 arasında olduğunu göstermişlerdir.

Sun[167] multivitamin tabletlerde A ve E vitaminini ve karotenleri belirlemek için bir UV dedektörlü ters faz sıvı kromatografi yöntemini geliştirmiştir. Örnekleri dimetil sülfoksit ile çözmüş ve sonra hekzan ile ekstrakte etmiştir. Bu vitamininlerin ayırımlarını, RP-18 kolonunda, % 0,25 amonyum asetat içeren metanol, asetonitril ve % 0,05 trietilamin içeren diklormetan hareketli fazı ile 1,2 akış hızında ve 25°C'de gerçekleştirmiştir. UV dedektörü, retinol için 325 nm'ye tokoferol için 285 nm'ye ve karotenler için 450 nm'ye ayarlamış olup gözlenebilme sınırlarını sırasıyla 0,3 ng, 10 ng, 0,4 ng olarak bulmuştur. Güniçi ve günler arası kesinliklerini ise % 1,40 - % 5,20 arasında değiştiğini belirtmiştir.

Scalia ve ark.[168] süperkritik akış ekstraksiyonu kullanarak tabletlerde A ve E vitaminini ile bu vitaminlerin asetat ve palmitat esterlerini belirlemek için HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Ekstraksiyon işlemini 250 atm basınçta ve 40°C'de süper kritik $CO_2$ ile 15 dak. içinde gerçekleştirilmiştir. Ticari tabletlerden vitaminlerin analizi için geliştirilen bu ekstraksiyon yöntemini, sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile karşılaştırmışlar ve geri kazanım değerinin % 95'den daha fazla olduğunu göstermişlerdir.

Sha-Er ve Yi-Er[169] yağda çözünen vitaminlerin, su ve izopopanol hareketli faz karışımı ile kombine edilmiş ters faz sıvı kromatografi yöntemi ile kromatografik davranışlarını incelemişlerdir. Vitaminlerin ayırımı, 280 nm'de 15 dak. içinde $C_{18}$ kolonda gerçekleştirmişlerdir. Örnek ekstraksiyonunda ise farklı çözücüler kullandıklarını belirtmişler ve geri kazanımın % 95'in üzerinde olduğunu belirtmişlerdir.

Moreno ve Salvadó[170] HPLC yöntemiyle multi-vitamin tabletlerde yağda ve suda çözünen vitaminleri belirlemişlerdir. Yağda çözünen vitaminler katı faz ekstraksiyon

yöntemi ile ekstrakte etmişler ve kromatografik ayırımı $C_{18}$ kolonda metanol ve kloroformu içeren hareketli faz karışımı ile gerçekleştirmişlerdir. Vitaminlerin geri kazanımlarının % 78 – % 116 arasında değiştiğini belirtmişlerdir.

Wang ve Huand[171] yağda çözünen vitaminlerin beirlenmesi için HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Kozmetik ve farmasötik ürünlerde β-K ve vitamin A palmitatı, insan ve sığır serumunda A, D ve E vitaminlerini belirlemişlerdir. Yağda çözünen on vitaminin ayırımını, asetonitril-diklormetan-metanol (60/20/20, h/h/h) hareketli faz karışımı ile $C_{18}$ kolonunda başarmışlardır. LOD değerlerini sırasıyla 0,03 ng/mL (retinol), 0,01 ng/mL (retinil asetat), 0,55 ng/mL (retinil palmitat), 1,84 ng/mL (β-K), 0,02 ng/mL (erqokalsiferol), 0,02 ng/mL (kolekalsiferol), 0,10 ng/mL (tokoferol), 0,33 ng/mL (tokoferol asetat), 0,01 ng/mL (filokinon), 0,01 ng/mL (MN) olarak belirlemişlerdir.

Vliet ve ark.[172] β-K veya kantazantin ile beslenen ratların plazma ve dokularında retinol, retinal, retinoik asit, retinil asetat, retinil palmitat, α-, β- and γ-K, β-apo-6′-,β-apo-8′-, β-apo-10′- and β-apo-12′-karotenal, etil β-apo-8′-karotenat, α-T ve α-tokoferil asetatın belirlenmesi için iki farklı sistemde HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Birinci sistemde kromatografik ayırım, Hipersil-ODS kolonda asetonitril-metilen klorit-etanol ve sudan (70/10/15/5, h/h/h/h) oluşan hareketli faz karışımı ile gerçekleştirilmiştir. İkinci sistemde ise kromatografik ayırım, Nükleosil $C_{18}$ kolununda asetonitril ve 0,1 M amonyum asetattan (80/20, h/h) oluşan hareketli faz ile gerçekleştirilmiştir. Standart çözeltilerde gözlenebilme sınırları, retinoller ve karotenler için 10 ng/mL, E vitaminleri için 60 ng/mL olarak tespit etmişlerdir. Ratların plazma ve doku analizleri yapılmadan önce ratlar 2 hafta boyunca β-K (2 mg/g) ve kantazantin (2 mg/g) ile ayrı ayrı

beslenmişlerdir. Yapılan analiz sonucunda β-K'nın retinole çevrilmesini, β-K ve kantazantinin vücutta depolanmasını ve taşınmasını incelemişlerdir.

**2.3.2.5. A ve K Vitaminleri**

Man Po ve ark.[173] tavşan plazmasında retinoik asit, retinol, retinal, $D_2$, $D_3$, $K_1$, $K_2$ ve $K_3$ vitaminlerini içeren sekiz vitaminini birlikte analizi için HLPC yöntemini geliştirmişlerdir. Sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edilen vitaminleri 245 nm'de UV dedektör ile analizi etmişler ve absorbans cevabının ng seviyede olduğunu göstermişlerdir.

**2.3.2.6. A, E ve K Vitaminleri**

Chatzimichalakis ve ark.[174] retinol menadion, menakinon, α-T, kolekalsiferol, α-T asetat ve filokinonu içeren sekiz yağda çözünen vitamininin biyolojik sıvılarda (serum ve idrar) birlikte belirlenmesi için basit ve hızlı bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Ksentofili iç standart olarak kullanmışlar ve kromatografik ayırım, asetonitril ve metanolden oluşan hareketli faz karışımının doğrusal gradient elüsyonu ile gerçekleştirmişlerdir. Dedektörün dalga boyu, iç standart için 480 nm ve vitaminler için 280 nm olarak seçilmiştir. Biyolojik sıvılarda bulunan endojen interfereleri ayırmak için katı faz ekstraksiyonu uygulamışlar ve serumda % 95 – % 97,6 idrarda ise % 94,2 – % 95,8 arasında değişen yüksek geri kazanım oranları sağladıklarını belirtmişlerdir.

Piccione ve ark.[175] yağda çözünen vitamin (A, D, E ve K) derişimlerinin at kanlarındaki günlük değişimini incelemişlerdir. Çalışmaya sabah $8^{00}$'de başlamışlar ve 4 saat aralıklar ile 48 saat boyunca atlardan serum örnekleri toplamışlardır. Serum vitamin derişimleri, A ve K vitaminlerini floresans dedektör ile ve D ve E vitaminlerini UV dedektör ile kombine edilmiş HPLC yöntemi ile ölçülmüştür. Bütün vitaminlerin günün belirli bir saatinde yüksek derişime ulaştığını göstermişlerdir.

Motchnik ve ark.[176], insan plasmasında antioksidanların derişimi ile diet, oksidatif stress ve hastalık arasındaki ilişkinin anlaşılması ve incelenmesinde önemli olduğunu belirtmişler ve bu bileşiklerin belirlenmesi için elektrokimyasal dedektörlü HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri HPLC yönteminin hem su hem de yağda çözunen antioksidanların belirlenmesi için uygulanabilir olduğunu göstermişlerdir.

Rizzolo ve Polesello[177] besinlerde, yağda ve suda çözünen vitaminlerin belirlenmesi için kromatografik yöntemleri araştırmışlardır. Her bir vitamin için örnek hazırlama, teşhis problemleri ve kromatografik durumları belirtmişler ve tartışmışlardır. Özellikle rutin çalışmalarda vitaminlerin belirlenmesi için HPLC'nin standart bir yöntem olduğunu ve hatta UV dedektörü kullanılsa bile çok hassas yöntem olduğunu belirtmişlerdir.

Wielinski ve Olszanowski[178] ilaç kapsülünde retinol asetat, retinol palmitat, kolekalsiferol, α-T asetat, α-kalsidol ve filokinonun birlikte belirlenmesi için herhangi bir ekstraksiyon işlemi uygulamadan bir ters faz HPLC yöntemi geliştirmişler ve geçerlilik testlerini yapmışlardır. Ayırım, $C_8$ kolonunda asetonitril-metanol hareketli fazı kullanarak gerçekleştirilmiş olup kapsül örnekleri analiz edilmeden önce n-hekzan ve metanol ile seyreltilmiştir. Bütün bileşikler için tayin alt sınırları 0,259–2,379 μg/mL arasında ve ortalama geri kazanımının ise % 91 olduğunu göstermişlerdir. Bağıl standart sapma değerine göre hesaplanan kesinliğin ise % 1,76'den daha düşük olduğunu ve örnek hazırlama boyunca bileşiklerin stabil kaldığını belirtmişlerdir.

Huyghebaert ve ark.[179] A, $D_3$, E ve $K_3$ vitaminlerinin stabilitesini belirlemeyi ve ayrıca vitaminlerin uygun ve kabul edilebilir dozda çocuk ve yaşlı kişilere uygulanabilmesi için uygun bileşik formülünü geliştirmeyi amaçlamışlardır. Vitamin A

asetat, $D_3$ and E vitamininin stabilitesini HPLC yöntemi ile $K_3$ vitamininin stabilitesini ise spektrokimyasal yöntem ile değerlendirmişlerdir.

Capote ve ark.[180] insan serumunda yağda çözünen vitaminler ($K_1$, $K_3$, A, $D_2$, $D_3$ ve E (α ve β-T) ve metabolitlerinin (25-hidroksivitamin $D_2$, 25-hidroksivitamin $D_3$ ve 1,25-dihidroksivitamin $D_3$) belirlenmesi için LC/ESI-MS/MS yöntemini geliştirmişlerdir. MS/MS analizinde düşük gözlenebilme sınırını sağlamak için (0,012 ng/mL'den 0,3 ng/mL'e kadar değişen değerlerde) her bir analit için çok hassas geçiş sağlayan MRM yöntemini kullanmışlardır. Serumdan proteinler ayırdıktan sonra sıvı-sıvı ekstraksiyonu gerçekleştirmişlerdir. Yöntemin güniçi kesinliğini % 3,17 – % 6,76 arasında günler arası kesinliğini ise % 5,07 – % 11,53 arasında belirlemişlerdir.

## 2.4. Spektrokimyasal Yöntemler

Spektrokimyasal yöntemler, atomik ve moleküler spektroskopiye dayanan geniş bir analitik kimya yöntemler grubudur.

Spektroskopi günümüzde görünür ışınları, X-ışınlarını, ultraviyole (mor ötesi), infrared (kızıl ötesi), mikro dalgaları ve radyo frekansları da içine alacak şekilde çeşitli tipte ışınların madde ile etkileşmesini inceleyen bilim dalıdır. Spektroskopi elektromagnetik ışıma ile madde arasındaki etkileşimi incelemenin yanı sıra madde ve diğer enerji türleri arasındaki etkileşimleride incelemektedir.[181-183]

### 2.4.1. UV-Görünür Bölge Spektroskopisi

Ultraviyole ve görünür bölgede meydana gelen absorpsiyon, genel olarak bağ elektronlarının uyarılmasından kaynaklanır.

Buradan hareket edilerek, absorpsiyon piklerinin dalga boyları, incelenen türlerdeki bağların tipleriyle ilişkilendirilebilir.

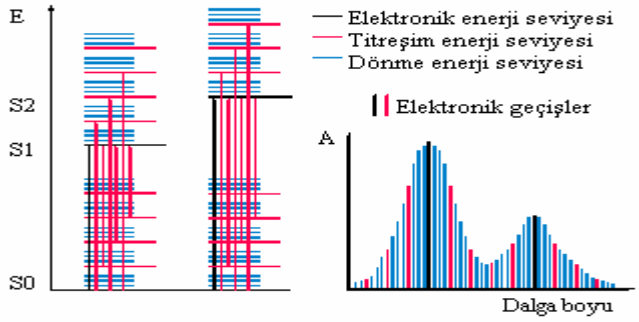
Moleküller, infrared ışınları gibi UV-görünür bölge ışınları ile uyarıldıkları zaman, kuantlaşmış 3 tip geçiş vardır. Bunlar elektronik, titreşim ve dönme geçişleridir. Bir molekülün toplam enerjisi $E_T$;

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

Elektronik geçiş enerjisi; molekülün çeşitli dış orbitallerindeki elektronlarla ilişkin enerji, titreşim enerjisi; atomlar arası titreşimlere ilişkin enerji, dönme enerjisi ise molekül ağırlık merkezi etrafında dönmesine ilişkin enerjidir.[181,182] Titreşim ve dönme geçişleri çok atomlu moleküller için geçerlidir. Moleküler bir M türünün ultraviyole veya görünür ışını absorplaması iki basamakta cereyan eden bir olaydır.

En yaygın durulma tipi uyarılma enerjisinin ısıya dönüştüğü durumdur (Şekil 2.8).

UV-Görünür Bölge spektrofotometrik ölçümler nitel ve nicel analizde en çok kullanılan yöntemlerden birisidir. Maddenin ışığı soğurma (absorplama) derecesini ölçmek ve bundan yararlanarak derişimi saptamak için, soğurma ile derişim arasındaki ilişki bilinmelidir.




Şekil 2.8: Moleküllerin UV-Görünür Bölge spektrumları ve elektronik geçişleri

Monokromatik (tek dalga boylu ışıma) ve $I_o$ şiddetindeki bir ışık demeti, kalınlığı b cm olan bir tüpte bulunan çözeltideki herhangi bir molekül tarafından absorplandığında şiddeti azalır ve tüpü I şiddetinde terk eder. Moleküllerin seçilen dalga boyundaki ışığı absorplaması sonucu ortaya çıkan azalma Lambert-Beer eşitliği ile verilir.

$$\log \frac{I_0}{I} = \varepsilon bc = A$$

Bu eşitlikte, A: absorbans, $I_0$: Örnek kabına giren ışığın şiddeti, I: Örnek kabını terk eden ışığın şiddeti, ε: Molar absorpsiyon katsayısı (L/mol.cm), b: Örnek kabının kalınlığı (cm), c: Derişim (mol/L)'dır.

Örnek kabını terk eden ve kaba giren ışık şiddetleri arasındaki orana geçirgenlik (T) denir.

$$\frac{I}{I_0} = T = 10^{-\varepsilon bc}$$

Absorbans ile geçirgenlik arasında,

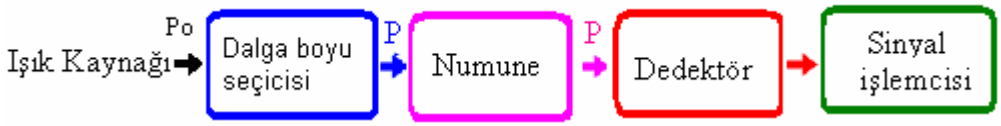
$$A = -\log T = 2 - \log \% T$$

ilişkisi vardır ve %T, yüzde geçirgenlik adını alır.

Maddenin ışığı absorplamasını incelemek için spektrofotometre adı verilen bir düzenek kullanılır (Şekil 2.9) ve başlıca ışık kaynağı, monokromatör, örnek kabı ve dedektörden oluşur. Bu tür cihazlarda, radyasyon kaynağı olarak UV ve görünür bölgede ışıma yapan tungsten, hidrojen, döteryum ve ksenon lambaları gibi sürekli ışık kaynakları kullanılır. Sıvı numuneler için örnek kabı olarak 200-320 nm dalga boyu aralığında kuartz, 320-700 nm aralığındaki bölgede ise cam küvetler kullanılabilir. Örneğin ışığı absorplayıp absorplamadığını anlamak için, ışık kaynağından gelen ışığın şiddeti dedektör ile ölçülür. UV ve görünür bölgede fotovoltaik veya fotoiletken

dedektörler, fototüpler ve fotoçoğaltıcı tüpler dedektör olarak kullanılmaktadır. Spektrofotometrelerde bu ana bileşenlerden başka ışığı toplamak, yansıtmak, bölmek amacıyla mercekler, aynalar, ışık bölücüleri de kullanılır.

Çeşitli kromofor grupların (bir molekülde belli bir dalgaboyu aralığındaki ışığın absorpsiyonundan sorumlu olan fonksiyonel gruplar) absorpsiyon bantları geniş oldukları için birbirleriyle örtüşürler. UV ve görünür bölge spektroskopisi ile hem kalitatif analiz hem de kantitatif analizde kullanılabilmektedir.




Şekil 2.9: Spektrofotometre cihazının basit bir diyagramı

Kantitatif analizde, ilk önce analizi yapılacak maddenin en iyi absorbans yaptığı dalga boyu belirlenir. Belirlenen dalga boyunda artan derişimlerde hazırlanan bir seri çözeltinin spektrumları alınır ve absorbansları okunur. Derişime karşı absorbans grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edilir. Sonra bilinmeyen maddenin derişimi kalibrasyon eğrisi yardımıyla tespit edilir.[181-183]

**2.5. Türev Spektrofotometri Yöntemi**

Türev spektroskopisi, dalga boyunun bir fonksiyonu olarak dalga boyuna karşı absorbansın 1,2,3,….n türevidir. Türev spektrofotometrisi, türev spektrumlarının kullanılması esasına dayalı bir analiz yöntemidir.

UV-Görünür Bölge Spektrofotometrik yöntem, çözeltide bulunan absorbans gösteren diğer moleküllerin varlığında istenilen molekülü belirlemek için yeterince

hassas bir teknik değildir. Türev spektrofotometri yöntemi ile geniş pik maksimumlarının dalga boylarını doğru bir şekilde belirlemek mümkündür. Bu şekilde sadece pik omuzlanmaları ve pik genişlemesi önlenmiş olmayıp aynı zamanda ikinci planda absorblanan interfere maddelerin piklerinden de molekülün karakteristik pikleri izole edilmiş olmaktadır. 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. Bu yöntemle karışımların analizleri de yapılabilmektedir. Spektrofotometrede bulanık çözeltiler ile çalışırken çökme hızı tanecik büyüklüğü gibi etkenlere bağlı olarak büyük oranda hata yapılırken türev alınarak bulanıklığın oluşturduğu bu etki ortadan kaldırılabilir. Yöntemin dezavantajı ise, yüksek türev derecelerinde S/G oranın bozulması, pik şekillerinde bozulma ve dönüm noktası kaymasıdır. Bu nedenle uygulanacak türevin derecesi iyi seçilmelidir.

UV spektrumu, madde üzerine gönderilen ışığın dalga boylarına karşı absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilir. Orijinal spektrum veya sıfırıncı derece spektrum $A=f(\lambda)$ fonksiyonudur. Bir fonksiyonu gösteren eğrinin herhangi bir noktasındaki teğetinin eğimi, fonksiyonun bu noktadaki türevidir. Bu fonksiyonun her noktasındaki türevi $(dA/d\lambda)$ hesaplanabilir. Eğer bu türev değerleri grafiğe geçirilecek olursa "türev spektrumu" elde edilir. 1' den n' e kadar derecede olabilir. Türevlendirme ile spektrum daha ayrıntılı ve net bir görünüm kazanır (Şekil 2.10). Orijinal Gauss eğrisi tipindeki bir pike karşılık n. türevde n+1 tane maksimum ve minimuma rastlanmaktadır. Yani birinci derece türev eğrisinde iki, ikinci derece türev eğrisinde üç, üçüncü derece türev eğrisinde ise dört tane maksimum ve minimum nokta görülmektedir.[184,185]

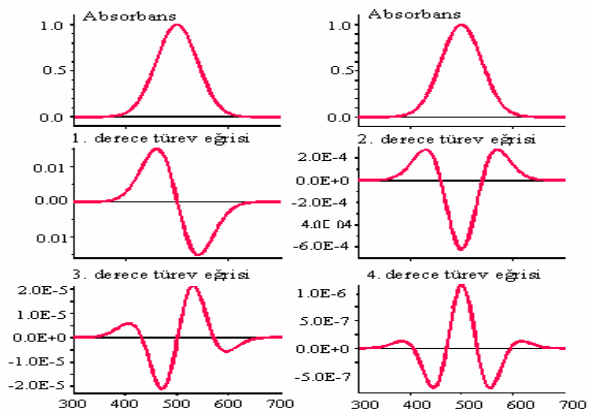
Teorik olarak türev absorbans değerleri ile bileşiğin derişimi arasında aşağıdaki bağıntılar mevcuttur. Aşağıdaki eşitlikerde, A; absorbans, ε; molar absorpsiyon katsayısı (L/mol.cm), b; örnek kabının kalınlığı (cm), c; derişim (mol/L)'dir.

0. türev (UV absorbans) spektrumları için $A = \varepsilon \times b \times c$

1. türev spektrumları için $dA/d\lambda = d\varepsilon/d\lambda \times b \times c$

2. türev (UV absorbans) spektrumları için $dA^2/d\lambda^2 = d^2\varepsilon/d^2\lambda \times b \times c$

n. türev (UV absorbans) spektrumları için $dA^n/d\lambda^n = d^n\varepsilon/d^n\lambda \times b \times c$




Şekil 2.10: Absorbans ve türev eğrisi spektrumları

*Türev Spektrumlarının Değerlendirilmesi:* Absorbansın türevi derişimle doğru orantılıdır. 1. ve 2. derece türev spektrumlarında ordinat değişimleri, orijinal spektrumun ordinat değerinin büyüklüğüyle değil, eğim değişimiyle ilgilidir. Bu nedenle türev eğrisinin apsisteki konumu ile dönüm noktalarının birbirine karşı durumları karakteristiktir. Türev spektrumlarının değerlendirilmesinde üç yöntem vardır. Bunlar, pikten pike ölçüm, pikten sıfıra ölçüm ve teğet ile ölçümdür.[184,185]

## 2.6. Kromatografik Yöntemler

Akış halinde gaz veya sıvı bir fazla birlikte karışımdaki bileşenler, durgun faz üzerinden geçirilir; bileşenlerin göç hızlarına bağlı olarak ayırma gerçekleşir. Kimyasal maddeler sabit bir ortama ilave edilip bunların belli bir çözücüyle yüzey adsorpsiyonu, dağılma, iyon değiştirme ve elenme özelliklerine bağlı olarak, bu sabit ortamdan ayrılma yöntemlerine kromatografi denilmektedir.

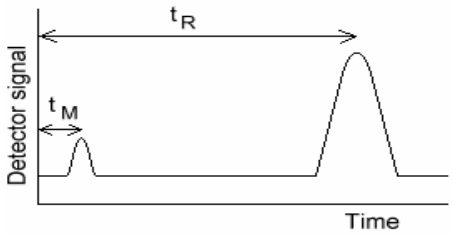
### 2.6.1.Kromatografinin Dayandığı Temeller

Kromatografide bulunan denge, bir analitin hareketli ve sabit faz arasındaki transferini kapsayan aşağıdaki basit eşitlikle tanımlanır.

$$A_{hareketli} \Longleftrightarrow A_{sabit}$$

Bu reaksiyon için denge sabiti, K partisyon oranı veya katsayısı olarak adlandırılıp analitin sabit faz içindeki molar derişiminin, haraketli faz içindeki molar derişimine oranıdır.

Bir analit piki için, numunenin enjeksiyonundan sonra dedektöre ulaşması için gereken zamana alıkonma zamanı denir ve $t_R$ ile gösterilir(Şekil 2.11).




Şekil 2.11: Tek bileşenli bir bileşik için tipik bir kromatogram

Genellikle numune veya hareketli faz tutunmayan bir pik içerir. Tutunmayan maddenin dedektöre ulaşması için geçen zamana ölü zaman denir ve $t_m$ ile gösterilir.

Analitin göç etme hızı: (kolon dolgu uzunluğu/ ölü zaman) olarak ifade edilir.

Analitin kolon üzerindeki göç hızını tanımlamak için kapasite faktörü ($k_A$) parametresi kullanılır.

$k_A$: [(analitin alıkonma zamanı-ölü zaman)/ ölü zaman] eşitliği ile gösterilir. İdeal bir ayırım için kapasite faktör değeri 1 ile 5 arasında olmalıdır.

Bir kolonda iki analitin ne kadar iyi ayrılacağını seçicilik faktörü ($\alpha$) terimi belirler. $\alpha$ değeri daima birden büyük olmalıdır.

$\alpha$: (daha kuvvetli tutunan bileşiğin partisyon oranı/daha az tutunan bileşiğin partisyon oranı) eşitliği ile ifade edilir. Aşağıda deneysel bir kromatogramdan $\alpha$'yı tayin etmeye izin veren bir eşitlik verilmiştir.[181,182]

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

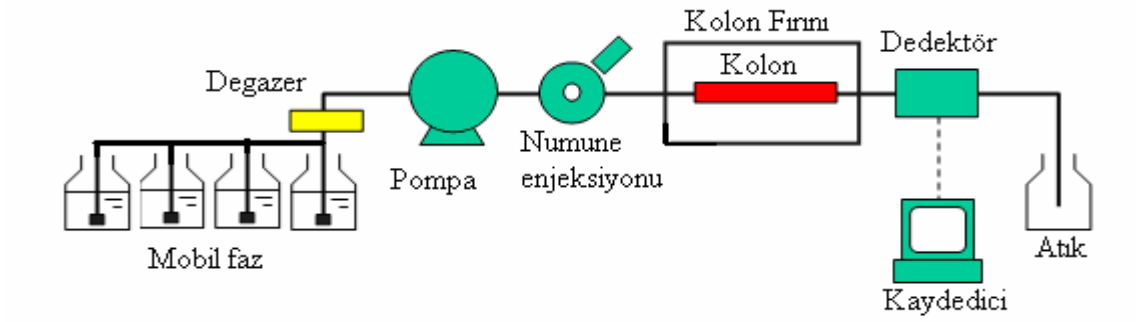
### 2.6.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC)

HPLC bütün ayrım teknikleri içinde en geniş kullanım alanına sahip yöntemlerden birisidir. Bu kadar çok kullanılan bir yöntem olma sebepleri olarak hassasiyet, doğru kantitatif ölçümlere çabuk adapte edilebilirlik, uçucu olmayan ve termal kırılganlığı olan maddelerin ayrımını sağlayabilme ve bütün bunların üzerinde, temel endüstri ve bilimde ilgilenilen maddelerin üzerinde geniş uygulanabilirlik olarak sıralayabiliriz.

#### 2.6.2.1.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Cihazı

HPLC cihazı, kendine özgü işlevlere sahip olan pompa, enjektör, kolon, dedektör ve kaydedici olmak üzere beş ana bölümden oluşan bir sistemdir (Şekil 2.12).

Bir HPLC cihazı, bir veya daha fazla, her biri 200–1000 mL çözücü içeren camdan veya çelikten yapılmış hareketli faz haznesi içermektedir. Bu hazneler çoğu zaman kolonda ve dedektör sisteminde gaz oluşturarak bozucu etkilere sebep olan çözünmüş gazların giderilmesi için degazer olarak adlandırılan bir cihazla donatılmıştır.




Şekil 2.12: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi cihazının şematik görünüşü

Kolon içinden hareketli fazın akışı pompa ile gerçekleştirilir. Pompalar, sabit basınçlı ve sabit akışlı pompalar olmak üzere ikiye ayrılırlar. Sabit akışlı pompa, herhangi bir nedenle oluşan sistemin iç basınç değişikliğini motorla sağlanan basınç değişikliği ile kapatarak sabit akışı sağlar. Numune enjeksiyonu yüksek basınçta yapılır. Enjekte edilen numune, yüksek basınçta haraket eden faza karışır ve kolona haraketli fazda çözünmüş halde ulaşır. Ulaşma çok küçük bir hacim içinde olur. Çünkü haraketli faz sıvısının, büyük bir kısmı yan geçişten yoluna devam ederken, çok az bir kısmı numuneyle karışıp ana haraketli fazla birleşir. Böylece numune fazla seyrelmeden kolona ulaşır. HPLC sistemlerinde, valf enjektörler ve şırınga enjektörler olmak üzere iki tip enjeksiyon kullanılmaktadır ve enjekte edilecek numune miktarı birkaç µL'den 500 µL'ye kadar değişebilir. Paslanmaz çelikten veya plastikten yapılan kolon sistemin en önemli kısmı olup tipik bir HPLC kolonunun çapı 3–4 mm, uzunluğu 10-40 cm'dir. Bazı özel durumlarda kolonun çapı 100 cm'ye kadar uzatılabilir. Dolgu maddesi taneciklerinin çapı ise 5–10 µm arasında değişir ve sistemin performansını büyük ölçüde belirleyen niteliktedir. Kolonun içinde, duran faz olarak katı bir destek maddesi ve üzerine fiziksel veya kimyasal bağlarla bağlanmış ince bir organik film bulunur. Sıvı kromatografisinde kullanılan en yaygın katı destek maddesi silisyum dioksittir.

Preparatif çalışmalarda kullanılan kolonların çapları daha geniştir. Çok pahalı analitik kolonların ömrünü uzatmak için koruyucu kolon kullanılabilir. Boyu 2-10 cm arasında değişen ve iç çapı analitik kolona eşit olan bu koruyucu kolon, enjektör ile analitik kolon arasına yerleştirilir ve örnek içindeki parçacıkları ve safsızlıkları tutarak analitik kolonun dolgu materyaline bağlanmasına engel olur. Dedektörler, kolondan çıkan elüatın içindeki maddeleri saptamaya yarayan aletler olup temelde genel ve özel amaçlı olmak üzere ikiye ayrılır. Genel amaçlı dedektörler, haraketli fazın kırılma indisini, dielektrik sabitini ve yoğunluğunu ölçen dedektörlerdir. Bu özellikler çözünenin derişimine ve türüne bağlı olarak değişir. Özel amaçlı dedektörler ise UV absorpsiyonunu, floresansını ve difüzleme akımını ölçen dedektörlerdir. Özel amaçlı dedektörler, UV dedektörleri, Diod-Array dedektörleri, floresans dedektörleri, elektrokimyasal dedektörleridir. UV dedektörü, fotometrelerden farklı olarak, küçük bir akış hücresi taşıyan ve bu hücrenin içinden geçerken maddeler tarafından absorblanan UV radyasyonu ya da görünen ışığı saptayabilen dedektörlerdir. Bu dedektörler, sabit ve değişken dalga boylu dedektörler olmak üzere ikiye ayrılırlar. Bu dedektörlerden başka kondüktivite, kütle spektrometre, radyoaktivite, fotokondüktivite, IR ve kütle dedektörleri gibi dedektörler bulunmaktadır.[181,182,186-188]

## 2.7. Yöntem Geliştirme ve Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)

Analitik kimyada, uygun zamanda, doğru ve güvenilir veri sağlamak çok önemlidir. Analitiksel verini niteliği, yöntem geliştirme ve geçerlilik testleri, prosesinin kalitesi üzerinde direk bir etkiye sahiptir. Yöntem geliştirme ve geçerlilik testlerinde ilk adım, yöntem için kabul edilebilir şartlar olan minimum kriterler belirlemektir.

### 2.7.1 Yöntem Geliştirme

Yöntem geliştirme basamakları aşağıda belirtilmektedir.

1. Yöntemin amacını, kapsamını ve uygulaması tanımlanmalıdır.
2. Yöntemin performans parametreleri ve kabul kriterleri tanımlanmalıdır.
3. Cihazın performans karakterleri tanımlanmalıdır.
4. Çalışılan materyaller nitelenmelidir.
5. Son olarak yöntem geliştirilip belgelenmelidir.

### 2.7.2. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)

Yöntem problemleri, geçerlilik testlerinin tamamını yapmakla minimize edilebilir. Geçerlilik testi, bir analitik uygulamada, bir analiz yönteminin performans özelliklerinin, tasarlanmış amaçlara uygun olduğunu göstermek için yapılan işlemlerin tümüdür.

Analitik alanda farklı amaçlara göre düzenlenen kurallar dünyanın farklı bölgeleri ve farklı amaçlara göre farklılıklar göstermektedir. Yöntem geçerlilik testleri için kurallar oluşturan grupların bazıları ICH (The international Conference on Harmonization), GLP (Good Laboratory Practice), GMP (Good Manıfacturing Practice), FDA (Food and Drug administration) ve USP Farmakope XXIV'dir. Analitik yöntemin kabul edilebilirliğini göstermek için kullanılan analitik parametreler:

1. Saklanan örneklerin stabilitesi (Stability)
2. Özgünlük/Seçicilik ( Specificity,/Selectivity )
3. Doğruluk (Accuracy)
4. Kesinlik ( Precision )
5. Doğrusallık ( Linearity ) ve Çalışma aralığı (Range)
6. Duyarlılık Limiti ( Sensitivity Limit)
7. Sağlamlık /Dayanıklılık ( Robustness/Ruggedness)

### 2.7.2.1. Stabilite (Stability)

Bir analitik yöntem geliştirme çalışmasında, saklanan örnekler içerisinde analitin analiz boyunca bozunmadan sabit kaldığı süreyi belirlemek için stabilite testleri yapılmalıdır.Laboratuvar şartlarında, nem, ısı, ışık, hava gibi etkilere karşı analitin veya analit çözeltisinin stabilitesi, yayınlanmış literatürler ile veya labaratuvar testleri ile belirlenmelidir. FDA'a göre, bulunan değer gerçek değerden % ±10 sapmalıdır.

***Donma ve erime stabilitesi:*** Çalışılan analit stabilitesinin üç donma ve erime turlarından sonra belirlenmesidir. Analit ayarlanmış depolama sıcaklığında stabil değilse, stabilite örneği üç donma ve erime turu boyunca -70 derecede dondurulmalıdır.

***Kısa-dönem sıcaklık stabilitesi:*** Çalışılan analit stabilitesinin oda sıcaklığında 2 ile 24 saat arasında belirlenmesidir.

***Uzun dönem stabilitesi:*** Uzun dönem bir stabilite değerlendirmesinde depolama zamanı son örneğin analiz tarihi ile ilk örneğin toplanma tarihi arasındaki zamanı aşmayacak şekilde bu zaman diliminde çalışılan analit stabilitesinin belirlenmesidir.

***Stok çözeltinin stabilitesi:*** Çalışılan analitin ve iç standartın stok çözeltisinin stabilitesi en az 6 saatlik oda sıcaklığında stabil olduğunun değerlendirilmelidir. Ayrıca eğer stok çözeltiler uygun peryotlarda dondurulur ya da buzdolabinda tutulursa, stabilite belgelenmelidir.

***Hazırlama sonrası stabilite:*** Oto örnekleyici içindeki bekleme zamanını içeren işlenmiş orneklerin stabilitesinin belirlenmelidir.

### 2.7.2.2. Özgünlük (Belirleyicilik)/Seçicilik ( Specificity,/Selectivity )

FDA rehberine göre, özgünlük/seçicilik, örnek içinde bütün komponentlerin varlığında analitin cevabını doğru bir şekilde ölçmektir. ICH rehberine göre, özgünlük

tek bir analit için cevabı sağlayan yöntem için, seçicilik ise birden fazla analit için cevabı sağlayan yöntem için kullanılır.

**2.7.2.3. Doğruluk (Accuracy)**

Doğruluk, deneysel olarak belirlenmiş değerin, kabul edilebilir değere veya gerçek değere olan yakınlığıdır. Bağıl ya da mutlak hata ile verilir. Yöntemin doğruluğu;

1. Bilinen derişimlere sahip bir seri örneğin analizi ve sonucunun gerçek değerle karşılaştırılması ile gösterilebilir.
2. Sonuçların daha önce belirlenen doğru bir yöntemle alınmış sonuçlarla karşılaştırılması ile gösterilebilir.
3. Hedef derişim üzerinde üç düzeyde üç deney yapılarak katım yapılmış numune üzerinde çalışılarak gösterilebilir.

Geri kazanım ise, analiz sonucunda bulunan değerin gerçek değere oranı olarak ifade edilir.

**2.7.2.4. Kesinlik (Precision)**

Analitik bir işlemin kesinliği önceden belirlenmiş şartlar altında aynı homojen örnekten birçok örnekleme yapılarak elde edilen bir seri ölçüm sonuçlarının arasındaki uygunluğun yakınlığınıı ifade etmektedir. Kısaca bir analitik yöntemde sonuçların birbirine yakınlığın ölçüsüdür. Kesinlik üç basamak olarak düşünülmektedir.

***Tekrarlanabilirlik (Repeatability):*** Aynı çalışma şartlarında kısa bir zaman aralığında tekrarlanan analiz sonuçlarının birbirine yakınlığıdır. Güniçi kesinlik olarak da adlandırılır. % BSS (bağıl standart sapma) değeri ile verilir.

***Ara kesinlik (Intermediate precision):*** Aynı çalışma şartlarında laboratuvarlar arasındaki farkların (gün değişikliği, analizci değişikliği, cihaz değişikliği gibi) kesinlik değerlerinin göstergesidir. Günlerarası kesinlik, gün değişkenliği kullanılarak yapılan

ara kesinlik çalışmasıdır ve aynı çalışma şartlarında numunelerin farklı günler (en az üç gün) içerisinde tekrarlayan analiz (en az n=6) sonuçlarının birbirlerine olan yakınlık ölçüsü olarak tanımlanır. % BSS değeri ile verilir.

***Reproducibility (Yenilenebilirlik):*** Laboratuvarlar arasındaki kesinliği ifade eder (laboratuvarlar arasında yapılan işbirlikli çalışmalar, yöntem standardizasyonu gibi). % BSS değeri ile verilir.

**2.7.2.5. Doğrusallık ( Linearity ) ve Çalışma aralığı (Range)**

Analitik bir işlemin doğrusallığı örnek içerisindeki analitin derişimi ile doğrudan orantılı test sonuçlarının belli bir aralıkta elde edilebilmesi yeteneğidir. Beş veya daha fazla standardın her derişimdeki tekrarlanan analizleri ile belirlenir. Çalışma aralığı ise kabul edilebilir doğruluk, kesinlik ve doğrusallığın elde edildiği derişim aralığıdır. Bu derişim aralığında, çözeltinin derişimine karşı elde edilen cevapları grafiğe çizilir (kalibrasyon eğrisi). Kalibrasyon eğrisinin regresyon analizi yapılarak standart eğrinin doğru denklemi ve korelasyon katsayısı elde edilir. Kalibrasyon doğrusunun eğimi, doğrusallığın matematiksel bir ölçüsüdür.

**2.7.2.6. Duyarlılık Limiti ( Sensitivity Limit)**

Analitik yöntemin en düşük derişimdeki analitleri saptayabilmesinin bir ölçüsüdür.

***Gözlenebilme sınırı (LOD):*** Belirlenen deney şartlarında saptanabilen en düşük analit derişimidir. Genellikle kromatografik cevapta sinyal /gürültü (S/G) oranının 2/1 veya 3/1 olması kabul edilebilir

***Tayin alt sınırı (LOQ):*** Belirlenen deney şartlarında kabul edilebilr doğruluk ve kesinikte belirlenen örnek içerisindeki en düşük analit derişimidir. Genellikle kromatografik cevapta sinyal /gürültü (S/G) oranının 10/1 veya 8/1 olması kabul edilebilir.

### 2.7.2.7. Sağlamlık /Dayanıklılık ( Robustness/Ruggedness)

Bir analitik yöntemin sağlamlığı, yöntem parametrelerinde küçük ama önemli değişiklerde etkilenmeden kalma kapasitesinin bir ölçüsüdür ve yöntemin normal kullanımı sırasında güvenirliğin bir göstergesidir. Farklı deney sıcaklığı, pH ve kolon gibi değişiklerin sonuçlar üzerinde etki göstermeyen değişikliklerin aralığı belirlenerek açıklanır.

### 2.7.3. Özgünlük (Matriks Etkisi)

Çalışılan biyolojik örneklerde bulunan analiz edilmeyen analitler veya interferans maddelerin varlığından dolayı cevapta interferans veya direk veya indirek değişikliklerin belirlenmesidir. [192-194]

# 3. MATERYAL VE YÖNTEM

## 3.1. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

Kalibrasyon ve kalite kontrol örneklerini hazırlamak için kullanılan referans standartların kalitesi, çalışma verilerinin belirlenmesinde önemli bir yere sahiptir. Genellikle üç tip referans standart kullanılabilmektedir. Bunlar, onaylanmış referans standartlar (USP standartları gibi), güvenilir ticari bir kaynaktan elde edilen ticari bir şekilde sağlanmış referans standartlar (Merck, Sigma gibi) ve ticari olmayan kurum veya bir analitik laboratuvar tarafından belirlenmiş saflıkta sentezlenmiş referans standartlardır.

Çalışmamızda kullanılan standart maddeler; provitamin A (β-K), E vitamin (α-T), $K_3$ vitamini (MN) ve suda çözünen $K_3$ vitamini (MBS), $K_2$ vitamini (menakinon), A vitamini (retinol), trifenilfosfin, bütilleniş hidroksi toluen (BHT), diazepam ve sodyum karbonat Sigma'dan(USA) temin edildi. Milli-Q saflıkta su kullanılmış olup kimyasal çözücü olarak kullanılan; etanol, hekzan, diklormetan, kloroform ve HCl analitiksel saflıkta, metanol, asetonitril, bütanol ve etanol HPLC saflıkta olup Merck'ten (Almanya) temin edildi.

Biyolojik matriks olarak kullanılan sağlıklı insan plazması Atatürk Üniversitesi Yakutiye Araştırma Hastanesi Kan Bankasından, sağlıklı tavşanlar Atatürk Üniversitesi ATADEM'den, çalışma sırasında kullanılan otomatik pipetler (10-100 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL ve 1000-5000 µL), kuvartz küvet (USA) ve oto örnekleyici vial kitleri (Agilent, 1,8 mL screw cap) Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Laboratuvar'ından temin edildi.

### 3.2. Cihazlar

Çalışmalarda kulanılan cihazlar, yöntem geliştirme ve geçerlilik testlerinde istenilen performans kriterlerini sağlamalıdır. Kullanılan cihazlar istenilen özelliklere sahip olup aşağıda verilmiştir.

pH metre ( Schott ), santrifüj ( Hettich, RPM x 100), terazi (Bosch S 2000), karıştırıcı vorteks (IKA), su banyosu (GFL), etüv (Memmert), vakum pompası (Phenomenex), Spektrofotometre sistemi ((Spektrofotometre (Thermospectronic, HeλIOS β) ve bilgisayar (Vestel)) ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) Sistemi (Yüksek Performanslı Sıvı Komatografi (Termoquest), DAD (Diyod Array Dedektör) dedektör (Termoquest UV 6000 LP), Degazer (Thermoquest SCM 1000), Pompa (Thermoquest SCM 1000), Kolon ($C_8$, 5 μm, 150 x 4,0 mm)(USA), Otoörnekleyici (Thermoquest AS 3000) ve Bilgisayar (Vestel)/Software (Thermoquest)).

### 3.3. Yöntemler

#### 3.3.1. Spektrofotometre Yöntem Şartları

##### 3.3.1.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometre Şartları

β-K, α-T, MN ve MBS için UV-Görünür Bölge Spektrofotometrenin yöntem şartları Tablo 3.1'de verildi.

Tablo 3.1: UV-Görünür Bölge Spektrofotometre şartları

| Yöntem Şartları | β-K | α-T | MN | MBS |
|---|---|---|---|---|
| Data modu | Absorbans | Absorbans | Absorbans | Absorbans |
| Start Lamba (nm) | 330 | 240 | 290 | 200 |
| Stop Lamba (nm) | 600 | 340 | 390 | 260 |
| Lamba Değişimi (nm) | 325 | --- | 325 | --- |
| Tarama Hızı | 600 nm/dak. | 600 nm/dak. | 600 nm/dak. | 600 nm/dak. |
| Bant Genişliği | 2 nm | 2 nm | 2 nm | 2 nm |
| Düzgünlük | Yüksek | Yüksek | Yüksek | Orta |

### 3.3.1.2. Türev Spektrofotometri Yöntem Şartları

β-K, α-T, MN, MBS için 1. Türev (1D-) ve 2. Türev (2D-) Spektrofotometri yöntem şartları da sırasıyla Tablo 3.2, 3.3 ve 3.4'de verildi.

Tablo 3.2: β-K'nın 1D- ve 2D- Spektrofotometre şartları

| Yöntem Şartları | β-K | |
|---|---|---|
| Data modu | 1.Türev (1D-) | 2.Türev (2D-) |
| Start Lamba (nm) | 330 | 330 |
| Stop Lamba (nm) | 600 | 600 |
| Lamba Değişimi (nm) | 325 | 325 |
| Tarama Hızı | 600 nm/dak. | 600 nm/dak. |
| Bant Genişliği | 2 nm | 2 nm |
| Dalga Boyu Aralığı (Δλ) | 21,0 | 21,0 |
| Düzgünlük | Yüksek | Yüksek |

Tablo 3.3: α-T'nin 1D- ve 2D- Spektrofotometre şartları

| Yöntem Şartları | α-T | |
|---|---|---|
| Data modu | 1.Türev (1D-) | 2.Türev (1D-) |
| Start Lamba (nm) | 240 | 240 |
| Stop Lamba (nm) | 340 | 340 |
| Lamba Değişimi (nm) | 325 | 325 |
| Tarama Hızı | 600 nm/dak. | 600 nm/dak. |
| Bant Genişliği | 2 nm | 2 nm |
| Dalga Boyu Aralığı (Δλ) | 21,0 | 21,0 |
| Düzgünlük | Yüksek | Yüksek |

Tablo 3.4: MN ve MBS'nin 1D- ve 2D- Spektrofotometre şartları

| Yöntem Şartları | MN | | MBS | |
|---|---|---|---|---|
| Data modu | 1.Türev(1D-) | 2.Türev(2D-) | 1.Türev (1D-) | 2.Türev(2D-) |
| Start Lamba (nm) | 290 | 290 | 200 | 200 |
| Stop Lamba (nm) | 390 | 390 | 260 | 260 |
| Lamba Değişimi (nm) | 325 | 325 | --- | --- |
| Tarama Hızı | 600 nm/dak. | 600 nm/dak. | 600 nm/dak. | 600 nm/dak. |
| Bant Genişliği | 2 nm | 2 nm | 2 nm | 2 nm |
| Dalga Boyu Aralığı (Δλ) | 21,0 | 21,0 | 21,0 | 21,0 |
| Düzgünlük | Yüksek | Yüksek | Orta | Orta |

### 3.3.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yöntem Şartları

HPLC-DAD çalışmasında, β-K, retinol, α-T, MN ve MBS için uygulanan kromatografik yöntem şartları sırasıyla Tablo 3.5, 3.6, 3.7 ve 3.8'de verildi.

Tablo 3.5: β-K ve retinol için HPLC-DAD yöntem şartları

| Yöntem Şartları | β-K | | Retinol |
|---|---|---|---|
| | Standart | Plazma | Standart/Plazma |
| Kolon | $C_8$ (150x4,6 mm,5µm ) | $C_8$ (150x4,6 mm,5µm ) | $C_8$ (150x4,6 mm,5µm ) |
| Dedektör | DAD | DAD | DAD |
| Dalga Boyu | 452 nm, 260 nm | 452 nm, 245 nm | 325 nm |
| Hareketli Faz | Metanol/Asetonitril (95/5) | Metanol/Asetonitril (95/5) | Bütanol:Metanol:Su (0-1,5dak., 0:10:90, 1,5-5 dak. 5:92:3, 5-11 dak. 5:92:3) |
| Kolon Sıcaklığı | 29ºC | 29ºC | 29ºC |
| Kolon Akış Hızı | 1mL/dak. | 1mL/dak. | 1mL/dak. |
| Enjeksiyon Hacmi | 10 µL | 10 µL | 20 µL |
| İç Standart | Trifenil fosfin | $K_2$ vitamini | $K_2$ vitamini |

Tablo 3.6: α-T için HPLC-DAD yöntem şartları

| Yöntem Şartları | Standart ve Plazma |
|---|---|
| Kolon | $C_8$ (150x4,6 mm,5µm ) |
| Dedektör | DAD |
| Dalga Boyu | 292 nm |
| Hareketli Faz | Metanol:Asetonitril:Su (84,5:10:5,5) |
| Kolon Sıcaklığı | 25ºC |
| Kolon Akış Hızı | 1mL/dak. |
| Enjeksiyon Hacmi | 20 µL |
| İç Standart | $K_2$ vitamini |

Tablo 3.7: MN için HPLC-DAD yöntem şartları

| Yöntem Şartları | Standart ve Plazma |
|---|---|
| Kolon | $C_8$ (150x4,6 mm,5µm ) |
| Dedektör | DAD |
| Dalga Boyu | 330 nm |
| Hareketli Faz | Metanol:Su (0-4 dak., 90:10, 4-4,5 dak. 100:0, 4,5-12 dak., 100:0) |
| Kolon Sıcaklığı | 30ºC |
| Kolon Akış Hızı | 1mL/dak. |
| Enjeksiyon Hacmi | 20 µL |
| İç Standart | $K_2$ vitamini |

Tablo 3.8: MBS için HPLC-DAD yöntem şartları

| Yöntem Şartları | Standart | Plazma(MN'a dönüştürülerek) |
|---|---|---|
| Kolon | $C_8$ (150x4,6 mm,5µm ) | $C_8$ (150x4,6 mm,5µm ) |
| Dedektör | DAD | DAD |
| Dalga Boyu | 230 nm | 230 nm |
| Hareketli Faz | Metanol:Su (60:40) | Metanol:Su (0-4 dak., 90:10, 4-4,5 dak. 100:0, 4,5-12 dak., 100:0) |
| Kolon Sıcaklığı | 30ºC | 30ºC |
| Kolon Akış Hızı | 1mL/dak. | 1mL/dak. |
| Enjeksiyon Hacmi | 20 µL | 20 µL |
| İç Standart | Diazepam | $K_2$ vitamini |

### 3.4. Ekstraksiyon Prosesleri

β-K, retinol[11], α-T[5], MN ve MBS vitaminleri oksijen sıcaklık ve ışıktan etkilendiği için çalışmalar etrafı alimunyum folyo ile sarılı karanlık ortamlarda gerçekleştirildi.

#### 3.4.1. β-Karoten ve Retinolün Ekstraksiyon Prosesi

##### 3.4.1.1. β-K'nın Spektrofotometrik Ölçümleri için Ekstraksiyon Prosesi

Alimunyum folyo ile sarılı bir deney tüpüne 0,3 mL plazma örneği koyuldu. Plazma üzerine uygun derişimlerde β-K çözeltisi eklendi ve karıştırıldı. Bu karışım üzerine 1 mL etanol eklenip 10 sn vortekslendi. Daha sonra 5 mL hekzan ve 1 mL kloroform ilave edildi. Ağzı kapatılarak 1 dak. vortekslendi. 4500 rpm de 10 dak.

santrifüj edildi. Üst süpernatant kısmı alındı ve oda sıcaklığında azot gazı altında buharlaştırıldı ve kalıntı 4 mL etanol ve kloroform (24/1, h/h) karışımında çözüldü. β-K katımı yapılmamış plazma örneğinin ekstraksiyonu ile elde edilen köre karşı UV-Görünür Bölge, 1D- ve 2D- spektrumlarını elde etmek için ölçümler yapıldı.

#### 3.4.1.2. β-K ve Retinolün Kromatografik Ölçümleri için Ekstraksiyon Prosesi

Alimunyum folyo ile sarılı bir deney tüpüne 0,3 mL plazma örneği koyuldu. Plazma üzerine uygun derişimlerde β-K veya retinol çözeltisi ve iç standart olarak kullanılan $K_2$ vitamini (etanolde 20 μg/mL) çözeltisinden 0,1 mL eklendi ve 10 sn vortekslendi. Plazma üzerine 1 mL etanol eklendi ve tekrar 10 sn vortekslendi. Daha sonra 5 mL hekzan ve 30 μg/mL BHT içeren kloroform çözeltisinden 1 mL ilave edildi. Ağzı kapatılarak 1 dak. vortekslendi. 4500 rpm de 10 dak. santrifüj edildi. Üst süpernatant kısmı alındı ve oda sıcaklığında azot gazı altında kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Kalıntı 0,5 mL etanol ve 30 μg/mL BHT içeren kloroform (24/1, h/h) çözücü karışımında çözüldü. 45 μm gözenek büyüklüğüne sahip filtreden süzülerek viallere koyuldu. HPLC-DAD sistemine, β-K analizinde 10 μL ve retinolün analizinde de 20 μL enjeksiyon yapıldı.

### 3.4.2. α-Tokoferolün (α-T) Ekstraksiyon Prosesi

#### 3.4.2.1. α-T'nin Spektrofotometrik Ölçümleri için Ekstraksiyon Prosesi

Alimunyum folyo ile sarılı bir deney tüpüne 0,3 mL plazma örneği koyuldu. Uygun derişimlerde α-T çözeltisi eklendi ve karıştırıldı. Daha sonra 1 mL etanol eklendi ve 10 sn vortekslendi. Bu çözelti üzerine 6 mL hekzan-diklormetan (9/1, h/h) çözücü karışımı ilave edilip ağzı kapatılarak 1 dak. vortekslendi. 6000 rpm de 7 dak. santrifüj edildi. Üst süpernatant kısmı alındı ve oda sıcaklığında azot gazı altında kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Kalıntı 4 mL etanolde çözüldü. α-T katımı yapılmamış plazma örneğinin

ekstraksiyonu ile elde edilen kör numuneye karşı UV Görünür Bölge, 1D- ve 2D-spektrumlarını elde etmek için ölçümler yapıldı.

**3.4.2.2. α-T'nin Kromatografik Ölçümleri için Ekstraksiyon Prosesi**

Alimunyum folyo ile sarılı bir deney tüpüne 0,3 mL plazma örneği alındı. Uygun derişimlerde α-T çözeltisi ve iç standart olarak kullanılan $K_2$ vitamin çözeltisinden (50 μg/mL) 0,1 mL eklendi. 10 sn vortekslendi ve 1 mL etanol eklendi. 10 sn vortekslendi. Daha sonra 6 mL hekzan-diklormetan (9/1, h/h) çözücü karışımı ilave edildi. Ağzı kapatılarak 1 dak. vortekslendi. 6000 rpm de 7 dak. santrifüj edildi. Üst süpernatant kısmı alındı ve oda sıcaklığında azot gazı altında kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Kalıntı 0,5 mL etanol çözeltisinde çözüldü. 45 μm gözenek büyüklüğüne sahip filtreden süzülerek viallere koyuldu. HPLC-DAD sistemine 20 μL enjekte edildi.

**3.4.3. Menadionun Ekstraksiyon Prosesi**

**3.4.3.1. MN'nin Spektrofotometrik Ölçümleri için Ekstraksiyon Prosesi**

Alimunyum folyo ile sarılı bir deney tüpüne 0,2 mL plazma örneği koyuldu. Uygun derişimlerde MN çözeltisi eklendi. 0,1 mL 0,03 M HCl çözeltisi eklendi ve 10 sn vortekslendi. Daha sonra 0,5 mL %10,6 $Na_2CO_3$ (a/h) (pH:11,30) çözeltisinden ilave edilip tekrar 10 sn vortekslendi. Elde edilen çözeltiye 4 mL hekzan eklendi ve ağzı kapatılarak 5 dak. vortekslendi. 6000 rpm de 30 dak. santrifüj edildi. Üst süpernatant kısmı alındı. 45 μm gözenek büyüklüğüne sahip filtreden süzüldü. MN'nin katımı yapılmamış plazma örneğinin ekstraksiyonu ile elde edilen kör numuneye karşı UV-Görünür Bölge, 1D- ve 2D- spektrumlarını elde etmek için ölçümler yapıldı.

**3.4.3.2. MN'nin Kromatografik Ölçümleri için Ekstraksiyon Prosesi**

Alimunyum folyo ile sarılı deney tüpüne 0,2 mL plazma örneği koyuldu. Uygun derişimlerde MN çözeltisi ve iç standart olarak kullanılan $K_2$ vitamin çözeltisinden (50

μg/mL) 0,1 mL eklendi ve karıştırıldı. Bu çözeltiye 0,1 mL 0,03 M HCl çözeltisi eklendi ve 10 sn vortekslendi. Daha sonra 0,5 mL %10,6 $Na_2CO_3$ (a/h) (pH:11,30) çözeltisinden eklenip tekrar 10 sn vortekslendi. Elde edilen çözeltiye 2 mL hekzan eklendi. Ağzı kapatılarak 5 dak. vortekslendi. 6000 rpm de 30 dak. santrifüj edildi. Üst süpernatant alındı. 45 μm gözenek büyüklüğüne sahip filtreden süzüldü. HPLC-DAD sistemine 20 μL enjekte edildi.

### 3.4.4. Menadion Sodyum Bisülfitin Ekstraksiyon Prosesi

#### 3.4.4.1. MBS'nin Spektrofotometrik Ölçümleri için Ekstraksiyon Prosesi

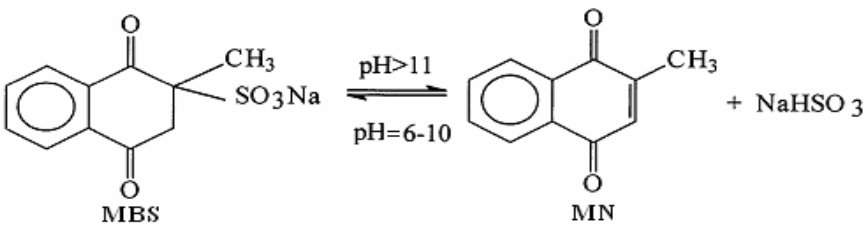
Literatür taramasında MBS'nin direk ekstraksiyonuna ait herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Yapılan çalışmada MBS'nin plazmadan ekstraksiyonunun MN'ye dönüştürülerek yapılabileceği belirlendi. Alimunyum folyo ile sarılı bir deney tüpüne 0,2 mL plazma örneği koyuldu. Uygun derişimlerde MBS çözeltisi eklendi ve karıştırıldı. Çözeltiye 0,1 mL 0,03 M HCl çözeltisi eklenip 10 sn vortekslendi. Daha sonra 0,5 mL %10,6 $Na_2CO_3$ (a/h) (pH:11,30) çözeltisinden ilave edilerek MN'ye dönüşüm sağlandı. 10 sn daha vortekslendi. Elde edilen bu çözeltiye 4 mL hekzan eklenip ağzı kapatılarak 5 dak. daha vortekslendi. 6000 rpm de 30 dak. santrifüj edildi. Üst süpernatant alındı. 45 μm gözenek büyüklüğüne sahip filtreden süzüldü. MBS katımı yapılmamış plazma örneğinin ekstraksiyonu ile elde edilen kör numuneye karşı UV Görünür Bölge, 1D- ve 2D- spektrumlarını elde etmek için için ölçümler yapıldı.

#### 3.4.4.2. MBS'nin Kromatografi Ölçümleri için Ekstraksiyon Prosesi

Alimunyum folyo ile sarılı deney tüpüne 0,2 mL plazma örneği koyuldu. Uygun derişimlerde MBS çözeltisi ve iç standart olarak kullanılan $K_2$ vitamin çözeltisinden (50 μg/mL) 0,1 mL ve 0,1 mL 0,03 M HCl çözeltisi eklendi ve 10 sn vortekslendi. Daha sonra 0,5 mL %10,6 $Na_2CO_3$ (a/h) (pH:11,30) çözeltisinden ilave edilerek MN'ye

dönüşümü sağlanarak 10 sn vortekslendi. Elde edilen bu çözeltiye 2 mL hekzan eklendi ve ağzı kapatılarak 5 dak. vortekslendi. 6000 rpm de 30 dak. santrifüj edildi. Üst süpernatant alındı. 45 µm gözenek büyüklüğüne sahip filtreden süzüldü. HPLC-DAD sistemine 20 µL enjekte edildi.

### 3.4.5. MBS'nin MN'ye Dönüştürülmesi




Şekil 3.1: MBS'nin MN'ye dönüşüm reaksiyonu[121]

Şekil 3.1'de gösterilen reaksiyonda görüldüğü gibi pH>11'de MBS, MN'ye dönüşmektedir[121] (10 mg MBS, 6,1 mg MN'a eşdeğerdir). Bu reaksiyondan hareketle 0,2 mL 0,01 M HCl çözeltisine, 0,01 M HCl çözeltisinde hazırlanan MBS çözeltisi (kalibrasyon eğrisinde kullanılan tüm derişimler için) eklendi ve 10 sn vortekslendi. Daha sonra MBS'nin MN'ye dönüşümünü sağlamak için 0,5 mL % 10,6 $Na_2CO_3$ (a/h) (pH:11,30) çözeltisi ilave edildi. Kromatografik çalışmalarda iç standart da eklendi. Çözelti karışımları 10 sn vortekslendi. Bu çözelti karışımına spektrofotometrik analizler için 4 mL, kromatografik analizler için 2 mL hekzan eklendi. Ağzı kapatılarak 5 dak. vortekslendi ve 6000 rpm de 30 dak. santrifüj edildi. Üst süpernatant alınıp 45 µm gözenek büyüklüğüne sahip filtreden süzüldü. Daha sonra MN'ye göre geliştirilen spektroskopik ve kromatografik yöntemlerle analizleri gerçekleştirildi.

MBS'nin MN'ye dönüşüm yüzdesini hesaplamak için aynı şekilde, 0,2 mL 0,01 M HCl çözeltisine MN'un hekzan ile hazırlanan çözeltileri (MBS'nin MN'ye dönüşümü ile elde edilebilecek kalibrasyon eğrisinde kullanılan tüm derişimler için) hazırlanarak eklendi ve 10 sn vortekslendi. Daha sonra aynı şartları sağlayabilmek için sırasıyla 0,1 mL 0,03 M HCl ve 0,5 mL % 10,6 $Na_2CO_3$ (a/h) (pH:11,30) çözeltisi ilave edilip 10 sn vortekslendi. Elde edilen çözeltiye spektrofotometrik analizler için 4 mL, kromatografik analizler için 2 mL hekzan eklendi ve ağzı kapatılarak 5 dak. vortekslendi. 6000 rpm'de 30 dak. santrifüj edildi. Üst süpernatant alınarak 45 μm gözenek büyüklüğüne sahip filtreden süzüldü. Daha sonra MN'ye göre geliştirilen spektrofotometrik ve kromatografik yöntemlerle analizleri gerçekleştirildi ve MBS'nin MN'ye dönüşüm yüzdesi belirlendi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Stabilite (Kararlılık)

Stabilite çalışması, β-K, retinol, α-T, MN ve MBS'nin standart çözeltilerinin ve plazma içerisindeki çözeltilerinin analiz boyunca hangi ortamlarda ne kadar süre ile bozunmadan stabil kaldığını belirlemek amacıyla yapıldı.

Çalışılan analitlerin stabilitesi, çalışılan labaratuvar şartlarında, deney sırasında güneş ışığından korunduğu koyu renkli veya alimünyum folyo ile sarılı malzemeler kullanılarak, kalite kontrol örnekleri ile belirlendi. FDA rehberinde belirtilen stabilite kuralına göre analitlerin stabilite şartları belirlendi ve analiz sonuçları değerlendiridi.

#### 4.1.1. β-K, Retinol, α-T, MN ve MBS'nin Standart Çözeltilerinin Stabilitesi

BHT içeren β-K ve retinolün (0,75, 4,0 ve 8,0 μg/mL), α-T'nin (0,75, 5,0 ve 15,0 μg/mL), MN ve MBS'nin (0,75, 5,0 ve 10,0 μg/mL) düşük, orta ve yüksek derişimlerde hazırlanan kalite kontrol çözeltileri oda sıcaklığında 6, 24, 48 ve 60 saat, 4°C

(buzdolabı) ve -20°C'de (derin dondurucu) 24, 48 ve 60 saat bekletildikten sonra HPLC-DAD yöntemi ile analizleri yapıldı. Bulunan değerler, yeni hazırlanıp analiz edilen standart çözeltilerin analiz sonuçları ile kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.1'de verildi.

### 4.1.2. β-K, Retinol, α-T, MN ve MBS'nin Plazma Çözeltilerinin Stabilitesi

#### 4.1.2.1. Donma ve Erime Stabilitesi

β-K ve retinolün (0,75, 4,0 ve 8,0 μg/mL), α-T'nin (0,75, 5,0 ve 15,0 μg/mL), MN ve MBS'nin (0,305, 1,525 ve 6,100 μg/mL) düşük, orta ve yüksek derişimlerde hazırlanan kalite kontrol çözeltileri boş plazmaya eklenip -70°C depolama sıcaklığında 24 saat bekletildi ve oda sıcaklığında yardımsız eritildi. Donma erime turları 3 kez tekrarlandı ve her donma erime turundan sonra analizleri yapıldı. Bulunan değerler, yeni hazırlanıp analiz edilen standart çözeltilerinin analiz sonuçları ile kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.2'de verildi.

#### 4.1.2.2. Uzun Dönem Stabilitesi

β-K ve retinolün (0,75, 4,0 ve 8,0 μg/mL), α-T'nin (0,75, 5,0 ve 15,0 μg/mL), MN ve MBS'nin (0,305, 1,525 ve 6,100 μg/mL) yüksek, orta ve düşük derişimlerdeki kalite kontrol çözeltileri boş plazmaya eklenip -20$^{o}$C ve -70°C'de 24, 48 ve 60 saat bırakıldıktan sonra analizleri yapıldı. Bulunan değerler, yeni hazırlanıp analiz edilen standart çözeltilerinin analiz sonuçları ile kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.2'de verildi.

#### 4.1.2.3. Kısa Dönem Stabilitesi

β-K ve retinolün (0,75, 4,0 ve 8,0 μg/mL), α-T'nin (0,75, 5,0 ve 15,0 μg/mL), MN ve MBS'nin (0,305, 1,525 ve 6,100 μg/mL) yüksek, orta ve düşük derişimlerindeki kalite kontrol çözeltileri boş plazmaya eklenip oda sıcaklığında 6, 24 ve 48 saat

bırakıldıktan sonra analizleri yapıldı. Bulunan değerler, yeni hazırlanıp analiz edilen standart çözeltilerinin analiz sonuçları kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.3'de verildi.

#### 4.1.2.4. Hazırlama Sonrası Stabilite

BHT içeren β-K ve retinolün (0,75, 4,0 ve 8,0 μg/mL), α-T'nin (0,75, 5,0 ve 15,0 μg/mL), MN ve MBS'nin (0,305, 1,525 ve 6,100 μg/mL) yüksek, orta ve düşük derişimlerindeki kalite kontrol çözeltileri boş plazmaya eklenip ekstraksiyonları gerçekleştirildikten sonra numune çözeltileri viallere konularak oto örnekleyici üzerinde 6 ve 24 saat bekletildikten sonra analizleri yapıldı. Bulunan değerler, yeni hazırlanıp analiz edilen standart çözeltilerinin analiz sonuçları ile kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.3'de verildi.

Tablo 4.1: β-K, retinol, α-T, MN ve MBS standart kalite kontrol çözeltilerin stabilitesi

| Etkin Madde | Eklenen (µg/mL) | Stabilite (Oda Sıcaklığı), (%GK±SS) | | | | Stabilite (4°C) (%GK±SS) | | | Stabilite (-20°C) (%GK±SS) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 6 saat | 24 saat | 48 saat | 60 saat | 24 saat | 48 saat | 60 saat | 24 saat | 48 saat | 60 saat |
| β-K | 0,750 | 97,46±0,750 | 96,20±2,390 | 90,83±1,755 | 79,99±0,598 | 94,22±2,387 | 96,26±2,234 | 79,49±2,609 | 98,13±1,792 | 96,42±0,981 | 93,94±0,907 |
| | 4,000 | 98,66±1,439 | 94,17±1,063 | 97,30±6,445 | 90,45±1,072 | 94,32±0,553 | 102,5±2,741 | 91,34±1,697 | 98,25±0,815 | 106,0±2,085 | 94,90±2,040 |
| | 8,000 | 95,61±2,630 | 94,05±2,535 | 96,17±1,421 | 76,85±2,897 | 97,68±0,623 | 103,5±2,886 | 91,92±3,046 | 98,19±1,482 | 99,59±1,759 | 99,73±0,344 |
| Retinol | 0,750 | 100,0±3,469 | 95,65±2,042 | 98,58±1,864 | 102,0±3,681 | 97,22±2,994 | 98,05±2,252 | 93,54±2,714 | 102,4±1,657 | 97,83±2,885 | 97,31±0,684 |
| | 4,000 | 99,16±1,690 | 98,74±1,434 | 102,7±2,246 | 97,59±1,258 | 102,3±1,813 | 103,9±0,534 | 93,17±1,252 | 102,5±2,350 | 103,4±1,410 | 99,57±0,239 |
| | 8,000 | 101,4±1,409 | 103,2±2,785 | 101,4±0,297 | 104,2±2,822 | 98,60±1,046 | 106,5±2,516 | 98,54±1,153 | 103,9±1,263 | 107,2±1,932 | 104,9±0,667 |
| α-T | 0,750 | 98,29±1,449 | 97,10±1,572 | 97,35±5,653 | 96,10±1,972 | 102,2±1,627 | 95,55±4,526 | 93,41±1,797 | 100,7±0,562 | 99,45±1,161 | 98,21±0,386 |
| | 5,000 | 103,8±2,143 | 105,8±0,814 | 100,2±1,430 | 97,53±2,371 | 103,4±2,139 | 101,5±0,512 | 100,7±0,594 | 100,5±1,125 | 102,0±1,791 | 101,4±1,278 |
| | 15,00 | 101,1±0,574 | 104,4±3,858 | 96,04±0,781 | 92,26±0,868 | 101,8±0,430 | 98,55±0,889 | 97,15±0,878 | 95,73±3,595 | 92,41±2,138 | 94,05±2,895 |
| MN | 0,750 | 97,46±1,611 | 96,35±1,409 | (-) | (-) | 102,3±3,125 | 104,5±4,322 | 113,3±0,930 | 98,67±0,971 | 106,9±1,486 | 101,7±1,456 |
| | 5,000 | 99,50±4,511 | 98,90±1,729 | (-) | (-) | 101,9±3,032 | 102,4±1,032 | 94,49±2,990 | 100,9±3,325 | 108,2±3,974 | 100,3±4,414 |
| | 10,00 | 99,62±3,312 | 106,9±2,238 | (-) | (-) | 101,8±1,628 | 104,3±3,814 | 97,40±2,060 | 99,57±3,672 | 99,85±0,413 | 97,47±0,349 |
| MBS | 0,750 | 95,35±0,792 | 97,50±2,703 | (-) | (-) | 95,59±4,183 | 88,90±1,549 | 81,34±3,287 | 97,52±3,531 | 95,60±2,432 | 94,04±1,185 |
| | 5,000 | 98,15±3,432 | 101,2±2,381 | (-) | (-) | 97,49±3,899 | 83,03±3,858 | 79,62±1,764 | 99,26±3,286 | 96,17±3,400 | 95,66±1,588 |
| | 10,00 | 92,67±1,138 | 94,58±3,391 | (-) | (-) | 97,03±0,715 | 87,12±3,098 | 81,50±1,907 | 95,61±2,730 | 95,70±2,894 | 95,09±2,974 |

SS: standart sapma (n=3), %GK: yüzde geri kazanım, (-): pik gözlenmedi.

Tablo 4.2: β-K, retinol, α-T, MN ve MBS plazma kalite kontrol çözeltilerin uzun dönem stabilitesi ve donma erime stabilitesi

| Etkin Madde | Eklenen (µg/mL) | Stabilite (-20°C), (%GK±SS) | | | Stabilite (-70°C), (%GK±SS) | | | Stabilite (-70°C), (%GK±SS)(Donma-Erime) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 24 saat | 48 saat | 60 saat | 24 saat | 48 saat | 60 saat | 24 saat | 48 saat | 60 saat |
| β-K | Kör | 101,7±4,787 | 94,89±2,292 | 55,63±3,170 | 101,5±1,414 | 102,5±2,104 | 103,8±3,116 | 100,5±2,746 | 104,9±0,773 | 97.36±1,909 |
| | 0,750 | 94,48±2,957 | 108,6±8,922 | 53,48±1,070 | 103,7±2,936 | 93,93±3,586 | 97,14±4,923 | 102,5±92,88 | 92,88±1,781 | 96,09±5,011 |
| | 4,000 | 94,32±2,537 | 96,09±3,474 | 75,05±2,798 | 94,75±3,066 | 99,36±4,497 | 96,66±2,927 | 91,16±0,589 | 102,6±2,155 | 96,77±5,796 |
| | 8,000 | 97,14±4,026 | 99,94±1,457 | 85,47±1,327 | 100,3±2,890 | 97,97±3,941 | 95,33±5,941 | 100,1±3,253 | 98,30±4,438 | 93,77±4,504 |
| Retinol | Kör | 103,6±3,236 | 105,2±1,694 | 90,18±0,745 | 101,0±4,523 | 96,24±3,915 | 96,55±2,786 | 99,52±2,039 | 92,88±1,509 | 99,49±2,847 |
| | 0,750 | 104,9±2,035 | 107,8±3,225 | 107,4±1,678 | 102,2±1,305 | 103,3±2,552 | 102,7±1,564 | 104,5±1,610 | 104,7±1,936 | 106,8±0,370 |
| | 4,000 | 107,4±3,706 | 106,3±4,986 | 106,1±4,285 | 98,20±1,321 | 101,0±1,338 | 102,9±4,931 | 96,44±3,345 | 105,1±2,922 | 104,3±0,930 |
| | 8,000 | 96,21±4,048 | 92,93±1,450 | 94,32±3,647 | 96,62±0,577 | 95,96±2,028 | 94,97±3,899 | 94,46±2,240 | 92,90±2,111 | 94,30±0,992 |
| α-T | Kör | 103,2±2,107 | 99,30±1,212 | 95,63±1,858 | 103,4±1,341 | 100,7±1,686 | 98,27±2,887 | 102,5±2,655 | 100,7±1,686 | 98,33±3,647 |
| | 0,750 | 100,6±2,834 | 95,65±1,738 | 94,46±2,222 | 102,3±6,592 | 100,0±3,933 | 97,43±1,380 | 97,62±4,604 | 96,42±4,994 | 94,80±2,681 |
| | 5,000 | 103,2±2,660 | 103,1±2,460 | 94,74±1,297 | 100,1±0,743 | 102,6±3,041 | 100,6±4,048 | 98,96±2,133 | 98,61±2,917 | 96,56±1,237 |
| | 15,00 | 104,3±3,625 | 92,26±2,156 | 86,48±1,988 | 102,0±2,022 | 97,54±1,700 | 99,03±4,610 | 99,84±2,520 | 96,39±3,752 | 95,83±2,534 |
| MN | Kör | 95,74±1,993 | 97,54±2,742 | 94,09±2,552 | 93,89±1,798 | 96,22±4,866 | 95,65±1,311 | 95,36±1,168 | 94,44±2,134 | 97,31±1,627 |
| | 0,305 | 102,3±1,182 | 105,8±4,807 | 98,54±5,613 | 107,4±2,605 | 104,1±6,908 | 100,3±2,017 | 105,9±4,455 | 106,4±4,329 | 98,71±2,762 |
| | 1,525 | 107,7±2,330 | 109,6±6,812 | 108,8±1,692 | 100,5±1,744 | 103,1±4,905 | 106,7±2,610 | 103,4±0,907 | 107,0±1,138 | 106,8±4,915 |
| | 6,100 | 107,8±1,929 | 100,7±3,675 | 104,7±1,401 | 105,1±3,458 | 103,6±3,453 | 98,79±2,695 | 93,94±2,301 | 107,2±1,544 | 104,8±1,396 |
| MBS | Kör | 98,68±2,742 | 95,97±3,335 | 91,41±1,109 | 99,25±1,400 | 102,8±0,908 | 95,69±1,116 | 98,11±4,939 | 102,4±1,977 | 94,94±1,875 |
| | 0,305 | 94,28±1967 | 94,74±1,670 | 91,35±1,828 | 95,85±2,581 | 97,00±3,256 | 100,6±2,233 | 95,13±2,693 | 96,08±3,449 | 100,5±3,098 |
| | 1,525 | 105,5±1,691 | 93,67±1,514 | 103,3±3,731 | 104,7±2,776 | 93,75±2,041 | 97,25±3,229 | 106,4±0,432 | 94,83±1,589 | 98,50±1,253 |
| | 6,100 | 102,5±3,343 | 95,70±3,318 | 102,4±2,928 | 101,7±1,821 | 95,08±2,411 | 94,52±2,349 | 102,0±3,736 | 94,06±3,188 | 93,77±3,207 |

SS: standart sapma (n=3), %GK: yüzde geri kazanım, (-): pik gözlenmedi.

Tablo 4.3: β-K, retinol, α-T, MN ve MBS plazma kalite kontrol çözeltilerin kısa dönem stabilitesi ve hazırlama sonrası (oto örnekleyici üzerinde) stabilitesi

| Etkin Madde | Eklenen (μg/mL) | Kısa Dönem Stabilitesi 20°C(Oda Sıcaklığı), (%GK±SS) | | | Hazırlama Sonrası Stabilite 20°C(Oda Sıcaklığı), (%GK±SS) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 6 saat | 24 saat | 48 saat | 6 saat | 24 saat |
| β-K | Kör | 97,70±3,117 | 96,90±0,622 | 66,86±4,032 | 98,03±1,035 | 92,51±4,057 |
| | 0,750 | 100,6±1,908 | 98,91±1,435 | 117,7±3,464 | 99,96±2,627 | 107,0±3,203 |
| | 4,000 | 96,76±3,610 | 94,12±3,297 | 94,58±3,232 | 95,13±1,778 | 108,6±2,107 |
| | 8,000 | 95,03±1,468 | 91,02±5,472 | 64,84±2,587 | 94,37±2,365 | 104,9±2,173 |
| Retinol | Kör | 105,8±3,050 | 106,7±1,318 | (-) | 101,1±1,918 | 105,9±0,715 |
| | 0,750 | 98,41±0,869 | 105,5±3,029 | (-) | 102,3±1,076 | 100,7±5,452 |
| | 4,000 | 91,57±1,551 | 99,49±4,893 | (-) | 107,1±0,683 | 93,26±3,972 |
| | 8,000 | 104,3±1,291 | 110,2±1,994 | (-) | 102,9±1,742 | 99,60±3,929 |
| α-T | Kör | 92,29±4,087 | 123,8±5,788 | 87,44±0,923 | 104,4±1,414 | 98,26±2,851 |
| | 0,750 | 91,64±3,723 | 89,87±0,625 | 76,78±4,114 | 99,56±1,646 | 98,83±4,608 |
| | 5,000 | 95,24±1,098 | 114,2±3,500 | 110,8±4,205 | 103,0±2,948 | 101,1±1,398 |
| | 15,00 | 96,88±3,547 | 68,98±3,406 | 31,63±2,505 | 100,0±1,127 | 99,95±2,353 |
| MN | Kör | 99,76±0,962 | 103,6±1,702 | 75,91±4,881 | 100,1±5,723 | 93,07±1,486 |
| | 0,305 | 103,2±3,189 | 104,5±3,486 | 97,16±3,846 | 97,50±2,994 | 106,0±3,024 |
| | 1,525 | 106,2±1,172 | 93,06±2,803 | 61,31±1,304 | 96,87±2,531 | 109,0±1,646 |
| | 6,100 | 96,86±1,837 | 38,51±0,739 | 18,15±0,381 | 95,72±4,671 | 104,1±1,877 |
| MBS | Kör | 98,33±2,446 | 52,02±2,566 | (-) | 96,68±7,554 | 99,29±4,048 |
| | 0,305 | 106,6±1,214 | 42,52±3,695 | (-) | 92,18±1,802 | 92,88±0,489 |
| | 1,525 | 98,95±1,379 | 33,42±2,198 | (-) | 97,03±3,861 | 106,0±3,028 |
| | 6,100 | 97,26±5,253 | 35,93±2,179 | (-) | 93,47±3,996 | 98,30±3,994 |

SS: standart sapma (n=3), %GK: yüzde geri kazanım, (-): pik gözlenmedi.

## 4.2. UV-Görünür Bölge, Birinci- ve İkinci-Türev Spektrofotometri Yöntemi

### 4.2.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

β-K, 200 μg/mL derişimde hekzanda hazırlanan stok çözelti etanol ile seyreltilerek 0,5–5,0 μg/mL derişim aralığında standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Bölüm 3.4.1.1'de verilen ekstraksiyon yöntemiyle plazmadan β-K'nın ekstraksiyonu yapılarak 0,5–5,0 μg/mL derişim aralığında plazma çözeltileri hazırlandı.

α-T, 200 μg/mL derişimde etanolde hazırlanan stok çözeltisi etanol ile seyreltilerek 2,0–50 μg/mL derişim aralığında standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Bölüm 3.4.2.1'de verilen ekstraksiyon yöntemiyle plazmadan α-T'nin ekstraksiyonu yapılarak 4,0–100 μg/mL derişim aralığında plazma çözeltileri hazırlandı.

MN, 200 µg/mL derişimde hekzanda hazırlanan stok çözeltisi hekzan ile seyreltilerek 1,0–40 µg/mL derişim aralığında standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Bölüm 3.4.3.1'de verilen ekstraksiyon yöntemiyle plazmadan MN'nin ekstraksiyonu yapılarak 1,525–32,50 µg/mL derişim aralığında plazma çözeltileri hazırlandı.

MBS, 200 µg/mL derişimde 0,01 M HCl'de hazırlanan stok çözeltisi aynı çözücü ile seyreltilerek 0,5–20 µg/mL derişim aralığında standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Bölüm 3.4.4.1'de verilen ekstraksiyon yöntemiyle plazmada MBS'nin MN'ye dönüşümü yapılıp ekstraksiyonu yapılarak 1,525–32,50 µg/mL derişim aralığında MN plazma çözeltileri hazırlandı.

### 4.2.2. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri Yöntemi

#### 4.2.2.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri Yöntem Geçerlilik Testleri

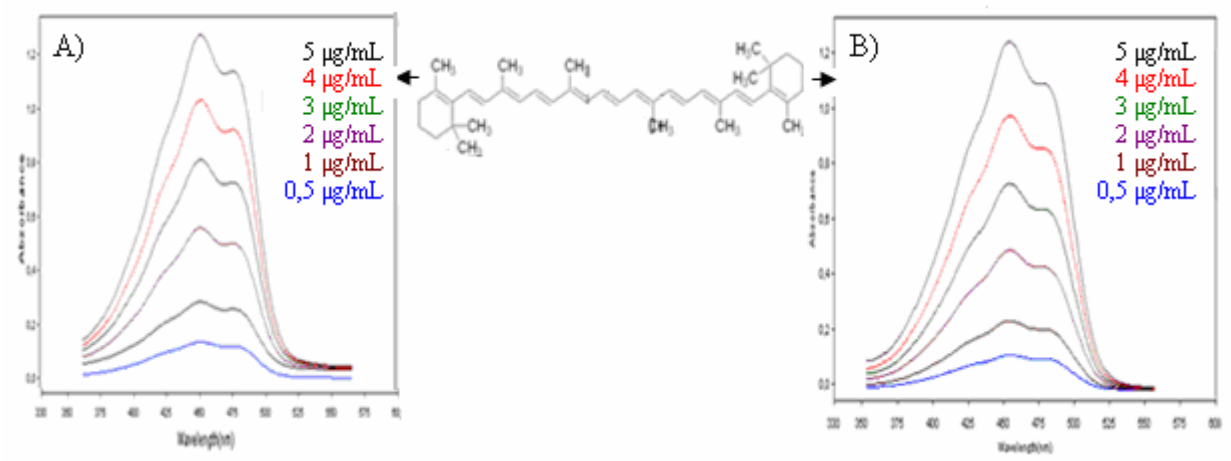
##### 4.2.2.1.1. Özgünlük (Belirleyicilik)

β-K çözeltisinin 330–600 nm dalga boyu aralığında taraması yapıldı ve spektrumları alındı. β-K çok az miktarda hekzanda çözündükten sonra etanol ile hazırlanan çözeltisinin alınan spektrumunda 452 nm ve 477 nm dalga boylarında 2 maksimum pik gözlendi (Şekil 4.1A) Ekstraksiyon ile elde edilen plazma çözeltilerinde ise 452 nm ve 478 nm dalga boylarında 2 maksimum pik gösterdi (Şekil 4.1B). Plazmadan kaynaklanan herhangi bir interferansa rastlanmadı.

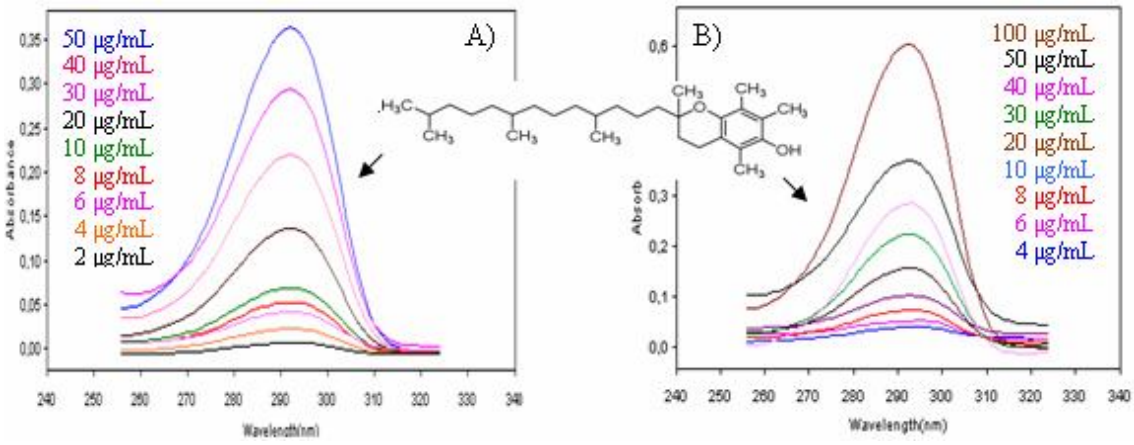
α-T çözeltisi 240–340 nm dalga boyu aralığında taraması yapıldı ve spektrumları alındı. Hem standart hemde plazma çözeltilerinde 292 nm dalga boyunda bir pik gözlendi (Şekil 4.2A-B). Plazmadan kaynaklanan herhangi bir interferansa rastlanmadı.

MN çözeltisi 290–390 nm dalga boyu aralığında taraması yapıldı ve spektrumları alındı. Hem standart hemde plazma çözeltilerinde 330 nm dalga boyunda bir pik gözlendi (Şekil 4.3A-B). Plazmadan kaynaklanan herhangi bir interferansa rastlanmadı.

MBS çözeltisi 200–260 nm dalga boyu aralığında taraması yapılarak spektrumları alındı. MBS'nin 0,01M HCl'de hazırlanan çözeltilerinde 230 nm dalga boyunda maksimum bir pik gözlendi (Şekil 4.4A). MBS, MN'ye dönüştürüldükten sonra plazmadan ekstraksiyon ile elde edilen plazma çözeltileri ise 330 nm dalga boyunda bir pik gösterdi (Şekil 4.4B). Plazmadan kaynaklanan herhangi bir interferansa rastlanmadı.

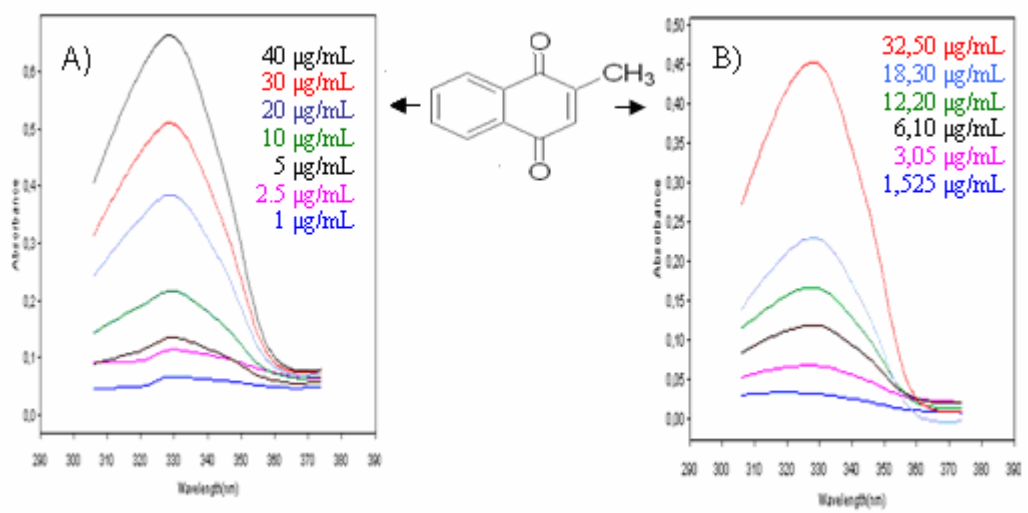



Şekil 4.1: Farklı derişimlerde β-K'nın UV-Görünür Bölge spektrumları: A) Standart çalışma çözeltileri B) Plazma çözeltileri

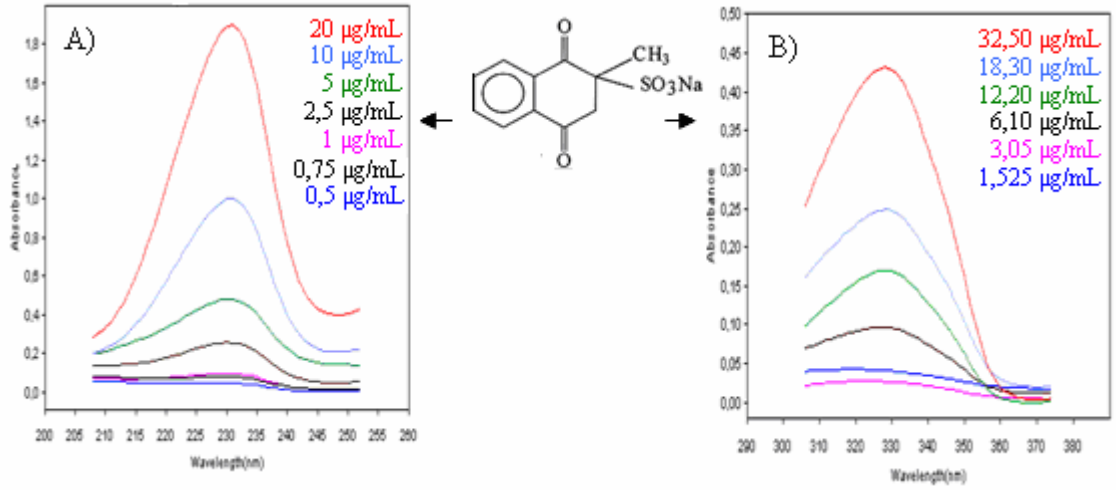



Şekil 4.2: Farklı derişimlerde α-T'nin UV-Görünür Bölge spektrumları: A) Standart çalışma çözeltileri B) Plazma çözeltileri

.



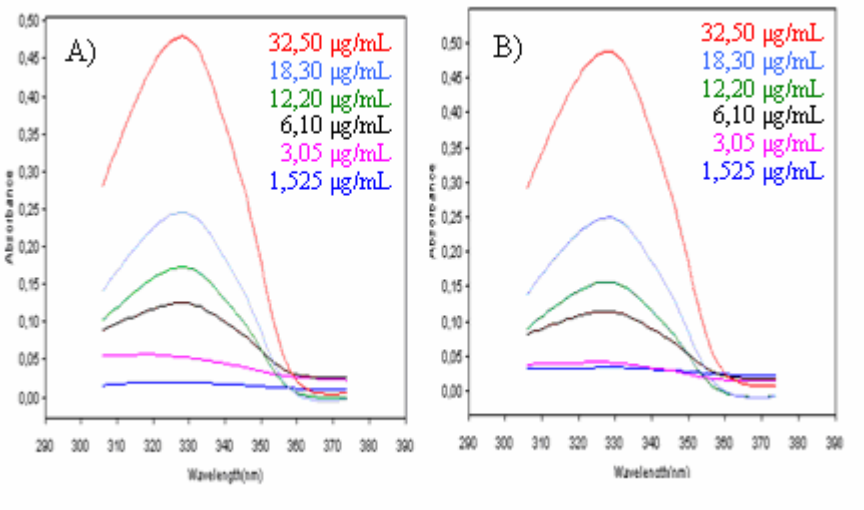

Şekil 4.3: Farklı derişimlerde MN'nin UV-Görünür Bölge spektrumları: A) Standart çalışma çözeltileri B) Plazma çözeltileri




Şekil 4.4: Farklı derişimlerde MBS'nin UV-Görünür Bölge spektrumları: A) Standart çalışma çözeltileri B) Plazma çözeltileri

MBS'nin MN'ye dönüşümünü bulmak için, MBS ve MN ayrı ayrı 0,01 M HCl çözeltisine eklendi Bölüm 3.4.'de verilen yöntemler ile önce dönüşümü daha sonra ekstraksiyonu gerçekleştirilerek 1,525–32,50 µg/mL derişim aralığında standart çözeltileri hazırlandı ve 330 nm dalga boyunda spektrumları (Şekil 4.5A-B) alınıp

absorbansları belirlendi. 0,01 M HCl çözeltisine eklenen MN'nin ve MN'ye dönüştürülen MBS'nin sırasıyla geri kazanım değerleri % 98,96 (% BSS: 2,872, n=6) ve % 96,84 (% BSS: 3,979, n=6) olarak belirlendi. Çalışmada MBS'nin MN'ye dönüşüm oranı % 98,07 (% BSS:1,394 n=6) olarak tespit edildi.




Şekil 4.5: Farklı derişimlerde 0,01M HCl çözeltisinden ekstrakte edilen çözeltilerin UV-Görünür Bölge spektrumları: A) MN'ye dönüştürülmüş MBS çözeltileri B) MN çözeltileri

#### 4.2.2.1.2. Doğrusallık/Çalışma Aralığı

Hekzanda hazırlanan 6 farklı derişimde (0,5, 1, 2, 3, 4 ve 5 µg/mL) β-K'nın, etanolde hazırlanan 9 farklı derişimde (2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40 ve 50 µg/mL) α-T'nin, hekzanda hazırlanan 7 farklı derişimde (1, 2,5, 5, 10, 20, 30 ve 40 µg/mL) MN'nin, 0,01 M HCl ile hazırlanan 7 farklı derişimde (0,5, 1, 2,5, 5, 10, 15 ve 20 µg/mL) MBS'nin standart çözeltilerinin derişimlerine karşı okunan UV-Görünür Bölge absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle standart kalibrasyon eğrileri türetildi (Şekil 4.6A-D).

Plazmaya spike edilip ve plazmadan Bölüm 3.4'de verilen ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen 6 farklı derişimdeki (0,5, 1, 2, 3, 4 ve 5 μg/mL) β-K'nın, 9 farklı derişimdeki (4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50 ve 100 μg/mL) α-T'nin, 6 farklı derişimdeki (1,525, 3,05, 6,01, 12,2, 18,3 ve 32,5 μg/mL) MN ve MN'ye dönüştürülen MBS'nin plazma çözeltilerinin derişimlerine karşı okunan UV-Görünür Bölge absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile plazma kalibrasyon eğrileri türetildi (Şekil 4.7A-D). UV-Görünür Bölge Spektrofotometre yöntemiyle elde edilen kalibrasyon eğrilerinin regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları sırasıyla Tablo 4.4 ve Tablo 4.5'de verildi.

Tablo 4.4: β-K, α-T, MN ve MBS standart çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri

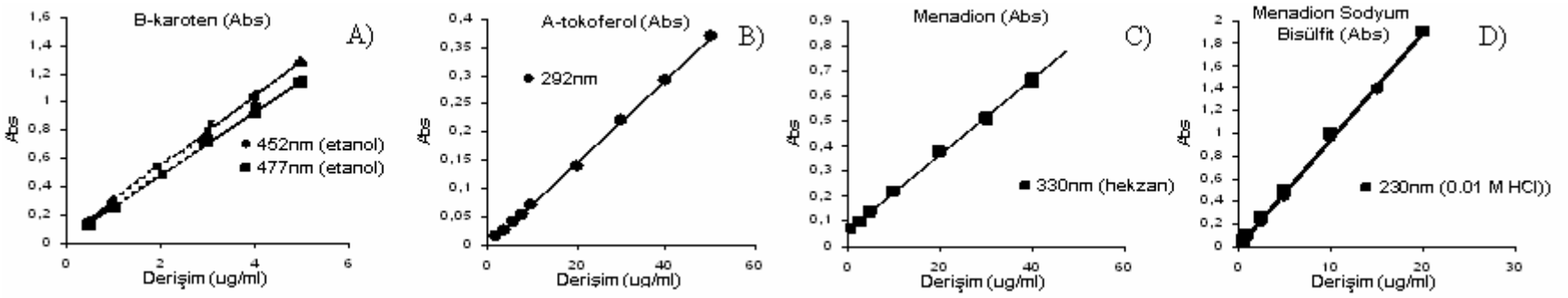
| Etkin Madde | Ortam | ÇA (μg/mL) | LR[a] | Sa | Sb | r |
|---|---|---|---|---|---|---|
| β-K | Etanol | 0,5-5 | $A_{452nm}$=0,2500x+0,032 | 0,0107 | 0,0033 | 0,9995 |
| | | 0,5-5 | $A_{477nm}$=0,2230x+0,030 | 0,0072 | 0,0023 | 0,9993 |
| α-T | Etanol | 2-50 | $A_{292nm}$=0,0073x+0,005 | 0,0013 | 0,0001 | 0,9996 |
| MN | Hekzan | 1,0-40 | $A_{330nm}$=0,0152x+0,060 | 0,00004 | 0,0032 | 0,9996 |
| MBS | 0,01 M HCl | 0,5-20 | $A_{230nm}$=0,0951x+0,013 | 0,0001 | 0,0003 | 0,9997 |

ÇA: çalışma aralığı, [a]:6 kalibasyon eğrisi, LR: lineer regresyon, Sa: regresyon eğrisindeki kaymanın standart sapması
Sb: regresyon eğrisindeki eğimin standart sapması, r: korelasyon katsayısı

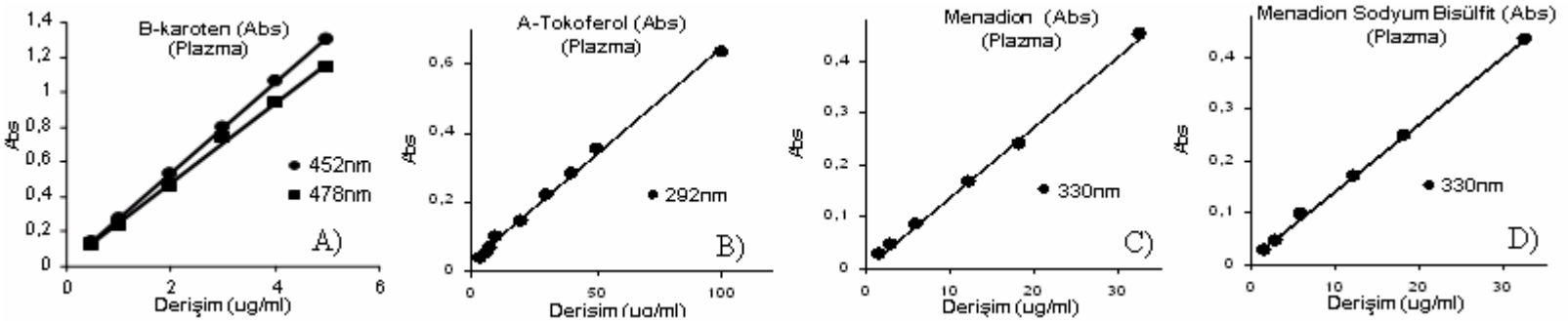
Tablo 4.5: β-K, α-T, MN ve MN'ye dönüştürülen MBS'nin plazma çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri

| Etkin Madde | ÇA (μg/mL) | LR[a] | Sa | Sb | r |
|---|---|---|---|---|---|
| β-K | 0,5-5 | $A_{452nm}$=0,2601x+0,0130 | 0,0137 | 0,0090 | 0,9998 |
| | 0,5-5 | $A_{478nm}$=0,2288x+0,0168 | 0,0177 | 0,0073 | 0,9991 |
| α-T | 4-100 | $A_{292nm}$=0,0062x+0,0270 | 0,0062 | 0,0270 | 0,9980 |
| MN | 1,525-32,5 | $A_{330nm}$=0,0136x+0,0016 | 0,0007 | 0,0017 | 0,9989 |
| MBS | 1,525-32,5 | $A_{330nm}$=0,0131x+0,0102 | 0,0006 | 0,0004 | 0,9996 |

ÇA: çalışma aralığı, [a]:6 kalibasyon eğrisi, LR: lineer regresyon, Sa: regresyon eğrisindeki kaymanın standart sapması
Sb: regresyon eğrisindeki eğimin standart sapması, r: korelasyon katsayısı




Şekil 4.6: UV-Görünür Bölge spektrofotometri yöntemi ile elde edilen standart çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrileri: A) β-K B) α-T C) MN D) MBS




Şekil 4.7: UV-Görünür Bölge spektrofotometri yöntemi ile elde edilen plazma çözeltilerinin kalibrasyon eğrileri: A) β-K B) α-T C) MN D) MN'ye dönüştürülmüş MBS

#### 4.2.2.1.3. Doğruluk/ Kesinlik

β-K, α-T, MN ve MBS kalibrasyon eğrileri içine düşen üç farklı derişimde standart kalite kontrol çözeltilerinin ve plazmadan ekstraksiyon ile elde edilen plazma kalite kontrol çözeltilerinin güniçi (aynı yöntem ve aynı labaratuar şartlarında 1 günde 6 kez) ve günler arası (aynı yöntemle farklı 3 günde 6 kez) analizleri ile doğruluk ve kesinlik değerleri elde edildi. Analiz sonuçlarının ortalaması ve standart sapmaları belirlendi. Doğruluk bağıl hatayla ve kesinlikte bağıl standart sapma (% BSS) ile verildi (Tablo 4.6 ve Tablo 4.7).

Tablo 4.6: β-K, α-T, MN ve MBS standart çözeltilerin güniçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)

| Etkin Madde | Ortam | λ(nm) | Eklenen (μg/mL) | Güniçi | | | Günler Arası | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Ortalama±SS (μg/mL) | Doğruluk | % BSS | Ortalama±SS (μg/mL) | Doğruluk | % BSS |
| β-K | Etanol | $A_{452}$ | 0,750 | 0,776± 0,018 | 3,330 | 2,319 | 0,723±0,058 | - 3,600 | 8,022 |
| | | | 2,500 | 2,640±0,038 | 5,600 | 1,439 | 2,604±0,049 | 4,160 | 1,881 |
| | | | 4,000 | 4,018±0,035 | 0,450 | 0,871 | 3,983±0,044 | 0,425 | 1,104 |
| | | $A_{477}$ | 0,750 | 0,781±0,008 | - 4,930 | 1,024 | 0,726±0,062 | - 3,200 | 8,539 |
| | | | 2,500 | 2,669±0,046 | 6,760 | 1,723 | 2,583±0,045 | 3,320 | 1,742 |
| | | | 4,000 | 3,951±0,041 | 1,225 | 1,037 | 3,945±0,054 | -1,375 | 1,368 |
| α-T | Etanol | $A_{292}$ | 3,000 | 3,050±0,103 | 1,666 | 3,377 | 3,027±0,150 | 0,900 | 4,955 |
| | | | 10,00 | 10,11±0,112 | 1,100 | 1,107 | 10,10±0,296 | 1,000 | 2,930 |
| | | | 40,00 | 40,58±0,732 | 1,450 | 1,803 | 39,51±1,729 | 1,225 | 4,376 |
| MN | Hekzan | $A_{330}$ | 1,000 | 0,947±0,055 | -5,26 | 1,123 | 0,969±0,173 | -3,070 | 3,527 |
| | | | 5,000 | 4,971±0,033 | -0,570 | 0,380 | 4,763±0,284 | -4,736 | 3,263 |
| | | | 30,00 | 29,62±0,053 | -1,264 | 0,159 | 28,74±0,790 | -4,188 | 2,417 |
| MBS | 0.01 M HCl | $A_{230}$ | 1,000 | 0,924±0,095 | -7,540 | 9,610 | 0,975±0,045 | -2,431 | 4,377 |
| | | | 5,000 | 4,867±0,362 | -2,649 | 7,351 | 4,633±0,336 | -7,336 | 6,419 |
| | | | 15,00 | 14,33±0,403 | -4,442 | 2,806 | 14,02±0,681 | -6,474 | 4,838 |

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

Tablo 4.7: β-K, α-T, MN ve MN'ye dönüştürülen MBS plazma çözeltilerinin güniçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)

| Etkin Madde | λ(nm)[a] | Eklenen (μg/mL) | Güniçi | | | Günler Arası | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Ortalama±SS (μg/mL) | Doğruluk | % BSS | Ortalama±SS (μg/mL) | Doğruluk | % BSS |
| β-K | $A_{452nm}$ | 0,750 | 0,764±0,016 | 1,841 | 2,104 | 0,763±0,022 | 1,670 | 2,828 |
| | | 2,500 | 2,576±0,070 | 3,037 | 2,724 | 2,537±0,073 | 1,474 | 2,881 |
| | | 4,000 | 4,110±0,091 | 2,749 | 2,209 | 3,943±0,167 | -1,416 | 4,247 |
| | $A_{478\ nm}$ | 0,750 | 0,758±0,019 | 1,106 | 2,445 | 0,766±0,021 | 2,103 | 2,732 |
| | | 2,500 | 2,521±0,057 | 0,825 | 2,269 | 2,524±0,075 | 0,945 | 2,966 |
| | | 4,000 | 4,133±0,167 | 3,337 | 2,120 | 4,114±0,227 | 2,842 | 5,519 |
| α-T | $A_{292nm}$ | 6,000 | 5,902±0,320 | -1,631 | 5,418 | 5,980±0,427 | -0,330 | 7,144 |
| | | 20,00 | 19,19±0,433 | -4,032 | 2,255 | 19,27±0,593 | -3,629 | 3,075 |
| | | 40,00 | 41,32±1,138 | 3,293 | 2,754 | 40,26±1,420 | 0,672 | 3,525 |
| MN | $A_{330nm}$ | 1,525 | 1,672±0,120 | 7,183 | 9,611 | 1,708±0,127 | 12,02 | 7,413 |
| | | 6,100 | 6,292±0,234 | 3,726 | 3,142 | 6,120±0,194 | 0,329 | 3,171 |
| | | 18,30 | 17,43±0,060 | 0,344 | -4,747 | 17,81±0,504 | -2,674 | 2,829 |
| MBS | $A_{330nm}$ | 1,525 | 1,397±0,080 | -8,397 | 5,731 | 1,359±0,128 | -10,90 | 9,401 |
| | | 6,100 | 6,667±0,062 | 9,456 | 0,933 | 6,308±0,295 | 3,408 | 4,682 |
| | | 18,30 | 18,242±0,112 | -0,318 | 0,616 | 18,11±0,738 | -1,014 | 4,075 |

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

#### 4.2.2.1.4. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)

β-K, α-T, MN ve MBS'nin standart ve plazma çözeltileri ile elde edilen kalibrasyon eğrilerinin en küçük derişiminden daha küçük derişimlere inilerek bir seri standart çözeltileri hazırlandı ve altı kez absorbansları okundu. Okunan değerlerin bağıl standart sapmaları (% BSS) belirlendi. Bağıl standart sapma değeri % 20'den küçük olan derişim gözlenebilme sınırı ve % 10'dan küçük olan derişim de tayin alt sınırı değeri olarak belirlendi.[192-194] UV-Görünür Bölge spektrofotometri yöntemin gözlenebilme sınırı ve tayin alt sınırı değerleri sırasıyla Tablo 4.8 ve Tablo 4.9'da verildi.

Tablo 4.8: β-K, α-T, MN ve MBS standart çözeltilerin gözlenebilme sınırı ve tayin alt sınırı

| Etkin Madde | Dalga Boyu (nm) | Duyarlılık Limiti | |
|---|---|---|---|
| | | Gözlenebilme Sınırı (LOD, μg/mL) | Tayin Alt Sınırı (LOQ, μg/mL) |
| β-K | $A_{452nm}$ | 0,04 | 0,05 |
| | $A_{477\ nm}$ | 0,04 | 0,05 |
| α-T | $A_{292nm}$ | 1,00 | 2,00 |
| MN | $A_{330nm}$ | 0,30 | 0,50 |
| MBS | $A_{230nm}$ | 0,20 | 0,30 |

Tablo 4.9: β-K, α-T, MN ve MN'ye dönüştürülen MBS plazma çözeltilerinin gözlenebilme sınırı ve tayin alt sınırı

| Etkin Madde | Dalga Boyu (nm) | Duyarlılık Limiti | |
|---|---|---|---|
| | | Gözlenebilme Sınırı (LOD, μg/mL) | Tayin Alt Sınırı (LOQ, μg/mL) |
| β-K | $A_{452nm}$ | 0,050 | 0,075 |
| | $A_{478\ nm}$ | 0,050 | 0,075 |
| α-T | $A_{292nm}$ | 2,000 | 4,000 |
| MN | $A_{330nm}$ | 0,610 | 1,525 |
| MBS | $A_{330nm}$ | 0,610 | 1,525 |

#### 4.2.2.1.5. Geri Kazanım

Farmasötik preparattan geri kazanım çalışmaları standart ekleme yöntemi ile yapıldı. Hekzanda çözülüp etanol ile seyreltilen Carovit® yumuşak kapsülden (20 mg β-K / kapsül) ve etanolde çözülen Evicap® yumuşak kapsülden (200 IU (134,23 mg) α-T / kapsül) sırasıyla 2 μg/mL ve 10 μg/mL derişimlerde; MBS etkin maddesine sahip olan Libavit K® ampul (20 mg MBS / 2 mL) preparatı 0,01 M HCl'de çözülerek 5 μg/mL (MBS analizinde) ve 10 μg/mL (MBS'nin MN'ye dönüştürülmesinde) derişimlerde ilaç çözeltileri hazırlanarak UV-Görünür Bölge spektrumları alınarak absorbansları okundu. Sonra bu çözeltiler üzerine β-K, α-T, ve MN ve MBS'nin 3 farklı derişimde hazırlanan standart çözeltileri eklendi ve tekrar UV-Görünür Bölge

absorbansları üç kez okundu. Belirlenen absorbans değerleri aynı derişimdeki standart çözeltilerinin absorbans değerleriyle kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.10'da verildi.

Tablo 4.10: Farmasötik preparatlara katım yapılan çözeltilerin UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yöntemiyle elde edilen geri kazanım değerleri (n=6)

| Ticari Preparat | λ (nm) | Eklenen (μg/mL) | Ortalama±SS (μg/mL) | Geri Kazanım | % BSS |
|---|---|---|---|---|---|
| Carovit® 2μg/mL | $A_{452nm}$ | 0,750 | 0,765±0,042 | 102,0 | 5,560 |
| | | 2,500 | 2,571±0,116 | 102,8 | 4,513 |
| | | 4,000 | 4,328±0,110 | 108,2 | 2,549 |
| | $A_{477\ nm}$ | 0,750 | 0,730±0,041 | 97,41 | 5,713 |
| | | 2,500 | 2,640±0,064 | 105,6 | 2,431 |
| | | 4,000 | 4,246±0,104 | 106,1 | 2,460 |
| Evicap® 10μg/mL | $A_{292nm}$ | 3,000 | 2,819±0,139 | 93,99 | 4,949 |
| | | 10,00 | 9,418±0,360 | 94,18 | 3,822 |
| | | 40,00 | 40,61±1,877 | 101,5 | 4,623 |
| Libavit K® 5μg/mL | $A_{230nm}$ | 0,750[a] | 0,720±0,046 | 96,04 | 6,463 |
| | | 5,000[a] | 4,961±0,131 | 99,22 | 2,645 |
| | | 15,00[a] | 14,80±0,408 | 98,71 | 2,756 |
| Libavit K® 6,1[c]μg/mL | $A_{330nm}$ | 1,000[b] | 1,063±0,094 | 106,3 | 8,929 |
| | | 5,100[b] | 4,805±0,332 | 96,10 | 6,920 |
| | | 30,00[b] | 29,289±0,570 | 97,63 | 1,948 |

[a]:MBS standart çözeltisi, [b]:MN standart çözeltisi, [c]: 10μg/mL MBS'nin MN'ye eşdeğer derişimi, λ: dalga boyu, % BSS: bağıl standart sapma (SS/ortalamax100)

Plazmadan geri kazanım çalışmasında, β-K, α-T, MN ve MBS'nin üç farklı derişimdeki kalite kontrol çözeltileri plazmaya eklendi. Karıştırıldı ve sırasıyla Bölüm 3.4'de verilen ekstraksiyon işlemleri ile ekstraksiyonları yapıldı. Ekstraksiyon sonrasında elde edilen çözeltilerin güniçi ve günler arası yapılan analizlerinde okunan UV-Görünür Bölge absorbans değerleri standart çözeltilerden elde edilen absorbans değerleri ile kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.11'de verildi.

Tablo 4.11: UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminin güniçi ve günler arası plazma yüzde geri kazanım değerleri (n=6)

| Etkin Madde | λ(nm) | Eklenen (μg/mL) | Güniçi | | | Günler Arası | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Ortalama (μg/mL) | %Geri Kazanım | % BSS | Ortalama (μg/mL) | %Geri Kazanım | % BSS |
| β-K | $A_{452nm}$ | 0,750 | 0,778 | 103,8 | 3,359 | 0,746 | 99,51 | 6,965 |
| | | 2,500 | 2,468 | 98,72 | 3,246 | 2,463 | 98,55 | 3,670 |
| | | 4,000 | 4,176 | 104,4 | 2,240 | 4,008 | 100,2 | 5,015 |
| | $A_{478\ nm}$ | 0,750 | 0,732 | 97,56 | 1,990 | 0,744 | 99,20 | 3,400 |
| | | 2,500 | 2,368 | 94,72 | 2,610 | 2,446 | 97,85 | 3,900 |
| | | 4,000 | 3,908 | 97,71 | 2,250 | 3,914 | 97,85 | 3,370 |
| α-T | $A_{292nm}$ | 6,000 | 5,346 | 89,10 | 5,208 | 5,483 | 91,39 | 2,280 |
| | | 20,00 | 18,54 | 92,70 | 1,847 | 18,66 | 93,33 | 1,191 |
| | | 40,00 | 39,37 | 98,43 | 2,571 | 38,73 | 96,83 | 1,479 |
| MN | $A_{330nm}$ | 1,525 | 1,317 | 86,38 | 6,104 | 1,489 | 97,66 | 1,857 |
| | | 6,100 | 5,716 | 93,71 | 2,979 | 5,563 | 91,21 | 2,539 |
| | | 18,30 | 16,79 | 91,80 | 0,205 | 16,93 | 92,56 | 1,906 |
| MBS | $A_{330nm}$ | 1,525 | 1,480 | 97,09 | 2,686 | 1,534 | 100,6 | 1,503 |
| | | 6,100 | 6,405 | 105,0 | 1,441 | 5,299 | 86,87 | 3,476 |
| | | 18,30 | 17,54 | 95,83 | 0,532 | 17,53 | 95,79 | 0,491 |

λ: dalga boyu, % BSS: bağıl standart sapma (standart sapma/ortalamax100)

### 4.2.3. Birinci ve İkinci Türev Spektrofotometri Yöntemi

#### 4.2.3.1. Birinci ve İkinci Türev Spektrofotometri Yöntem Geçerlilik Testleri

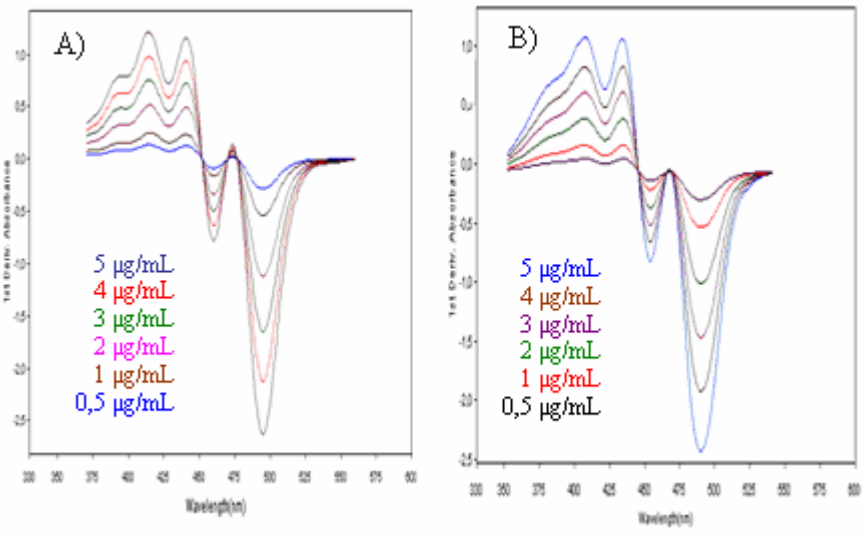
##### 4.2.3.1.1. Özgünlük (Belirleyicilik)

β-K çözeltisinin 330 nm ve 600 nm dalga boyu aralığında 1D- ve 2D- spektrum taraması yapıldı. β-K'nın hekzanda çözülüp etanol ile seyreltilerek hazırlanan çözeltilerinin 1D- spektrumunda 439 nm ve 474 nm dalga boylarında 2 maksimum pik, 460 nm ve 496 nm dalga boylarında 2 minimum pik (Şekil 4.8A) ve plazmadan ekstraksiyon yapılan çözeltilerinin 1D- spektrumunda da 439 nm dalga boyunda 1 maksimum pik, 458 nm ve 493 nm dalga boylarında 2 minimum pik (Şekil 4.8B) gözlendi ve plazmadan kaynaklanan herhangi bir interferansa rastlanmadı.

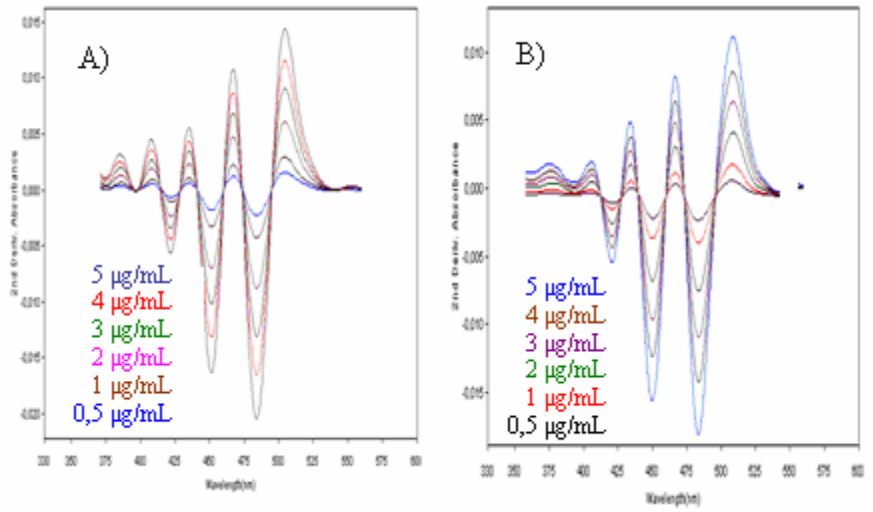
β-K'nın hekzanda hazırlanıp etanol ile seyreltilerek hazırlanan çözeltinin 2D-spektrumunda 433 nm, 467 nm ve 505 nm dalga boylarında 3 maksimum pik, 451 nm

ve 484 nm dalga boylarında 2 minimum pik (Şekil 4.9A) ve plazma ekstraksiyon çözeltisinin 2D-spektrumunda 432 nm, 462 nm ve 501 nm dalga boylarında 3 maksimum pik, 449 nm ve 481 nm dalga boylarında 2 minimum pik gözlendi (Şekil 4.9B). Plazmadan kaynaklanan herhangi bir interferansa rastlanmadı.

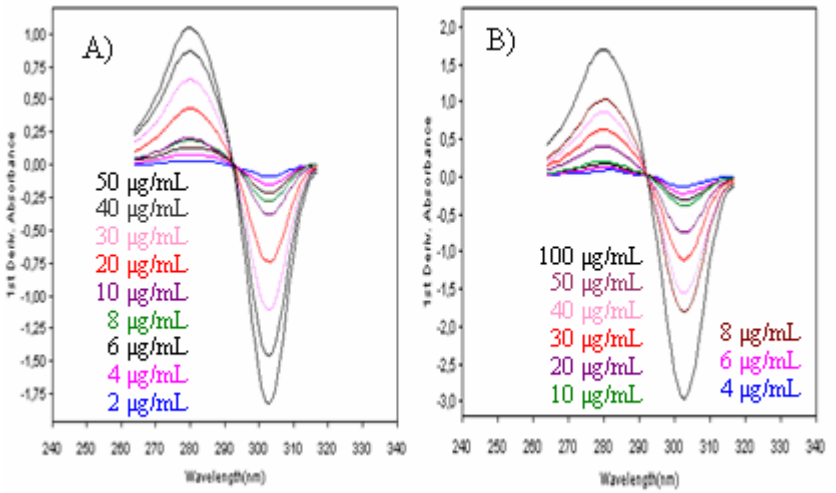
α-T çözeltisinin, 240 nm ve 340 nm dalga boyu aralığın da 1D- ve 2D- spektrum taraması yapıldı. Hem standart hem de plazma çözeltilerinin 1D- spektrumunda 279 nm dalga boyunda bir maksimum pik, 303 nm dalga boyunda bir minimum pik (Şekil 4.10A-B), 2D- spektrumunda ise 308 nm dalga boyunda bir maksimum pik, 299 nm dalga boyunda da bir minimum pik (Şekil 4.11A-B) gözlendi. Plazmadan kaynaklanan herhangi bir interferansa rastlanmadı.



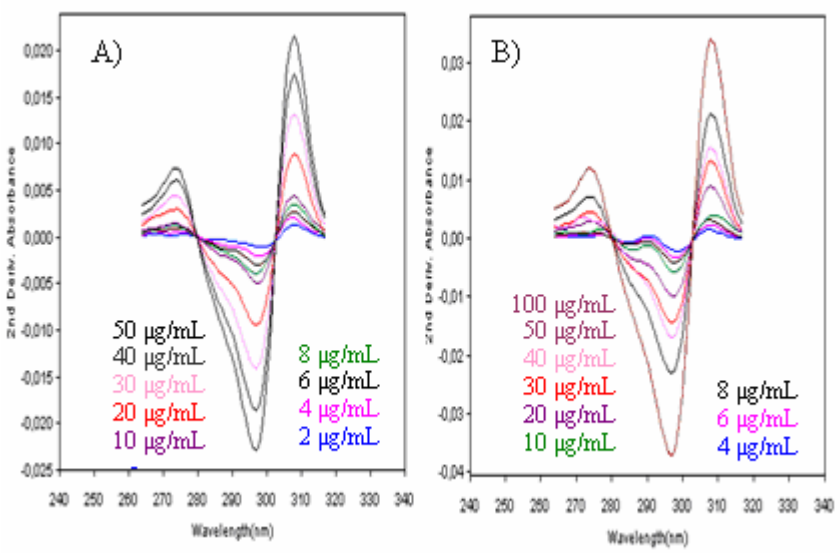

Şekil 4.8: Farklı derişimlerde β-K'nın 1D- spektrumları: A) Standart çalışma çözeltileri B) Plazma çözeltileri




Şekil 4.9: Farklı derişimlerde β-K'nın 2D- spektrumları: A Standart çalışma çözeltileri B) Plazmadan çözeltileri

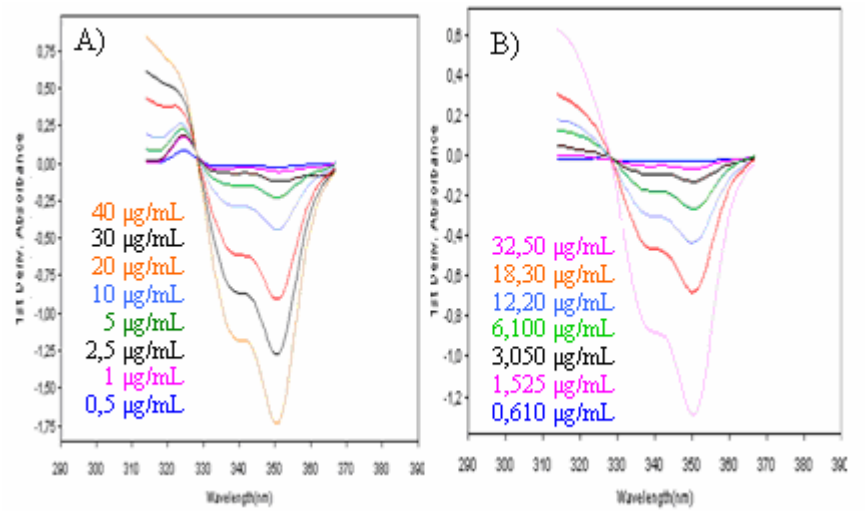



Şekil 4.10: Farklı derişimlerde α-T'nin 1D- spektrumları: A) Standart çalışma çözeltileri B) Plazma çözeltileri



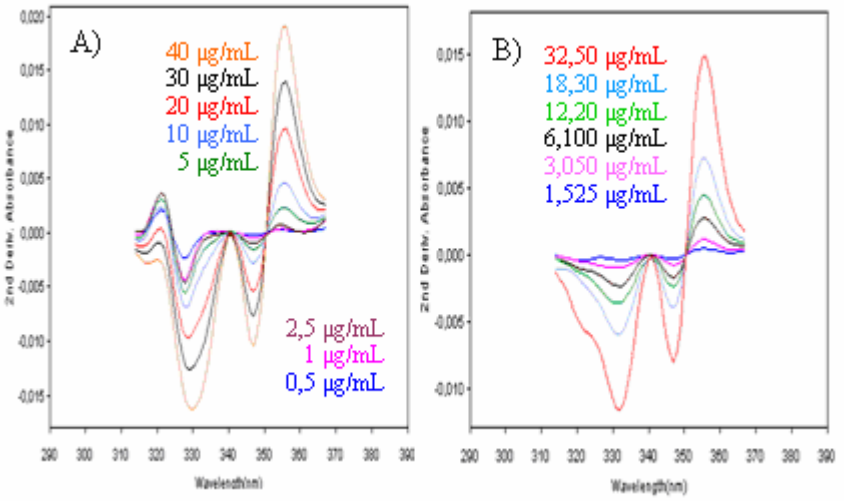

Şekil 4.11: Farklı derişimlerde α-T'nin 2D- spektrumları: A) Standart çalışma çözeltileri B) Plazma çözeltileri

MN çözeltisinin 290 nm ve 390 nm dalga boyu aralığın da 1D- ve 2D- spektrum taraması yapıldı. Hem standart hem de plazma çözeltilerinin 1D- spektrumunda 350 nm dalga boyunda bir minimun pik (Şekil 4.12A-B) gözlendi. Plazmadan kaynaklanan herhangi bir interferansa rastlanmadı.




Şekil 4.12: Farklı derişimlerde MN'nin 1D- spektrumları: A) Standart çalışma çözeltileri B) Plazma çözeltileri

MN'nin hekzanda hazırlanan ve plazma ekstraksiyon çözeltisinin 2D-spektrumunda 355 nm dalga boyunda bir maksimum pik, 330 nm ve 347 nm dalga boylarında 2 minimum pik gözlendi (Şekil 4.13A-B). Plazmadan kaynaklanan herhangi bir interferansa rastlanmadı.

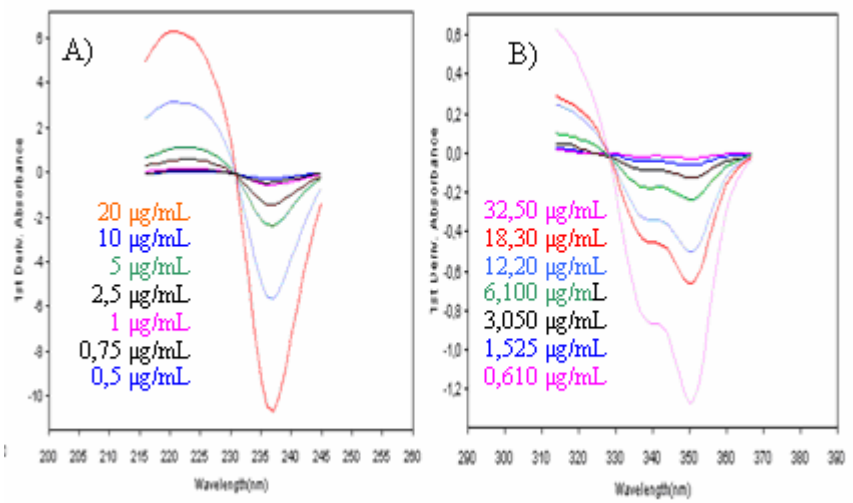



Şekil 4.13: Farklı derişimlerde MN'nin 2D- spektrumları: A) Standart çalışma çözeltileri B) Plazma çözeltileri

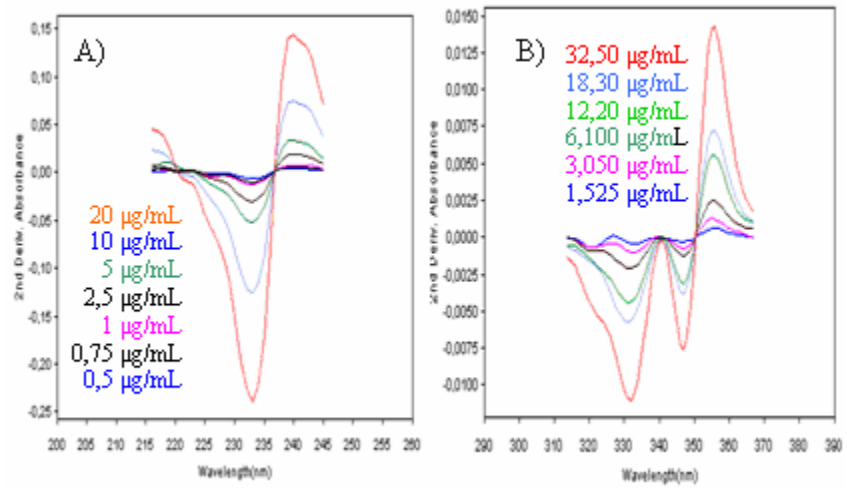
MBS'nin standart çözeltisinin 200 nm ve 260 nm dalga boyu aralığında, plazma çözeltisinin 290 nm ve 390 nm dalga boyu aralığın da 1D- ve 2D- spektrum taraması yapıldı. 0,01 M HCl'de hazırlanan çözeltilerinin 1D- spektrumunda 224 nm dalga boyunda bir maksimum pik, 236 nm dalga boyunda da bir minimum pik (Şekil 4.14A), 2D- spektrumunda 241 nm dalga boyunda bir maksimum pik, 233 nm dalga boyunda da bir minimum pik (Şekil 4.15A) gözlendi.

Plazmada MBS'nin MN'ye dönüştürüldükten sonra ekstraksiyonu ile elde edilen plazma çözeltilerinin 1D- spektrumunda 350 nm dalga boyunda bir minumum (Şekil

4.14B), 2D- spektrumunda 355 nm dalga boyunda bir maksimum pik, 330 nm ve 347 nm dalga boylarında da iki minimum pik (Şekil 4.15B) gözlendi. Plazmadan kaynaklanan herhangi bir interferansa rastlanmadı.

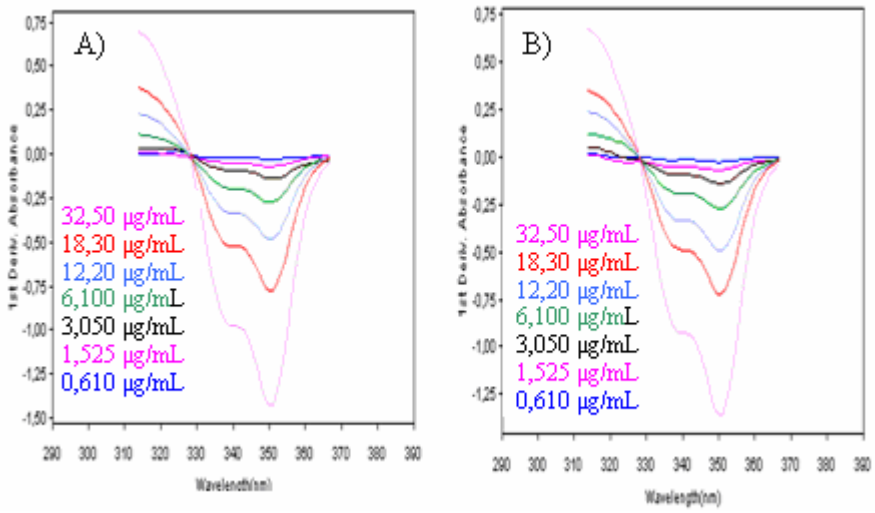



Şekil 4.14: Farklı derişimlerde MBS'nin 1D- spektrumları: A) Standart çalışma çözeltileri B) MN'ye dönüştürülmüş MBS'nin plazma çözeltileri




Şekil 4.15: Farklı derişimlerde MSB'nin 2D-spektrumları: A) Standart çalışma çözeltileri B) MN'ye dönüştürülmüş MBS'nin plazma çözeltileri.

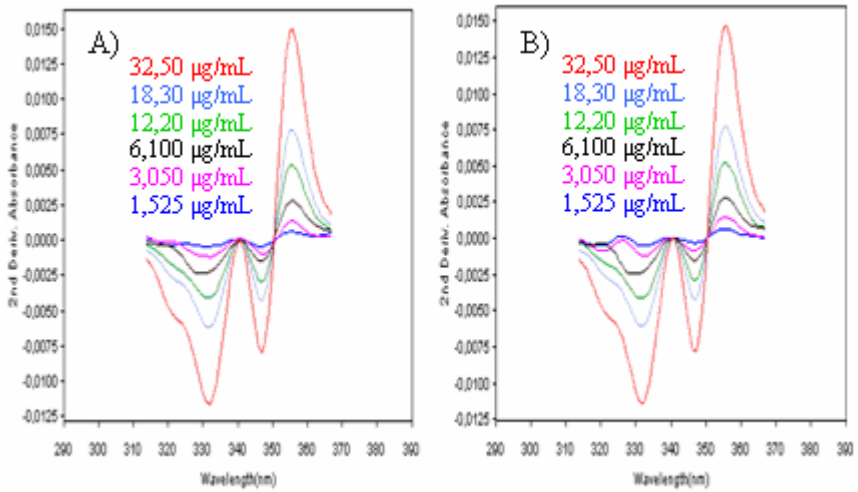
Türev spektrofotometre çalışmasında MBS'nin MN'a dönüşüm oranını belirlemek için, MBS ve MN ayrı ayrı 0,01 M HCl çözeltisine eklendi Bölüm 3.4.'de verilen yöntemler ile önce dönüşümü daha sonra ekstraksiyonu gerçekleştirilerek 1,525–32,50 µg/mL derişim aralığında MN'nin standart çözeltiler hazırlandı ve 350 nm dalga boyunda 1D- spektrumları (Şekil 4.16A-B) alınıp absorbansları belirlendi. 0,01 M HCl çözeltisine eklenen MN'nin ve MN'ye dönüştürülen MBS'nin sırasıyla geri kazanım değerleri % 105,8 (% BSS: 3,503 n=6) ve %104,0 (% BSS: 6,316 n=6) olarak belirlendi. Çalışmada MBS'nin MN'ye dönüşüm oranı %98,35 (% BSS: 3,387 n=6) olarak belirlendi.




Şekil 4.16: Farklı derişimlerde 0,01M HCl çözeltisinden ekstrakte edilen çözeltilerin 1D-spektrumları: A) MN'ye dönüştürülmüş MBS çözeltileri B) MN çözeltileri

Aynı şekilde, 330 nm, 347 nm ve 355 nm dalga boylarında 2D- spektrumları (Şekil 4.17A-B) alınıp absorbansları belirlendi. 0,01 M HCl çözeltisine eklenen MN'nin ve MN'ye dönüştürülen MBS'nin sırasıyla geri kazanım değerleri sırasıyla, 330 nm'de, % 97,86 (% BSS: 4,334 n=6) ve % 95,22 (% BSS: 2,922 n=6) olarak, 347

nm'de, % 98,84 (% BSS: 4,622 n=6) ve % 94,11 (% BSS: 3,445 n=6) olarak ve 355 nm'de, % 98,45 (% BSS: 2,882 n=6) ve % 95,31 (% BSS: 2,166 n=6) olarak belirlendi. Çalışmada belirtilen (330 nm, 347 nm ve 355 nm) dalga boylarında MBS'nin MN'ye dönüşüm oranı sırasıyla, % 97,49 (% BSS:1,439 n=6), % 95,58 (% BSS:2,343 n=6) ve % 97,12 (% BSS:1,583 n=6) olarak belilrlendi.




Şekil 4.17: Farklı derişimlerde 0,01M HCl çözeltisinden ekstrakte edilen çözeltilerin 2D-spektrumları: A) MN'ye dönüştürülmüş MBS çözeltileri B) MN çözeltileri

#### 4.2.3.1.2. Doğrusallık/Çalışma Aralığı

Etanolde hazırlanan 6 farklı derişimde (0,5, 1, 2, 3, 4 ve 5 µg/mL) β-K'in, yine etanolde hazırlanan 9 farklı derişimde (2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40 ve 50 µg/mL) α-T'nin, hekzanda hazırlanan 8 farklı derişimde (0,5, 1, 3, 5, 10, 20, 30 ve 40 µg/mL) MN'nin, 0,01 M HCl'de hazırlanan 7 farklı derişimde (0,5, 1, 2,5, 5, 10, 15 ve 20 µg/mL) MBS'nin standart çözeltilerinin derişimlerine karşı okunan 1D- absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle ile kalibrasyon eğrileri türetildi (Şekil 4.18A-E). Etanolde

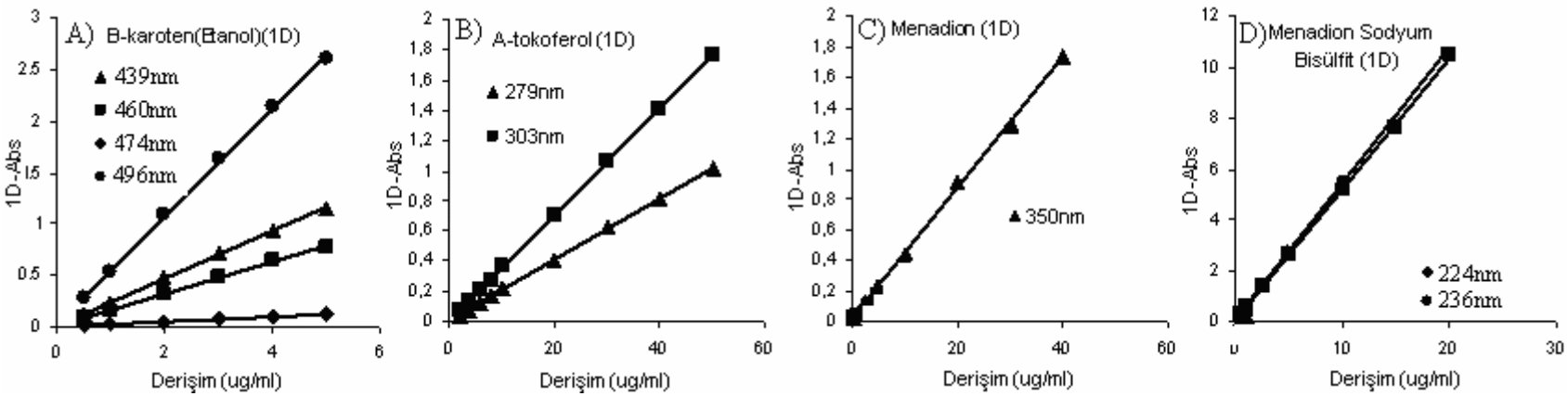
hazırlanan 6 farklı derişimde (0,5, 1, 2, 3, 4 ve 5 μg/mL) β-K, etanolde hazırlanan 9 farklı derişimde (2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40 ve 50 μg/mL) α-T, hekzanda hazırlanan 8 farklı derişimde (0,5, 1, 3, 5, 10, 20, 30 ve 40 μg/mL) MN, 0,01M HCl ile hazırlanan 7 farklı derişimde (0,5, 0,75,1, 2,5, 5, 10 ve 20 μg/mL) MBS'nin standart çözeltilerinin derişimlerine karşı okunan 2D- absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon eğrileri türetildi (Şekil 4.19A-E).

Plazmaya spike edilip ve plazmadan Bölüm 3.4'de verilen ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen 6 farklı derişimde (0,5, 1, 2, 3, 4 ve 5 μg/mL) β-K'nın, 9 farklı derişimde (4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50 ve 100 μg/mL) α-T'nin, 6 farklı derişimdeki (1,525, 3,05, 6,01, 12,2, 18,3 ve 32,5 μg/mL) MN ve MBS'nin plazma çözeltilerinin derişimlerine karşı okunan 1D- absorbans değerlerinin (Şekil 4.20A-D) ve 2D-absorbans değerlerinin (Şekil 4.21A-D) grafiğe geçirilmesi ile plazma kalibrasyon eğrileri türetildi.1D- ve 2D- spektrofotometri yöntemiyle elde edilen kalibrasyon eğrilerinin regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları sırasıyla Tablo 4.12, 4.13, 4.14 ve 4.15'de verildi.

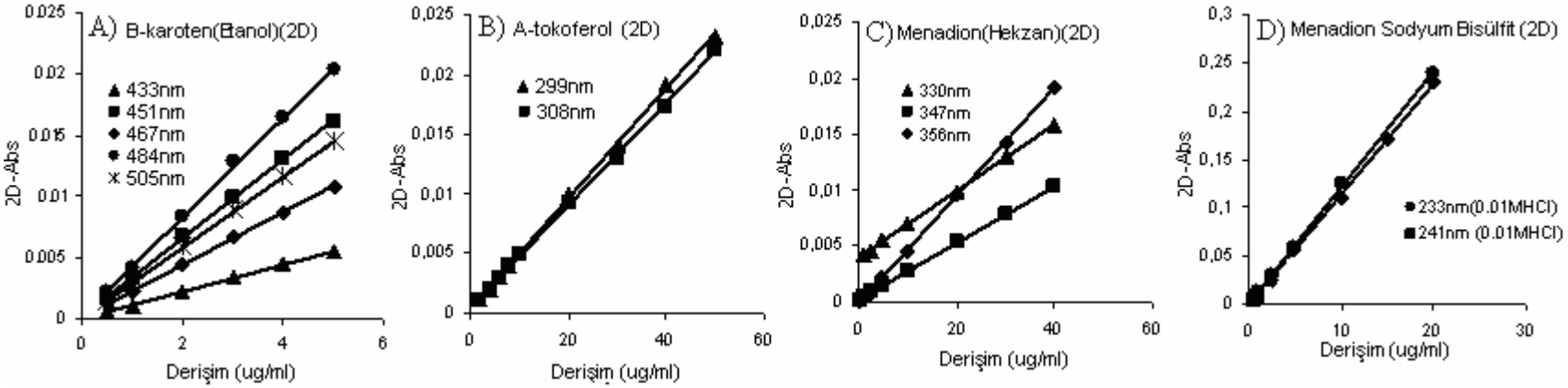
Tablo 4.12: 1D-Spektrofotometri yöntemi ile β-K, α-T, MN ve MBS standart çalışma çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri

| Etkin Madde | Ortam | ÇA (μg/mL) | LR[a] | Sa | Sb | r |
|---|---|---|---|---|---|---|
| β-K | Etanol | 0,5-5 | $1D_{439nm}$=0,2310x+0,0100 | 0,0049 | 0,0006 | 0,9996 |
| | | 0,5-5 | $1D_{460nm}$=0,1570x+0,0100 | 0,0043 | 0,0011 | 0,9994 |
| | | 0,5-5 | $1D_{474nm}$=0,0250x+0,0740 | 0,0014 | 0,0012 | 0,9986 |
| | | 0,5-5 | $1D_{496nm}$=0,5230x+0,0330 | 0,0065 | 0,0045 | 0,9995 |
| α-T | Etanol | 2-50 | $1D_{279nm}$=0,0203x+0,0033 | 0,0009 | 0,0082 | 0,9997 |
| | | 2-50 | $1D_{303nm}$=0,0354x+0,0003 | 0,0013 | 0,0059 | 0,9998 |
| MN | Hekzan | 0,5-40 | $1D_{350nm}$=0,0430x+0,0126 | 0,0009 | 0,0004 | 0,9997 |
| MBS | 0,01 M HCl | 0,5-20 | $1D_{224nm}$=0,3224x-0,1606 | 0,00570 | 0,0527 | 0,9995 |
| | | 0,5-20 | $1D_{236nm}$=0,5341x+0,0732 | 0,00028 | 0,0013 | 0,9998 |

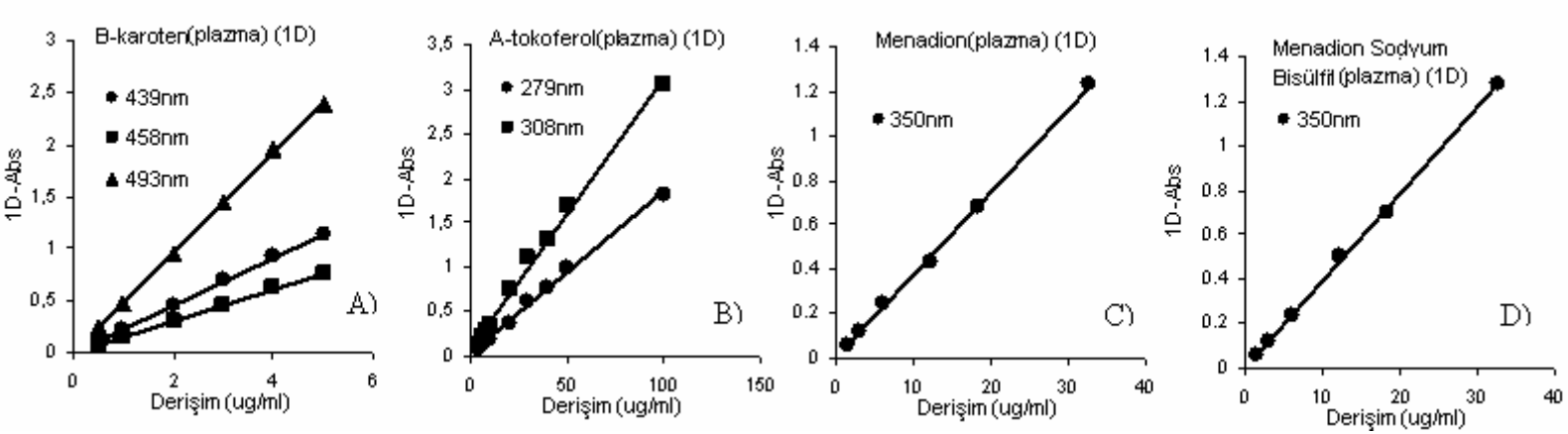
ÇA: çalışma aralığı, [a]:6 kalibasyon eğrisi, LR: lineer regresyon, Sa: regresyon eğrisindeki kaymanın standart sapması, Sb: regresyon eğrisindeki eğimin standart sapması, r: korelasyon katsayısı



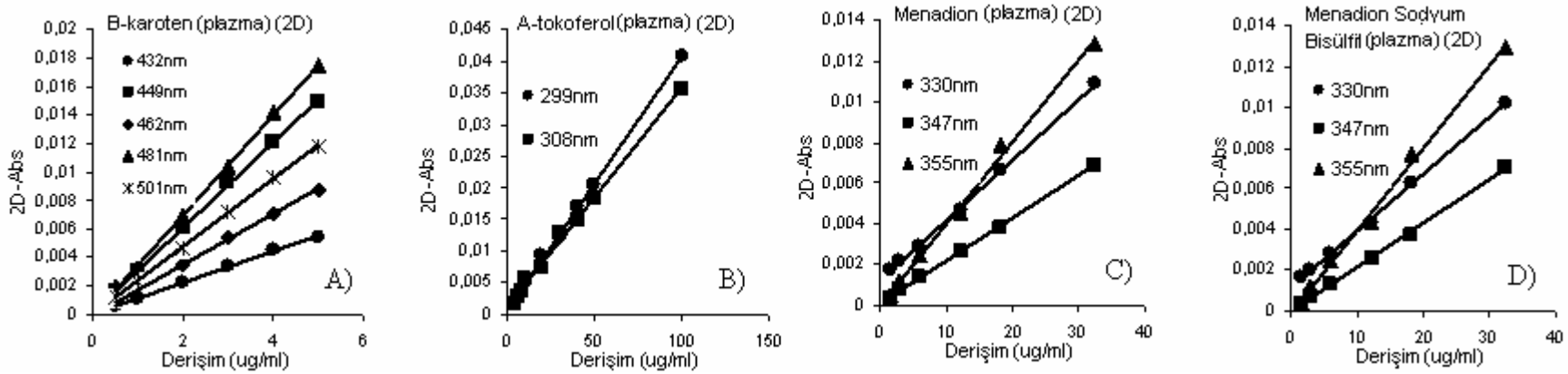

Şekil 4.18: 1D-Spektrofotometri yöntemi ile elde edilen standart çalışma çözeltilerin kalibrasyon eğrileri: A) β-K B) α-T C) MN D) MBS




Şekil 4.19: 2D-Spektrofotometri yöntemi ile elde edilen standart çalışma çözeltilerin kalibrasyon eğrileri: A) β-K B) α-T C) MN D) MBS




Şekil 4.20: 1D- Spektrofotometri yöntemiyle plazmadan ekstrakte edilen çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrileri: A) β-K B) α-T C) MN, D) MN'ye dönüştürülmüş MBS




Şekil 4.21: 2D-Spektrofotometri yöntemiyle plazmadan ekstrakte edilen çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrileri: A) β-K B) α-T C) MN D) MN'ye dönüştürülmüş MBS

Tablo 4.13: 1D-Spektrofotometri yöntemi ile β-K, α-T, MN ve MBS plazma çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri

| Etkin Madde | ÇA (µg/mL) | LR[a] | Sa | Sb | r |
|---|---|---|---|---|---|
| β-K | 0,5-5 | $1D_{439nm}$=0,2286x+0,0020 | 0,0100 | 0,0109 | 0,9996 |
| | 0,5-5 | $1D_{458nm}$=0,1513x+0,0045 | 0,0072 | 0,0065 | 0,9997 |
| | 0,5-5 | $1D_{493nm}$=0,4818x-0,0024 | 0,0206 | 0,0136 | 0,9998 |
| α-T | 4-100 | $1D_{280nm}$=0,0182x+0,0342 | 0,0001 | 0,0079 | 0,9981 |
| | 4-100 | $1D_{303nm}$=0,0305x+0,0813 | 0,0004 | 0,0101 | 0,9972 |
| MN | 1,525-32,5 | $1D_{350nm}$=0,0373x+0,0044 | 0,0005 | 0,0040 | 0,9992 |
| MBS | 1,525-32,5 | $1D_{350nm}$=0,0391x+0,0057 | 0,0001 | 0,0007 | 0,9995 |

ÇA: çalışma aralığı, [a]: 6 kalibasyon eğrisi, LR: lineer regresyon, Sa: regresyon eğrisindeki kaymanın standart sapması, Sb: regresyon eğrisindeki eğimin standart sapması, r: korelasyon katsayısı

Tablo 4.14: 2D-Spektrofotometri yöntemi ile β-K, α-T, MN ve MBS standart çalışma çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri

| Etkin Madde | ÇA (µg/mL) | LR[a] | Sa | Sb | r |
|---|---|---|---|---|---|
| β-K | 0,5-5 | $2D_{432nm}$=0,0017x+0,0002 | 8,37E-05 | 0,0002 | 0,9999 |
| | 0,5-5 | $2D_{449nm}$=0,0043x+0,0004 | 0,0005 | 0,0005 | 0,9995 |
| | 0,5-5 | $2D_{462nm}$=0,0031x+0,0004 | 0,0001 | 0,0001 | 0,9999 |
| | 0,5-5 | $2D_{481nm}$=0,0055x+0,0004 | 0,0006 | 0,0005 | 0,9995 |
| | 0,5-5 | $2D_{501nm}$=0,0037x+0,0002 | 0,0001 | 0,0001 | 0,9999 |
| α-T | 2-50 | $2D_{299nm}$=0,0005x+0,0004 | 6,32E-06 | 0,0002 | 0,9995 |
| | 2-50 | $2D_{308nm}$=0,0004x+0,0004 | 4,08E-05 | 0,0002 | 0,9996 |
| MN | 1-40 | $2D_{330nm}$=0,0003x+0,0039 | 1,0E-06 | 0,0001 | 0,9997 |
| | 0,5-40 | $2D_{347nm}$=0,0003x+0,0003 | 5,48E-05 | 5,16E-05 | 0,9997 |
| | 0,5-40 | $2D_{355nm}$=0,0005x+0,0002 | 1,0E-06 | 1,0E-06 | 0,9998 |
| MBS | 0,5-20 | $2D_{233nm}$=0,0120x+0,0008 | 0,00004 | 0,000417 | 0,9995 |
| | 0,5-20 | $2D_{241nm}$=0,0072x+0,0006 | 0,00004 | 0,000306 | 0,9998 |

ÇA: çalışma aralığı, [a]: 6 kalibasyon eğrisi, LR: lineer regresyon, Sa: regresyon eğrisindeki kaymanın standart sapması, Sb: regresyon eğrisindeki eğimin standart sapması, r: korelasyon katsayısı

Tablo 4.15: 2D-Spektrofotometre yöntemi ile β-K, α-T, MN ve MBS plazma çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri

| Etkin Madde | ÇA (μg/mL) | LR[a] | Sa | Sb | r |
|---|---|---|---|---|---|
| β-K | 0,5-5 | $2D_{432nm}$=0,0011x+6,0E-5 | 4,0E-05 | 9,6E-05 | 0,9995 |
| | 0,5-5 | $2D_{449nm}$=0,0030x+9,0E-5 | 0,0002 | 0,0002 | 0,9997 |
| | 0,5-5 | $2D_{462nm}$=0,0018x+5,0E-5 | 0,0001 | 0,0001 | 0,9996 |
| | 0,5-5 | $2D_{481nm}$=0,0035x+3,0E-5 | 0,0002 | 0,0002 | 0,9996 |
| | 0,5-5 | $2D_{501nm}$=0,0024x+4,0E-5 | 0,0001 | 9,8E-05 | 0,9998 |
| α-T | 4-100 | $2D_{299nm}$=0,0004x+0,0007 | 6,3E-06 | 0,0002 | 0,9995 |
| | 4-100 | $2D_{308nm}$=0,0003x+0,0011 | 0,0004 | 0,0010 | 0,9979 |
| MN | 1,525-32,5 | $2D_{330nm}$=0,0003x+0,0013 | 6,3E-06 | 1,0E-04 | 0,9995 |
| | 1,525-32,5 | $2D_{347nm}$=0,0002x+0,0001 | 6,3E-06 | 3,9E-05 | 0,9995 |
| | 1,525-32,5 | $2D_{330nm}$=0,0004x+7,0E-5 | 4,1E-06 | 1,1E-04 | 0,9976 |
| MBS | 1,525-32,5 | $2D_{330nm}$=0,0003x+0,0012 | 6,3E-06 | 5,4E-05 | 0,9995 |
| | 1,525-32,5 | $2D_{347nm}$=0,0002x+8,0E-6 | 7,5E-06 | 2,4E-05 | 0,9987 |
| | 1,525-32,5 | $2D_{330nm}$=0,0004x+9,0E-5 | 4,1E-06 | 5,4E-05 | 0,9977 |

ÇA: çalışma aralığı [a]: 6 kalibasyon eğrisi, LR: lineer regresyon, Sa: regresyon eğrisindeki kaymanın standart sapması, Sb: regresyon eğrisindeki eğimin standart sapması, r: korelasyon katsayısı

#### 4.2.3.1.3.Doğruluk/Kesinlik

β-K, α-T, MN ve MBS kalibrasyon eğrileri içine düşen üç farklı derişimde kalite kontrol çözeltilerinin ve plazmadan ekstraksiyon ile elde edilen plazma kalite kontrol çözeltilerinin güniçi (aynı yöntem ve aynı labaratuar şartlarında 1 günde 6 kez) ve günler arası (aynı yöntemle farklı 3 günde 6 kez) analizleri ile doğruluk ve kesinlik değerleri elde edildi. Analiz sonuçlarının ortalaması ve standart sapmaları belirlendi. Doğruluk bağıl hatayla ve kesinlikte bağıl standart sapma (% BSS) ile verildi 1D- ve 2D- spektofotometri yöntemleri ile elde edilen doğruluk ve kesinlik değerleri sırasıyla Tablo 4.16, 4.17, 4.18 ve 4.19'da verildi.

#### 4.2.3.1.4. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)

β-K, α-T, MN ve MBS'nin standart ve plazma çözeltileri ile elde edilen kalibrasyon eğrilerinin en küçük derişiminden daha küçük derişimlere inilerek bir seri standart çözeltileri hazırlandı ve altı kez absorbansları okundu. Okunan değerlerin bağıl

standart sapmaları (% BSS) belirlendi. Bağıl standart sapma değeri % 20'den küçük olan derişim gözlenebilme sınırı ve % 10'dan küçük olan derişim de tayin alt sınırı değeri olarak belirlendi.[192-194] 1D- ve 2D- Spektrofotometre yöntemlerinin gözlenebilme sınırı ve tayin alt sınırı değerleri sırasıyla Tablo 4.20, 4.21, 4.22 ve 4.23'de verildi.

Tablo 4.16: 1D- Spektrofotometri yöntemi ile β-K, α-T, MN ve MBS standart çözeltilerinin güniçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)

| Etkin Madde | Ortam | λ(nm) | Eklenen (μg/mL) | Güniçi | | | Günler Arası | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Ortalama±SS (μg/mL) | Doğruluk | % BSS | Ortalama±SS (μg/mL) | Doğruluk | % BSS |
| β-K | Etanol | $1D_{439nm}$ | 0,750 | 0,734±0,016 | -2,133 | 2,179 | 0,738±0,027 | -1,600 | 3,658 |
| | | | 2,500 | 2,676±0,077 | 7,040 | 2,877 | 2,676±0,137 | 7,040 | 5,119 |
| | | | 4,000 | 4,135±0,081 | 3,375 | 1,958 | 4,086±0,086 | 2,150 | 2,104 |
| | | $1D_{460nm}$ | 0,750 | 0,755±0,031 | 0,666 | 4,105 | 0,740±0,034 | -1,000 | 4,594 |
| | | | 2,500 | 2,656±0,045 | 6,240 | 1,694 | 2,617±0,089 | 4,680 | 3,400 |
| | | | 4,000 | 4,131±0,071 | 3,275 | 1,718 | 4,070±0,110 | 1,750 | 2,702 |
| | | $1D_{474nm}$ | 0,750 | 0,784±0,051 | 4,533 | 1,694 | 0,664±0,113 | 11,46 | 17,01 |
| | | | 2,500 | 2,897±0,142 | 15,88 | 1,718 | 2,597±0,223 | 3,880 | 8,586 |
| | | | 4,000 | 3,911±0,128 | -2,225 | 1,694 | 3,911±0,093 | -2,225 | 2,377 |
| | | $1D_{496nm}$ | 0,750 | 0,750±0,015 | 0,040 | 1,694 | 0,733±0,021 | -2,266 | 2,864 |
| | | | 2,500 | 2,654±0,027 | 6,160 | 1,718 | 2,619±0,084 | 4,760 | 3,207 |
| | | | 4,000 | 4,124±0,071 | 3,100 | 1,694 | 4,061±0,103 | 1,525 | 2,536 |
| α-T | Etanol | $1D_{279nm}$ | 3,000 | 3,022±0,089 | 0,733 | 2,945 | 3,048±0,153 | 1,600 | 5,019 |
| | | | 10,00 | 10,05±0,182 | 0,500 | 1,810 | 10,14±0,308 | 1,400 | 3,037 |
| | | | 40,00 | 39,01±0,262 | -2,475 | 0,671 | 40,07±0,640 | 0,175 | 1,597 |
| | | $1D_{303nm}$ | 3,000 | 3,079±0,163 | 2,633 | 5,293 | 3,036±0,199 | 1,200 | 6,554 |
| | | | 10,00 | 10,20±0,035 | 2,000 | 0,343 | 9,849±0,414 | -1,510 | 4,203 |
| | | | 40,00 | 39,65±0,055 | -0,875 | 0,139 | 40,16±2,034 | 0,400 | 5,064 |
| MN | Hekzan | $1D_{350nm}$ | 1,000 | 0,974±0,012 | -2,558 | 1,004 | 0,896±0,063 | -10,31 | 7,177 |
| | | | 5,000 | 4,997±0,028 | -0,046 | 0,538 | 4,889±0,116 | -2,217 | 2,242 |
| | | | 30,00 | 29,48±0,072 | -1,739 | 0,244 | 29,10±0,225 | -2,979 | 0,767 |
| MBS | 0,01M HCl | $1D_{224nm}$ | 0,750 | 0,818±0,012 | 1,474 | 8,877 | 0,809±0,020 | 2,537 | 7,981 |
| | | | 5,000 | 4,771±0,016 | 3,426 | -4,574 | 4,671±0,232 | 4,983 | -6,569 |
| | | | 15,00 | 14,16±0,315 | 2,230 | -5,570 | 14,56±0,714 | 4,905 | -2,930 |
| | | $1D_{236nm}$ | 0,750 | 0,719±0,031 | 4,379 | -4,021 | 0,722±0,048 | 6,648 | -3,688 |
| | | | 5,000 | 4,908±0,104 | 2,124 | -1,829 | 4,835±0,178 | 3,684 | -3,290 |
| | | | 15,00 | 14,90±0,241 | 1,662 | -0,616 | 14,97±0,324 | 2,168 | -0,162 |

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

Tablo 4.17: 1D- Spektrofotometri yöntemi ile β-K, α-T, MN ve MBS plazma çözeltilerinin güniçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)

| Etkin Madde | λ(nm) | Eklenen (μg/mL) | Güniçi | | | Günler Arası | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Ortalama±SS (μg/mL) | Doğruluk | % BSS | Ortalama±SS (μg/mL) | Doğruluk | % BSS |
| β-K | $1D_{439nm}$ | 0,750 | 0,787±0,015 | 4,987 | 1,859 | 0,797±0,029 | 6,251 | 3,697 |
| | | 2,500 | 2,479±0,026 | -0,846 | 1,051 | 2,512±0,091 | 0,467 | 3,622 |
| | | 4,000 | 4,022±0,087 | 0,558 | 2,152 | 4,113±0,239 | 2,836 | 5,809 |
| | $1D_{458\ nm}$ | 0,750 | 0,771±0,012 | 2,813 | 1,573 | 0,779±0,057 | 3,841 | 7,294 |
| | | 2,500 | 2,475±0,019 | -0,991 | 0,755 | 2,519±0,120 | 0,771 | 4,753 |
| | | 4,000 | 4,033±0,075 | 0,821 | 1,868 | 4,101±0,278 | 2,528 | 6,788 |
| | $1D_{493\ nm}$ | 0,750 | 0,792±0,013 | 5,549 | 1,658 | 0,815±0,031 | 8,685 | 3,810 |
| | | 2,500 | 2,476±0,030 | -0,977 | 1,201 | 2,516±0,100 | 0,628 | 3,983 |
| | | 4,000 | 4,015±0,111 | 0,374 | 2,774 | 4,125±0,242 | 3,115 | 5,874 |
| α-T | $1D_{279\ nm}$ | 6,000 | 5,429±0,265 | -9,524 | 4,875 | 5,612±0,573 | -6,471 | 10,20 |
| | | 20,00 | 19,14±1,773 | -4,313 | 9,266 | 18,84±1,632 | -5,778 | 8,658 |
| | | 40,00 | 40,33±2,917 | 0,842 | 7,231 | 41,42±1,608 | 3,567 | 3,883 |
| | $1D_{303\ nm}$ | 6,000 | 5,568±0,333 | -7,195 | 5,975 | 5,344±0,299 | -10,93 | 5,596 |
| | | 20,00 | 21,89±0,970 | 9,481 | 4,429 | 20,91±0,992 | 4,563 | 4,742 |
| | | 40,00 | 40,34±1,638 | 0,861 | 4,060 | 40,17±1,628 | 0,437 | 4,052 |
| MN | $1D_{350\ nm}$ | 1,525 | 1,495±0,020 | -1,962 | 1,350 | 1,500±0,032 | -1,669 | 2,165 |
| | | 6,100 | 6,535±0,143 | 7,136 | 2,193 | 6,589±0,164 | 8,015 | 2,487 |
| | | 18,30 | 18,10±0,022 | -1,073 | 0,121 | 18,27±0,193 | -0,121 | 1,055 |
| MBS | $1D_{350\ nm}$ | 1,525 | 1,436±0,038 | -5,860 | 2,622 | 1,389±0,036 | -8,935 | 2,604 |
| | | 6,100 | 5,890±0,040 | -3,442 | 0,673 | 5,945±0,192 | -2,534 | 3,224 |
| | | 18,30 | 17,86±0,205 | -2,361 | 1,147 | 17,66±0,254 | -3,526 | 1,440 |

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

Tablo 4.18: 2D-Spektrofotometri yöntemi ile β-K, α-T, MN ve MBS'nin standart çözeltilerinin güniçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)

| Etkin Madde | Ortam | λ(nm) | Eklenen (µg/mL) | Güniçi | | | Günler Arası | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Ortalama±SS (µg/mL) | Doğruluk | % BSS | Ortalama±SS (µg/mL) | Doğruluk | % BSS |
| β-K | Etanol | $2D_{433nm}$ | 0,750 | 0,799±0,019 | 6,586 | 2,430 | 0,780±0,080 | 3,960 | 10,28 |
| | | | 2,500 | 2,648±0,104 | 5,915 | 3,935 | 2,655±0,210 | 6,218 | 7,908 |
| | | | 4,000 | 4,215±0,156 | 5,364 | 3,695 | 4,083±0,152 | 2,068 | 3,726 |
| | | $2D_{451nm}$ | 0,750 | 0,761±0,012 | 1,466 | 1,576 | 0,753±0,021 | 0,400 | 2,788 |
| | | | 2,500 | 2,688±0,059 | 7,520 | 2,194 | 2,729±0,104 | 9,160 | 3,810 |
| | | | 4,000 | 4,255±0,050 | 5,625 | 1,175 | 4,130±0,124 | 3,250 | 3,002 |
| | | $2D_{467nm}$ | 0,750 | 0,656±0,351 | 12,53 | 53,50 | 0,634±0,342 | -15,46 | 53,94 |
| | | | 2,500 | 2,247±1,127 | -10,12 | 50,15 | 2,251±1,129 | -9,960 | 50,15 |
| | | | 4,000 | 3,477±1,726 | 13,07 | 49,64 | 3,843±1,935 | -3,925 | 50,35 |
| | | $2D_{484nm}$ | 0,750 | 0,745±0,024 | -0,666 | 3,221 | 0,720±0,039 | 4,000 | 5,416 |
| | | | 2,500 | 2,658±0,102 | 6,320 | 3,837 | 2,687±0,109 | 7,480 | 4,056 |
| | | | 4,000 | 4,053±0,036 | 1,325 | 0,888 | 4,001±0,188 | 0,025 | 4,698 |
| | | $2D_{505nm}$ | 0,750 | 0,771±0,013 | 2,800 | 1,686 | 0,757±0,015 | 0,933 | 1,981 |
| | | | 2,500 | 2,625±0,038 | 5,000 | 1,447 | 2,584±0,066 | 3,360 | 2,554 |
| | | | 4,000 | 4,107±0,184 | 2,675 | 4,480 | 4,233±0,415 | 5,825 | 9,803 |
| α-T | Etanol | $2D_{299nm}$ | 3,000 | 2,767±0,234 | -7,778 | 8,451 | 2,883±0,223 | -3,889 | 7,729 |
| | | | 10,00 | 10,17±0,625 | 1,667 | 6,148 | 10,16±0,650 | 1,667 | 6,395 |
| | | | 40,00 | 38,43±1,627 | -3,917 | 4,233 | 40,40±2,517 | 1,000 | 6,231 |
| | | $2D_{308nm}$ | 3,000 | 2,904±0,102 | -3,194 | 3,504 | 2,838±0,237 | -5,417 | 8,354 |
| | | | 10,00 | 10,63±0,494 | 6,250 | 4,647 | 9,833±0,665 | -1,667 | 6,758 |
| | | | 40,00 | 40,88±0,737 | 2,188 | 1,804 | 40,13±2,042 | 0,312 | 5,088 |
| MN | Hekzan | $2D_{330nm}$ | 1,000 | 1,050±0,075 | 5,000 | 7,142 | 0,955±0,091 | -4,444 | 9,528 |
| | | | 5,000 | 5,333±0,298 | 6,666 | 5,587 | 4,888±0,407 | -2,222 | 8,326 |
| | | | 30,00 | 29,77±1,360 | -0,740 | 4,560 | 30,33±2,981 | 1,111 | 9,828 |
| | | $2D_{347nm}$ | 1,000 | 0,877±0,074 | -12,27 | 8,430 | 0,868±0,047 | -13,19 | 5,414 |
| | | | 5,000 | 4,333±0,289 | -13,33 | 6,660 | 4,500±0,360 | -10,00 | 8,000 |
| | | | 30,00 | 27,16±1,531 | -9,444 | 5,636 | 26,50±1,615 | -11,66 | 6,094 |
| | | $2D_{355nm}$ | 1,000 | 0,973±0,068 | -2,666 | 6,988 | 1,003±0,073 | 0,333 | 7,278 |
| | | | 5,000 | 4,866±0,163 | -2,666 | 3,349 | 5,040±0,273 | 0,800 | 5,416 |
| | | | 30,00 | 28,93±0,602 | -3,555 | 2,080 | 29,46±1,360 | -1,777 | 4,616 |
| MBS | 0,01M HCl | $2D_{233nm}$ | 0,750 | 0,763±0,046 | 1,851 | 6,041 | 0,681±0,043 | -9,259 | 6,275 |
| | | | 5,000 | 4,877±0,068 | -2,444 | 1,394 | 4,933±0,283 | -1,333 | 5,753 |
| | | | 15,00 | 14,53±0,300 | -3,129 | 2,065 | 15,32±0,510 | 2,132 | 3,332 |
| | | $2D_{241nm}$ | 0,750 | 0,761±0,045 | 1,543 | 5,928 | 0,759±0,056 | 1,324 | 7,467 |
| | | | 5,000 | 4,731±0,113 | -5,370 | 2,396 | 4,754±0,376 | -4,907 | 7,928 |
| | | | 15,00 | 14,84±0,380 | -1,018 | 2,561 | 15,26±0,845 | 1,759 | 5,542 |

λ: Dalga boyu, SS :standart sapma (n=6), doğruluk: (bulunan-eklenen)/eklenenx100, % BSS: Bağıl standart sapma (SS/ortalamax100)

Tablo 4.19: 2D-Spektrofotometri yöntemi ile β-K, α-T, MN ve MBS'nin plazma çözeltilerinin güniçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)

| Etkin Madde | λ(nm) | Eklenen (μg/mL) | Güniçi | | | Günler Arası | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Ortalama±SS (μg/mL) | Doğruluk | % BSS | Ortalama±SS (μg/mL) | Doğruluk | % BSS |
| β-K | $2D_{432nm}$ | 0,750 | 0,753±0,019 | 0,404 | 2,580 | 0,706±0,057 | -5,859 | 8,048 |
| | | 2,500 | 2,464±0,086 | -1,455 | 3,501 | 2,511±0,057 | 0,424 | 2,272 |
| | | 4,000 | 4,088±0,205 | 2,197 | 5,006 | 4,047±0,225 | 1,174 | 5,556 |
| | $2D_{449nm}$ | 0,750 | 0,768±0,050 | 2,370 | 6,536 | 0,789±0,040 | 5,185 | 5,061 |
| | | 2,500 | 2,503±0,079 | 0,133 | 3,151 | 2,448±0,158 | -2,089 | 6,469 |
| | | 4,000 | 4,076±0,102 | 1,889 | 2,503 | 4,087±0,235 | 2,167 | 5,762 |
| | $2D_{462nm}$ | 0,750 | 0,733±0,017 | -2,222 | 2,347 | 0,786±0,060 | 4,815 | 7,674 |
| | | 2,500 | 2,396±0,026 | -4,148 | 1,104 | 2,465±0,093 | -1,407 | 3,776 |
| | | 4,000 | 4,021±0,051 | 0,532 | 1,258 | 4,038±0,264 | 0,949 | 6,528 |
| | $2D_{481nm}$ | 0,750 | 0,793±0,038 | 5,714 | 4,801 | 0,796±0,036 | 6,159 | 4,577 |
| | | 2,500 | 2,476±0,066 | -0,952 | 2,673 | 2,410±0,192 | -3,619 | 7,987 |
| | | 4,000 | 4,105±0,098 | 2,619 | 2,388 | 4,138±0,272 | 3,452 | 6,574 |
| | $2D_{501nm}$ | 0,750 | 0,749±0,025 | -0,093 | 3,344 | 0,783±0,035 | 4,444 | 4,450 |
| | | 2,500 | 2,378±0,027 | -4,861 | 1,148 | 2,436±0,091 | -2,556 | 3,726 |
| | | 4,000 | 3,985±0,077 | -0,365 | 1,931 | 3,996±0,212 | -0,104 | 5,305 |
| α-T | $2D_{299nm}$ | 6,000 | 5,500±0,418 | -8,333 | 7,606 | 5,708±0,292 | -4,861 | 5,120 |
| | | 20,00 | 21,58±0,645 | 7,917 | 2,991 | 20,71±0,872 | 3,542 | 4,211 |
| | | 40,00 | 40,75±0,791 | 1,875 | 1,940 | 39,63±1,349 | -0,938 | 3,403 |
| | $2D_{308nm}$ | 6,000 | 6,056±0,328 | 0,926 | 5,412 | 6,222±0,455 | 3,704 | 7,319 |
| | | 20,00 | 21,22±0,886 | 6,111 | 4,175 | 20,44±1,026 | 2,222 | 5,017 |
| | | 40,00 | 41,56±2,778 | 3,889 | 6,686 | 41,28±2,294 | 3,194 | 5,558 |
| MN | $2D_{330nm}$ | 1,525 | 1,622±0,124 | 6,375 | 7,652 | 1,528±0,139 | 0,182 | 9,092 |
| | | 6,100 | 5,889±0,404 | -3,461 | 6,855 | 5,667±0,365 | -7,104 | 6,444 |
| | | 18,30 | 17,72±0,443 | -3,157 | 2,500 | 17,72±0,976 | -3,157 | 5,505 |
| | $2D_{347nm}$ | 1,525 | 1,492±0,038 | -2,186 | 2,523 | 1,575±0,104 | 3,279 | 6,583 |
| | | 6,100 | 6,492±0,020 | 6,421 | 0,314 | 6,342±0,332 | 3,962 | 5,240 |
| | | 18,30 | 18,43±0,232 | 0,729 | 1,257 | 18,52±0,260 | 1,230 | 1,405 |
| | $2D_{355nm}$ | 1,525 | 1,400±0,052 | -8,197 | 3,746 | 1,425±0,082 | -6,557 | 5,766 |
| | | 6,100 | 6,438±0,169 | 5,533 | 2,620 | 6,096±0,418 | -0,068 | 6,860 |
| | | 18,30 | 19,13±0,534 | 4,554 | 2,792 | 18,26±0,701 | -0,228 | 3,840 |
| MBS | $2D_{330nm}$ | 1,525 | 1,556±0,107 | 2,004 | 6,866 | 1,650±0,124 | 8,197 | 7,532 |
| | | 6,100 | 5,556±0,272 | -8,925 | 4,899 | 5,722±0,328 | -6,193 | 5,727 |
| | | 18,30 | 17,11±0,502 | -6,497 | 2,933 | 18,22±1,205 | -0,425 | 6,612 |
| | $2D_{347nm}$ | 1,525 | 1,508±0,080 | -1,093 | 5,311 | 1,508±0,074 | -1,093 | 4,879 |
| | | 6,100 | 6,358±0,222 | 4,235 | 3,496 | 6,150±0,207 | 0,820 | 3,372 |
| | | 18,30 | 18,24±0,371 | -0,319 | 2,032 | 18,32±0,645 | 0,091 | 3,524 |
| | $2D_{355nm}$ | 1,525 | 1,417±0,056 | -7,104 | 3,972 | 1,408±0,061 | -7,650 | 4,300 |
| | | 6,100 | 6,367±0,131 | 4,372 | 2,058 | 6,363±0,167 | 4,303 | 2,627 |
| | | 18,30 | 19,56±0,719 | 6,876 | 3,675 | 19,57±0,633 | 6,944 | 3,235 |

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

Tablo 4.20: 1D-Spektrofotometri yöntemi ile β-K, α-T, MN ve MBS standart çözeltilerinin gözlenebilme sınırı ve tayin alt sınırı

| Etkin Madde | Ortam | Dalga Boyu (nm) | Duyarlılık Limiti | |
|---|---|---|---|---|
| | | | Gözlenebilme Sınırı (LOD, µg/mL) | Tayin Alt Sınırı (LOQ, µg/mL) |
| β-K | Etanol | $1D_{439nm}$ | 0,030 | 0,050 |
| | | $1D_{460nm}$ | 0,030 | 0,050 |
| | | $1D_{496nm}$ | 0,030 | 0,050 |
| α-T | Etanol | $1D_{279nm}$ | 0,500 | 1,000 |
| | | $1D_{303nm}$ | 0,500 | 1,000 |
| MN | Hekzan | $1D_{350nm}$ | 0,200 | 0,300 |
| MBS | 0,01M HCl | $1D_{224nm}$ | 0,200 | 0,300 |
| | | $1D_{236nm}$ | 0,200 | 0,300 |

Tablo 4.21: 1D-Spektrofotometri yöntemi ile β-K, α-T, MN ve MN'ye dönüştürülen MBS plazma çözeltilerinin gözlenebilme sınırı ve tayin alt sınırı

| Etkin Madde | Dalga Boyu (nm) | Duyarlılık Limiti | |
|---|---|---|---|
| | | Gözlenebilme Sınırı (LOD, µg/mL) | Tayin Alt Sınırı (LOQ, µg/mL) |
| β-K | $1D_{439nm}$ | 0,050 | 0,075 |
| | $1D_{458nm}$ | 0,050 | 0,075 |
| | $1D_{493nm}$ | 0,050 | 0,075 |
| α-T | $1D_{279nm}$ | 2,000 | 4,000 |
| | $1D_{303nm}$ | 2,000 | 4,000 |
| MN | $1D_{350nm}$ | 0,915 | 1,525 |
| MBS | $1D_{350nm}$ | 0,915 | 1,525 |

Tablo 4.22: 2D-Spektrofotometre yöntemi ile β-K, α-T, MN ve MBS standart çözeltilerinin gözlenebilme sınırı ve tayin alt sınırı

| Etkin Madde | Dalga Boyu (nm) | Duyarlılık Limiti | |
|---|---|---|---|
| | | Gözlenebilme Sınırı (LOD, µg/mL) | Tayin Alt Sınırı (LOQ, µg/mL) |
| β-K | $2D_{433nm}$ | 0,040 | 0,050 |
| | $2D_{451nm}$ | 0,030 | 0,050 |
| | $2D_{484nm}$ | 0,030 | 0,050 |
| | $2D_{505nm}$ | 0,030 | 0,050 |
| α-T | $2D_{299nm}$ | 0,500 | 1,000 |
| | $2D_{308nm}$ | 0,500 | 1,000 |
| MN | $2D_{330nm}$ | 0,100 | 0,200 |
| | $2D_{347nm}$ | 0,100 | 0,200 |
| | $2D_{355nm}$ | 0,100 | 0,200 |
| MBS | $2D_{233nm}$ | 0,200 | 0,300 |
| | $2D_{241nm}$ | 0,200 | 0,300 |

Tablo 4.23: 2D-Spektrofotometre yöntemi ile β-K, α-T, MN ve MN'ye dönüştürülen MBS plazma çözeltilerinin gözlenebilme sınırı ve tayin alt sınırı

| Etkin Madde | Dalga Boyu (nm) | Duyarlılık Limiti | |
|---|---|---|---|
| | | Gözlenebilme Sınırı (LOD, μg/mL) | Tayin Alt Sınırı (LOQ, μg/mL) |
| β-K | $2D_{432nm}$ | 0,075 | 0,100 |
| | $2D_{449nm}$ | 0,050 | 0,075 |
| | $2D_{462nm}$ | 0,075 | 0,100 |
| | $2D_{481nm}$ | 0,050 | 0,075 |
| | $2D_{501nm}$ | 0,050 | 0,075 |
| α-T | $2D_{299nm}$ | 3,000 | 4,000 |
| | $2D_{308nm}$ | 3,000 | 4,000 |
| MN | $2D_{330nm}$ | 1,220 | 1,525 |
| | $2D_{347nm}$ | 1,220 | 1,525 |
| | $2D_{355nm}$ | 1,220 | 1,525 |
| MBS | $2D_{330nm}$ | 1,220 | 1,525 |
| | $2D_{347nm}$ | 1,220 | 1,525 |
| | $2D_{355nm}$ | 1,220 | 1,525 |

#### 4.2.3.1.5.Geri Kazanım

Farmasötik preparattan geri kazanım çalışmaları standart ekleme yöntemi ile yapıldı. Hekzanda çözülüp etanol ile seyreltilen Carovit® yumuşak kapsülden (20 mg β-K / kapsül) ve etanolde çözülen Evicap® yumuşak kapsülden (200 IU α-T / kapsül) sırasıyla 2 ve 10 μg/mL derişimlerde; MBS etkin maddesine sahip olan Libavit K® ampul (20 mg MBS / 2mL) preparatı 0,01 M HCl'de çözülerek 5 μg/mL (MBS analizinde) ve 10 μg/mL (MBS'nin MN'ye dönüştürülmesinde) derişimlerde ilaç çözeltileri hazırlanarak UV-Görünür Bölge spektrumları alınarak absorbansları okundu. Sonra bu çözeltiler üzerine β-K, α-T, MN ve MBS'nin 3 farklı derişimde hazırlanan standart çözeltileri eklendi ve tekrar 1D- ve 2D- absorbansları üç kez okundu. Belirlenen 1D ve 2D-absorbansı değerleri aynı derişimdeki standart çözeltilerinin 1D- ve 2D- absorbansı değerleriyle kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.24 ve 4.25'de verildi.

Plazmadan geri kazanım çalışmasında, β-K, α-T, MN ve MBS'nin üç farklı derişimdeki kalite kontrol çözeltileri plazmaya eklendi. Karıştırıldı ve sırasıyla Bölüm 3.4'de verilen ekstraksiyon işlemleri ile ekstraksiyonları yapıldı. Ekstraksiyon sonrasında elde edilen çözeltilerin güniçi ve günler arası yapılan analizlerinde okunan 1D- ve 2D- absorbans değerleri standart çözeltilerden elde edilen 1D- ve 2D- absorbans değerleri ile kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak sırasıyla Tablo 4.26 ve 4.27'de verildi.

Tablo 4.24: Farmasötik preparatlara katım yapılan çözeltilerin 1D-Spektrofotometri yöntemiyle elde edilen güniçi ve günler arası geri kazanım değerleri (n=6)

| Ticari Preparat | λ (nm) | Eklenen (μg/mL) | Ortalama±SS (μg/mL) | Geri Kazanım | % BSS |
|---|---|---|---|---|---|
| Carovit® 2μg/mL | $1D_{439nm}$ | 0,750 | 0,672±0,051 | 89,60 | 7,587 |
| | | 2,500 | 2,364±0,081 | 94,56 | 3,425 |
| | | 4,000 | 3,791±0,077 | 94,78 | 2,045 |
| | $1D_{460nm}$ | 0,750 | 0,656±0,067 | 87,44 | 10,28 |
| | | 2,500 | 2,435±0,050 | 97,40 | 2,076 |
| | | 4,000 | 3,923±0,083 | 98,02 | 2,129 |
| | $1D_{496nm}$ | 0,750 | 0,679±0,028 | 90,63 | 4,258 |
| | | 2,500 | 2,487±0,052 | 99,49 | 2,117 |
| | | 4,000 | 4,013±0,043 | 100,3 | 1,085 |
| Evicap® 10μg/mL | $1D_{279nm}$ | 3,000 | 2,940±0,280 | 98,02 | 9,534 |
| | | 10,00 | 9,862±0,639 | 98,62 | 6,480 |
| | | 40,00 | 39,51±1,441 | 98,77 | 3,648 |
| | $1D_{303nm}$ | 3,000 | 2,915±0,194 | 97,17 | 6,489 |
| | | 10,00 | 9,798±0,435 | 97,98 | 4,449 |
| | | 40,00 | 39,98±1,677 | 99,96 | 4,194 |
| Libavit K® 5μg/mL | $1D_{224nm}$ | 0,750[a] | 0,734±0,049 | 97,98 | 6,761 |
| | | 5,000[a] | 4,725±0,230 | 94,51 | 4,871 |
| | | 15,00[a] | 15,13±0,472 | 100,8 | 3,119 |
| | $1D_{236nm}$ | 0,750[a] | 0,776±0,032 | 103,5 | 4,154 |
| | | 5,000[a] | 4,942±0,123 | 98,84 | 2,497 |
| | | 15,00[a] | 14,54±0,561 | 96,98 | 3,859 |
| Libavit K® 6,1[c]μg/mL | $1D_{350nm}$ | 1,000[b] | 0,975±0,045 | 95,52 | 4,628 |
| | | 5,100[b] | 4,979±0,191 | 99,58 | 3,851 |
| | | 30,00[b] | 29,14±0,867 | 97,15 | 2,977 |

[a]:MBS standart çözeltisi, [b]:MN standart çözeltisi, [c]: 10 μg/mL MBS'nin MN'ye eşdeğer derişimi, SS: standart sapma (n=6), doğruluk: (bulunan-eklenen)/eklenenx100, % BSS: bağıl standart sapma (SS/ortalamax100)

Tablo 4.25: Farmasötik preparatlara katım yapılan çözeltilerin 2D- Spektrofotometri yöntemiyle elde edilen güniçi ve günler arası geri kazanım değerleri (n=6)

| Ticari Preparat | λ (nm) | Eklenen (μg/mL) | Ortalama±SS (μg/mL) | Geri Kazanım | % BSS |
|---|---|---|---|---|---|
| Carovit® 2μg/mL | $2D_{433nm}$ | 0,750 | 0,699±0,025 | 94,51 | 4,401 |
| | | 2,500 | 2,127±0,200 | 85,11 | 9,435 |
| | | 4,000 | 3,566±0,155 | 89,17 | 4,355 |
| | $2D_{451nm}$ | 0,750 | 3,895±0,119 | 97,39 | 3,071 |
| | | 2,500 | 2,437±0,139 | 97,50 | 5,733 |
| | | 4,000 | 3,895±0,119 | 97,39 | 3,071 |
| | $2D_{467nm}$ | 0,750 | 0,631±0,046 | 84,13 | 7,30 |
| | | 2,500 | 2,174±0,172 | 86,98 | 7,915 |
| | | 4,000 | 3,611±0,189 | 90,27 | 5,236 |
| | $2D_{484nm}$ | 0,750 | 0,655±0,035 | 87,33 | 5,679 |
| | | 2,500 | 2,244±0,098 | 89,75 | 4,401 |
| | | 4,000 | 3,735±0,116 | 93,39 | 3,128 |
| | $2D_{505nm}$ | 0,750 | 0,693±0,099 | 92,41 | 14,41 |
| | | 2,500 | 2,509±0,056 | 100,3 | 2,244 |
| | | 4,000 | 4,055±0,126 | 101,3 | 3,124 |
| Evicap® 10μg/mL | $2D_{299nm}$ | 3,000 | 2,840±0,243 | 94,66 | 8,121 |
| | | 10,00 | 9,533±0,588 | 95,33 | 6,176 |
| | | 40,00 | 39,33±2,272 | 98,33 | 5,776 |
| | $2D_{308nm}$ | 3,000 | 2,941±0,221 | 98,05 | 7,391 |
| | | 10,00 | 9,958±0,579 | 99,58 | 5,815 |
| | | 40,00 | 40,87±1,848 | 102,1 | 4,523 |
| Libavit K® 5μg/mL | $2D_{233nm}$ | 0,750[a] | 0,742±0,033 | 99,02 | 4,461 |
| | | 5,000[a] | 4,938±0,264 | 98,77 | 5,358 |
| | | 15,00[a] | 14,63±0,885 | 97,54 | 6,054 |
| | $2D_{241nm}$ | 0,750[a] | 0,745±0,025 | 99,38 | 3,469 |
| | | 5,000[a] | 5,046±0,104 | 100,9 | 2,071 |
| | | 15,00[a] | 14,66±0,625 | 97,77 | 4,266 |
| Libavit K® 6,1[c]μg/mL | $2D_{330nm}$ | 1,000[b] | 0,983±0,093 | 98,33 | 9,527 |
| | | 5,100[b] | 4,988±0,172 | 99,77 | 3,450 |
| | | 30,00[b] | 29,28±1,218 | 97,62 | 4,161 |
| | $2D_{347nm}$ | 1,000[b] | 0,976±0,072 | 97,66 | 7,414 |
| | | 5,100[b] | 4,844±0,251 | 96,88 | 5,179 |
| | | 30,00[b] | 29,45±1,186 | 98,18 | 4,027 |
| | $2D_{355nm}$ | 1,000[b] | 0,980±0,056 | 98,00 | 5,772 |
| | | 5,100[b] | 4,833±0,242 | 96,66 | 5,011 |
| | | 30,00[b] | 29,26±1,280 | 97,55 | 4,373 |

[a]:MBS standart çözeltisi, [b]:MN standart çözeltisi, [c]: 10 μg/mL MBS'nin MN'ye eşdeğer derişimi, SS: standart sapma (n=6), doğruluk: (bulunan-eklenen)/eklenenx100, % BSS: bağıl standart sapma (SS/ortalamax100)

Tablo 4.26: Plazmaya katım yapılan çözeltilerin 1D-Spektrofotometri yöntemiyle elde edilen güniçi ve günler arası geri kazanım değerleri (n=6)

| Etkin Madde | λ(nm) | Eklenen (μg/mL) | Güniçi | | | Günler Arası | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Ortalama (μg/mL) | %Geri Kazanım | % BSS | Ortalama (μg/mL) | %Geri Kazanım | % BSS |
| β-K | $1D_{439nm}$ | 0,750 | 0,752 | 100,2 | 2,667 | 0,766 | 102,1 | 4,728 |
| | | 2,500 | 2,256 | 90,22 | 2,583 | 2,224 | 88,94 | 5,886 |
| | | 4,000 | 3,810 | 95,24 | 3,551 | 4,004 | 100,1 | 6,810 |
| | $1D_{458\ nm}$ | 0,750 | 0,709 | 94,52 | 3,961 | 0,731 | 97,46 | 10,95 |
| | | 2,500 | 2,224 | 88,96 | 2,108 | 2,300 | 91,98 | 7,940 |
| | | 4,000 | 3,741 | 93,52 | 1,933 | 3,866 | 96,66 | 9,071 |
| | $1D_{493\ nm}$ | 0,750 | 0,693 | 92,45 | 1,768 | 0,704 | 93,93 | 5,789 |
| | | 2,500 | 2,304 | 92,17 | 3,794 | 2,329 | 93,15 | 2,625 |
| | | 4,000 | 3,735 | 93,37 | 5,235 | 3,742 | 93,54 | 6,004 |
| α-T | $1D_{279\ nm}$ | 6,000 | 5,821 | 97,02 | 1,915 | 5,954 | 99,23 | 3,804 |
| | | 20,00 | 19,16 | 95,82 | 12,98 | 18,39 | 91,97 | 6,426 |
| | | 40,00 | 37,94 | 94,85 | 1,076 | 39,00 | 97,51 | 4,165 |
| | $1D_{303\ nm}$ | 6,000 | 6,120 | 102,0 | 6,616 | 6,036 | 100,6 | 7,373 |
| | | 20,00 | 19,94 | 99,69 | 3,951 | 18,896 | 94,48 | 5,323 |
| | | 40,00 | 37,32 | 93,29 | 6,555 | 37,15 | 92,88 | 5,735 |
| MN | $1D_{350\ nm}$ | 1,525 | 1,501 | 98,40 | 2,101 | 1,469 | 96,32 | 2,990 |
| | | 6,100 | 5,918 | 97,02 | 3,213 | 5,844 | 95,80 | 2,668 |
| | | 18,30 | 16,53 | 90,32 | 0,446 | 16,75 | 91,56 | 1,643 |
| MBS | $1D_{350\ nm}$ | 1,525 | 1,542 | 101,1 | 1,967 | 1,496 | 98,13 | 3,194 |
| | | 6,100 | 5,630 | 92,30 | 3,994 | 5,683 | 93,17 | 5,662 |
| | | 18,30 | 17,13 | 93,60 | 1,212 | 16,93 | 92,50 | 1,711 |

λ: dalga boyu, % BSS: bağıl standart sapma (standart sapma/ortalamax100)

Tablo 4.27: Plazmaya katım yapılan çözeltilerin 2D-Spektrofotometri yöntemiyle elde edilen güniçi ve günler arası geri kazanım değerleri (n=6)

| Etkin Madde | λ(nm) | Eklenen (μg/mL) | Güniçi | | | Günler Arası | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Ortalama (μg/mL) | %Geri Kazanım | % BSS | Ortalama (μg/mL) | %Geri Kazanım | % BSS |
| β-K | $2D_{432nm}$ | 0,750 | 0,698 | 93,10 | 4,531 | 0,711 | 94,85 | 4,989 |
| | | 2,500 | 2,373 | 94,91 | 4,753 | 2,423 | 96,93 | 9,920 |
| | | 4,000 | 3,930 | 98,26 | 6,980 | 4,008 | 100,2 | 2,645 |
| | $2D_{449\ nm}$ | 0,750 | 0,682 | 90,91 | 7,527 | 0,707 | 94,28 | 6,343 |
| | | 2,500 | 2,160 | 86,39 | 3,498 | 2,080 | 83,20 | 5,050 |
| | | 4,000 | 3,566 | 89,16 | 3,063 | 3,690 | 92,24 | 8,488 |
| | $2D_{481\ nm}$ | 0,750 | 0,632 | 84,26 | 6,376 | 0,656 | 87,47 | 8,421 |
| | | 2,500 | 2,008 | 80,30 | 3,740 | 1,930 | 77,19 | 5,527 |
| | | 4,000 | 3,409 | 85,23 | 2,438 | 3,486 | 87,15 | 7,200 |
| | $2D_{501\ nm}$ | 0,750 | 0,627 | 83,60 | 5,093 | 0,630 | 83,97 | 4,140 |
| | | 2,500 | 2,018 | 80,70 | 1,511 | 1,943 | 77,70 | 5,587 |
| | | 4,000 | 3,425 | 85,63 | 6,476 | 3,227 | 80,68 | 5,389 |
| α-T | $2D_{299\ nm}$ | 6,000 | 5,675 | 94,58 | 5,693 | 5,750 | 95,83 | 5,710 |
| | | 20,00 | 17,82 | 89,09 | 5,906 | 18,13 | 90,67 | 10,72 |
| | | 40,00 | 36,27 | 90,69 | 2,954 | 36,25 | 90,64 | 3,919 |
| | $2D_{308\ nm}$ | 6,000 | 5,402 | 90,04 | 6,872 | 5,521 | 92,02 | 6,734 |
| | | 20,00 | 18,25 | 91,26 | 3,123 | 17,46 | 87,31 | 5,330 |
| | | 40,00 | 34,66 | 86,65 | 5,213 | 34,97 | 87,44 | 6,255 |
| MN | $2D_{330\ nm}$ | 1,525 | 1,473 | 96,62 | 3,091 | 1,486 | 97,46 | 4,901 |
| | | 6,100 | 6,005 | 98,45 | 4,087 | 6,078 | 99,64 | 4,940 |
| | | 18,30 | 18,03 | 98,51 | 5,948 | 17,26 | 94,32 | 6,070 |
| | $2D_{347nm}$ | 1,525 | 1,410 | 92,43 | 4,252 | 1,480 | 97,02 | 7,238 |
| | | 6,100 | 5,493 | 90,05 | 2,088 | 5,531 | 90,67 | 5,744 |
| | | 18,30 | 16,71 | 91,29 | 2,888 | 16,47 | 90,04 | 3,678 |
| | $2D_{355\ nm}$ | 1,525 | 1,502 | 98,50 | 5,430 | 1,505 | 98,68 | 6,299 |
| | | 6,100 | 5,996 | 98,30 | 4,129 | 5,983 | 98,09 | 2,885 |
| | | 18,30 | 17,60 | 96,17 | 2,543 | 17,05 | 93,18 | 2,617 |
| MBS | $2D_{330\ nm}$ | 1,525 | 1,374 | 90,12 | 2,487 | 1,432 | 93,91 | 3,124 |
| | | 6,100 | 5,998 | 98,33 | 2,836 | 5,908 | 96,86 | 4,268 |
| | | 18,30 | 17,25 | 94,28 | 6,026 | 17,38 | 94,99 | 5,989 |
| | $2D_{347nm}$ | 1,525 | 1,350 | 88,51 | 4,160 | 1,428 | 93,66 | 4,337 |
| | | 6,100 | 5,247 | 86,01 | 3,361 | 5,150 | 84,43 | 1,952 |
| | | 18,30 | 15,70 | 85,79 | 3,187 | 16,29 | 89,05 | 4,883 |
| | $2D_{355\ nm}$ | 1,525 | 1,461 | 95,78 | 4,968 | 1,461 | 95,78 | 4,968 |
| | | 6,100 | 5,880 | 96,39 | 3,348 | 5,880 | 96,39 | 3,348 |
| | | 18,30 | 17,22 | 94,12 | 3,386 | 17,22 | 94,12 | 3,386 |

λ: dalga boyu, % BSS: bağıl standart sapma (standart sapma/ortalamax100)

## 4.3. Kromatografik Yöntemler

### 4.3.1.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yöntemi

#### 4.3.1.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

2 mg/mL derişimde β-K ve retinol stok çözeltisi BHT (30 µg/mL) içeren kloroformda hazırlandı ve bu çözelti etanol ile seyreltilerek 0,5–10 µg/mL derişim aralığında standart çalışma çözeltileri hazırlandı. İç standart olarak β-K için trifenilfosfin retinol için $K_2$ vitamini (2 mg/mL derişimde stok çözeltileri) kullanıldı. final derişimleri 4 µg/mL olacak şekilde β-K ve retinol çözeltilerine eklendi

Plazma çalışmasında, standart β-K ve retinol çözeltileri plazmaya eklenip Bölüm 3.4.1.2'de verilen ekstraksiyon yöntemiyle ekstraksiyonu yapılarak 0,5–10 µg/mL (β-K için nihayi derişim 0,9–10,4 µg/mL, çünkü çalışılan boş plazma 0,4 µg/mL endojen β-K içermekte ve retinol için nihayi derişim 1,29–10,79 µg/mL, çünkü çalışılan boş plazma 0,79 µg/mL endojen retinol içermektedir) derişim aralığında plazma çözeltileri hazırlandı. İç standart olarak $K_2$ vitamini (2 mg/mL derişimde stok çözeltisi) kullanıldı. $K_2$ vitamini final derişimi 4 µg/mL olacak şekilde β-K ve retinol plazma çözeltilerine eklendi ve standart ve plazma çözeltileri için Tablo 3.5'de belirtilen dalga boylarında kromatogramları alındı.

2 mg/mL derişimdeki α-T'nin stok çözeltisi etanol ile seyreltilerek 0,5–20 µg/mL derişim aralığında standart çalışma çözeltileri hazırlandı. İç standart olarak $K_2$ vitamini (2 mg/mL derişimde stok çözeltisi) kullanıldı. Çalışmada $K_2$ vitamini final derişimi 10 µg/mL olacak şekilde α-T çözeltilerine eklendi.

Plazma çalışmasında, standart α-T plazmaya eklenip Bölüm 3.4.2.2.'de verilen ekstraksiyon yöntemiyle ekstraksiyonu yapılarak 0,5–20 µg/mL (nihayi derişim 4,87–24,37 µg/mL, çünkü çalışılan boş plazma 4,37 µg/mL endojen α-T içermektedir)

derişim aralığında plazma çözeltileri hazırlandı. İç standart olarak $K_2$ vitamini (2 mg/mL derişimde hazırlanan stok çözeltisi) kullanıldı. $K_2$ vitaminin final derişimi 10 µg/mL olacak şekilde α-T plazma çözeltilerine eklendi ve standart ve plazma çözeltileri için Tablo 3.6'da belirtilen dalga boylarında kromatogramları alındı.

2 mg/mL derişimde MN'nin stok çözeltisi hekzan ile seyreltilerek 0,5–20 µg/mL derişim aralığında standart çalışma çözeltileri hazırlandı. İç standart olarak $K_2$ vitamini (2 mg/mL derişimde stok çözeltisi) kullanıldı. Çalışmada, $K_2$ vitamini final derişimi 5 µg/mL olacak şekilde standart MN çözeltilerine eklendi.

Plazma çalışmasında, standart MN çözeltileri plazmaya eklenip Bölüm 3.4.3.2.'de verilen ekstraksiyon yöntemiyle ekstraksiyonu yapılarak 0,061–12,20 µg/mL (nihayi derişim 0,079–12,218 µg/mL, çünkü çalışılan boş plazma 18 ng/mL endojen MN içermektedir) derişim aralığında plazma çözeltileri hazırlandı. İç standart olarak $K_2$ vitamini (2 mg/mL derişimde stok çözeltisi) kullanıldı. Çalışmada $K_2$ vitamini final derişimi 2,5 µg/mL olacak şekilde MN plazma çözeltilerine eklendi ve standart ve plazma çözeltileri için Tablo 3.7'de belirtilen dalga boylarında kromatogramları alındı.

2 mg/mL derişimdeki MBS stok çözeltisi deiyonizesu ile seyreltilerek 0,5-20 µg/mL derişim aralığında standart çalışma çözeltileri hazırlandı. İç standart olarak diazepam (2 mg/mL derişimde stok çözeltisi) kullanıldı. Çalışmada diazepamın final derişimi 2,5 µg/mL olacak şekilde standart çözeltilere eklendi.

Plazma çalışmasında standart MBS çözeltileri plazmaya eklenip Bölüm 3.4.4.2.'de verilen yöntemle MBS, MN'ye dönüştürülüp ekstraksiyonu yapılarak 0,061–12,20 µg/mL (nihayi derişim 0,079–12,218 µg/mL, çünkü çalışılan boş plazma 18 ng/mL endojen MN içermektedir) derişim aralığında MN plazma çözeltileri hazırlandı. İç standart olarak $K_2$ vitamini (2 mg/mL derişimde stok çözeltisi) kullanıldı. Çalışmada $K_2$

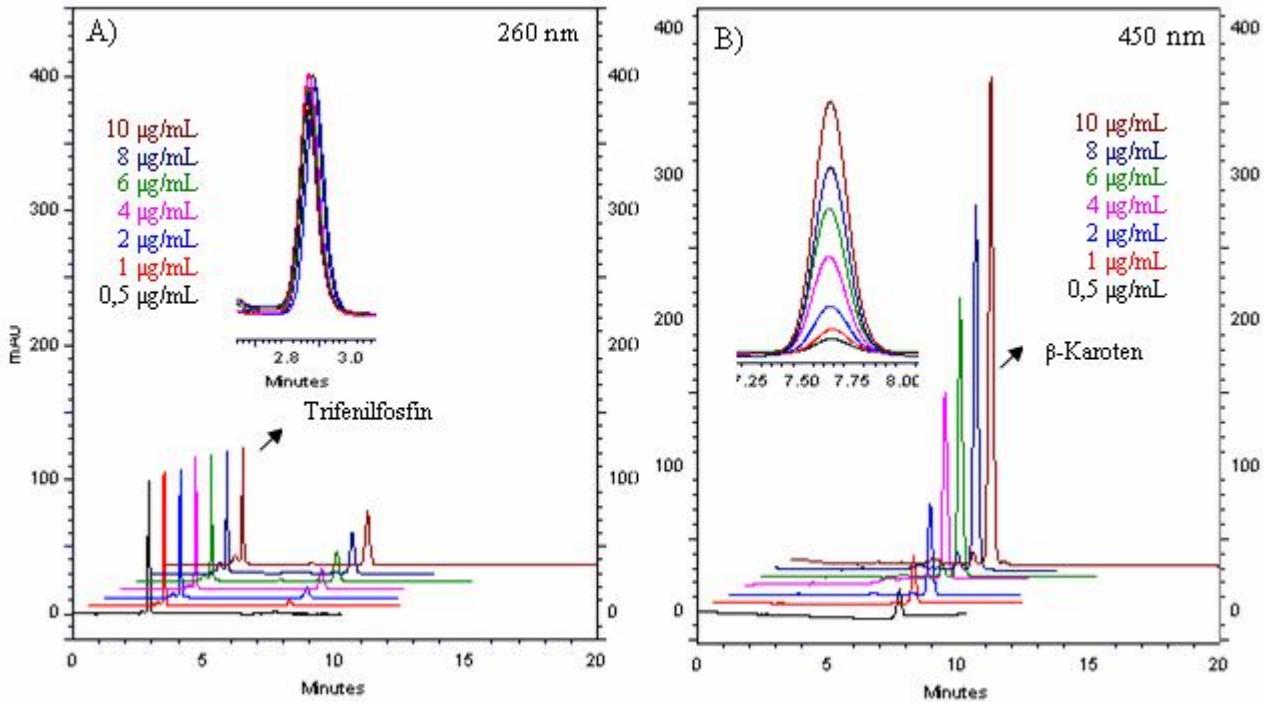
vitamini final derişimi 2,5 µg/mL olacak şekilde plazma çözeltilerine eklendi ve standart ve plazma çözeltileri için Tablo 3.8'de belirtilen dalga boylarında kromatogramları alındı.

#### 4.3.1.2. HPLC-DAD Yöntem Geçerlilik Testleri

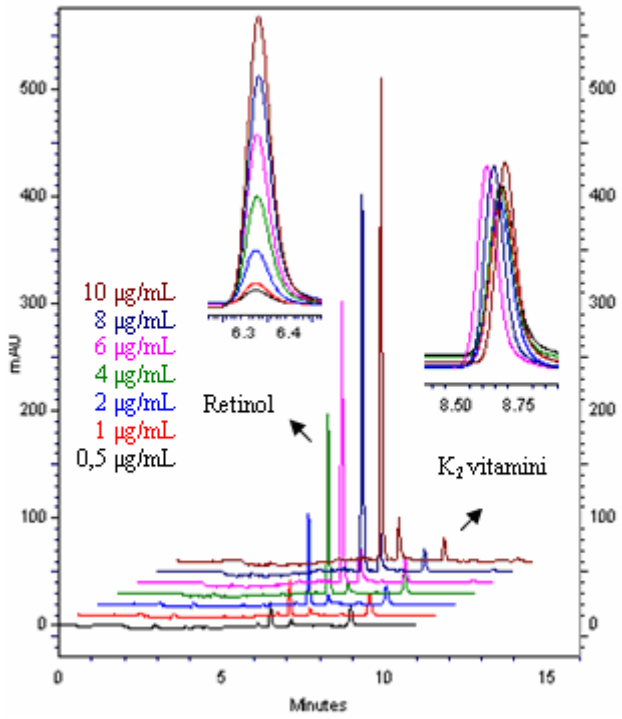
##### 4.3.1.2.1.Özgünlük (Belirleyicilik)

Standart çözeltiler ile edilen kromatogramların incelenmesinde bileşenlerin alıkonma zamanları, β-K'in 7,6 dak. ve iç standart olarak kullanılan trifenilfosfinin 2,9 dak. (Şekil 4.22), retinolün 6,4 dak. ve iç standart olarak kullanılan $K_2$ vitamininin 8,6 dak. (Şekil 4.23), α-T'nin 8,1 dak. ve iç standart olarak kullanılan $K_2$ vitamininin 7,1 dak. (Şekil 4.24) ve MN'nin 2,7 dak. ve iç standart olarak kullanılan $K_2$ vitamininin 8,05 dak. (Şekil 4.25), MBS'nin 2,2 dak. ve iç standart olarak kullanılan $K_2$ vitamininin 9,3 dak. (Şekil 4.26) olarak belirlendi.

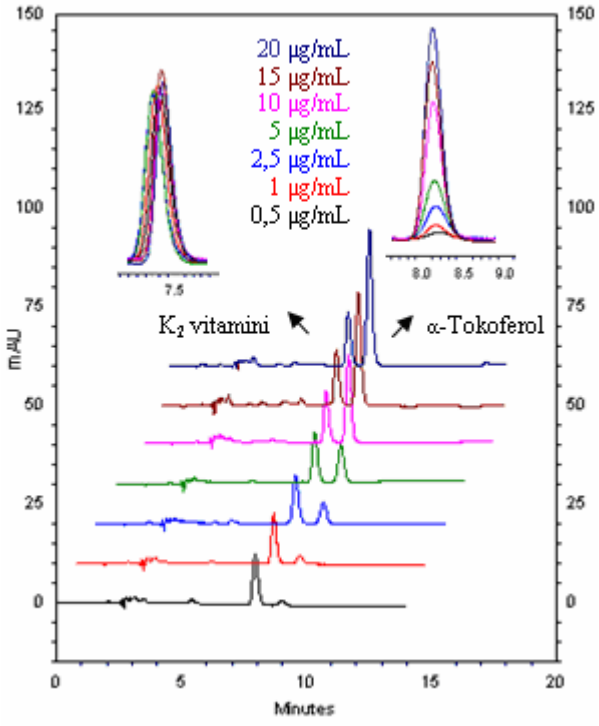
HPLC-DAD çalışmasında MBS'nin MN'ye dönüşüm oranını belirlemek için, MBS ve MN ayrı ayrı 0,01 M HCl çözeltisine eklendi Bölüm 3.4'de verilen yöntemler ile ilk önce dönüşüm sonra ekstraksiyonu gerçekleştirilerek 0,061–12,2 µg/mL derişim aralığında MN'un standart çalışma çözeltileri hazırlandı ve 330 nm dalga boyunda kromatogramları (Şekil 4.27A-B) alındı. 0,01 M HCl çözeltisine eklenen MN ve iç standardın geri kazanım değerleri sırasıyla % 101,1 (% BSS: 1,708. n=6) ve % 96,11 (% BSS: 2,477, n=6), MN'ye dönüştürülen MBS'nin ve iç standardın geri kazanım değerleri sırasıyla % 98,09 (% BSS: 5,093, n=6) ve % 95,90 (% BSS: 1,838, n=6) olarak, MBS'nin MN'ye dönüşüm oranı oranı ise % 97,17 (% BSS: 6,216, n=6) olarak tespit edildi.



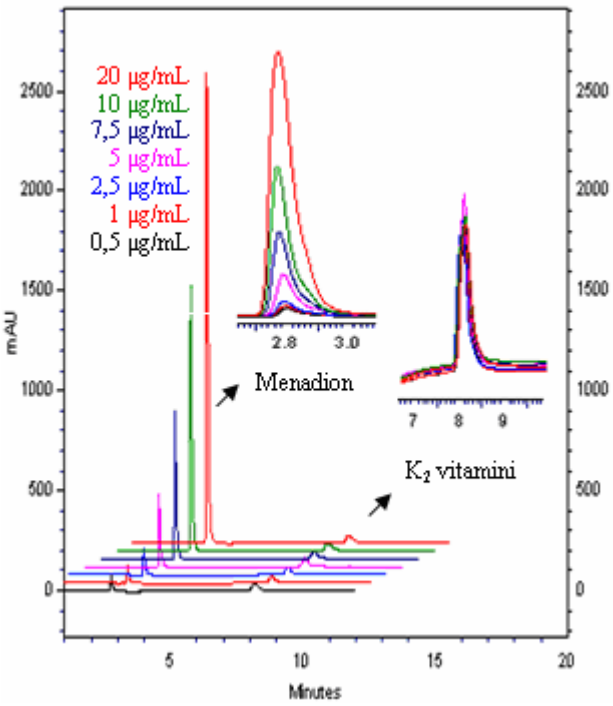

Şekil 4.22: Trifenilfosfin iç standardı içeren farklı derişimlerde standart β-K'nın HPLC-DAD kromatogramları: A) 260 nm'de trifenilfosfin B) 450 nm'de β-K



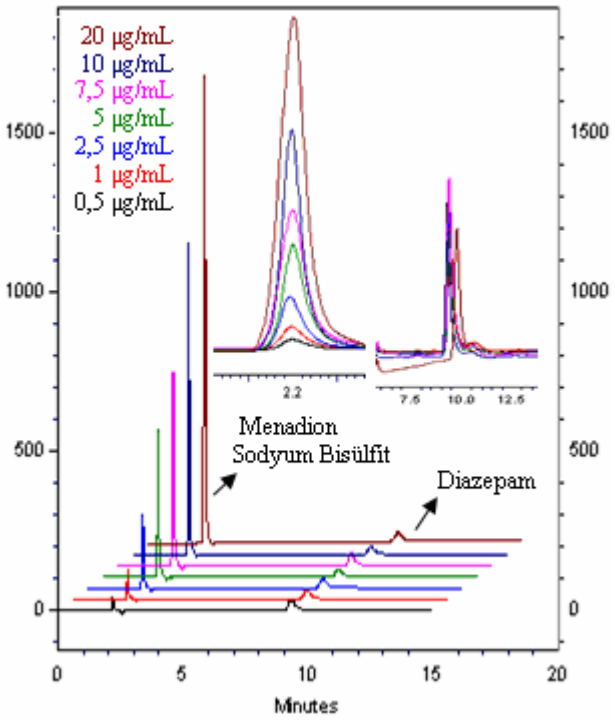

Şekil 4.23: $K_2$ vitamini iç standardı içeren farklı derişimlerde standart retinolün HPLC-DAD kromatogramları (325 nm)



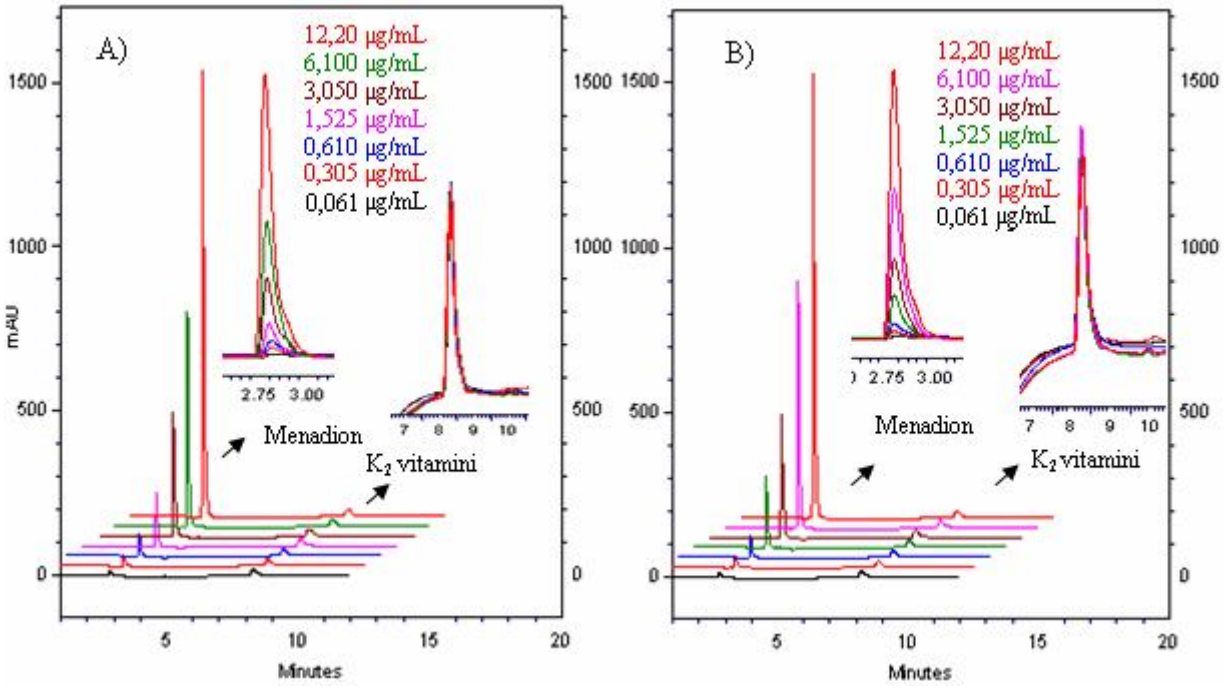

Şekil 4.24: $K_2$ vitamini iç standardı içeren farklı derişimlerinde standart α-T'nin HPLC-DAD kromatogramları (292nm)




Şekil 4.25: $K_2$ vitamini iç standardı içeren farklı derişimlerde standart MN'nin HPLC-DAD kromatogramları (330 nm)

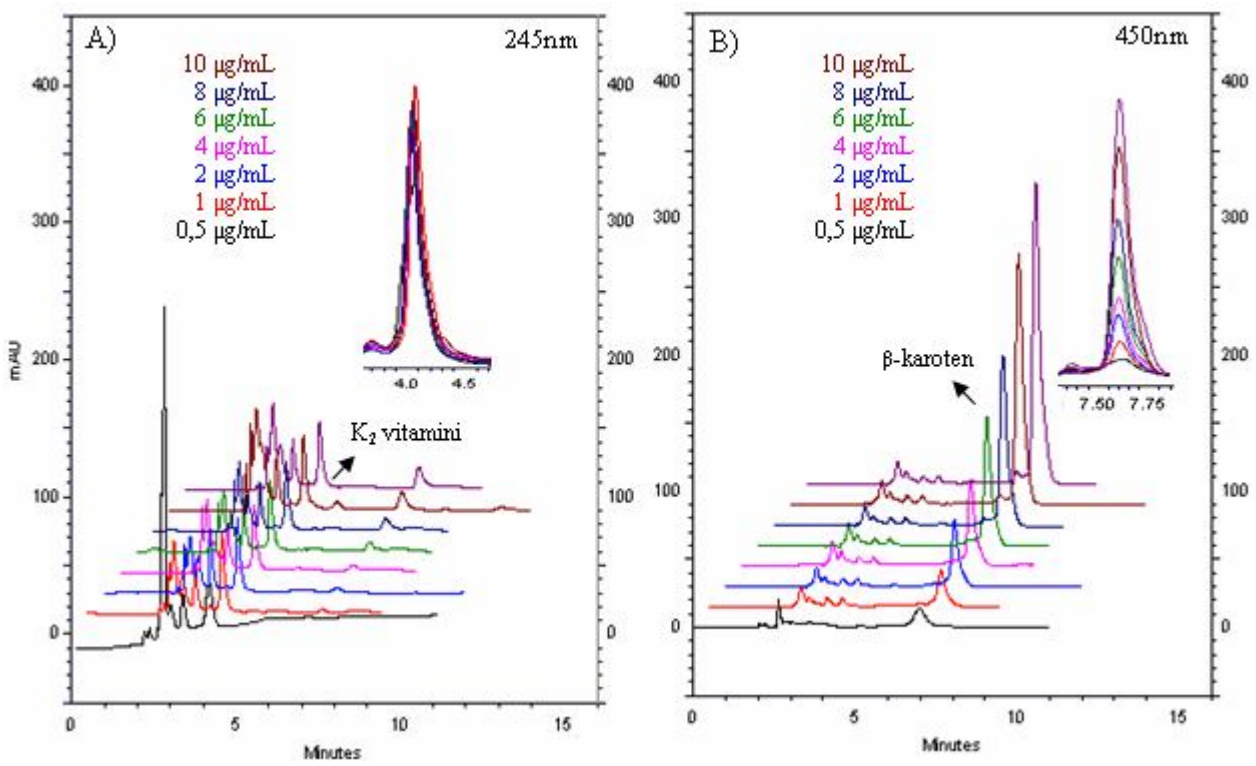



Şekil 4.26: Diazepam iç standardı içeren farklı derişimlerde standart MBS'nin HPLC-DAD kromatogramları (230 nm)

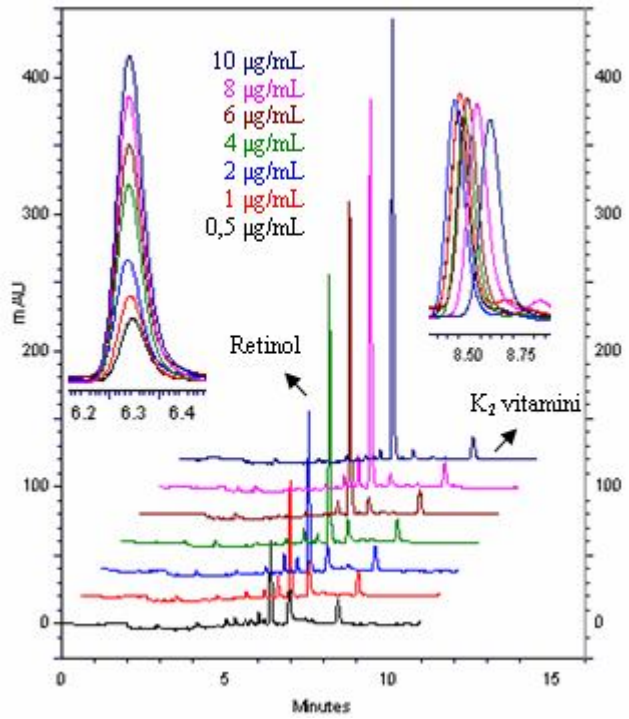



Şekil 4.27: $K_2$ vitamini iç standardı içeren 0,01 M HCl çözeltisinden ekstrakte edilen çözeltilerin HPLC-DAD kromatogramları A) MN B)MN'ye dönüştürülen MBS (330 nm)

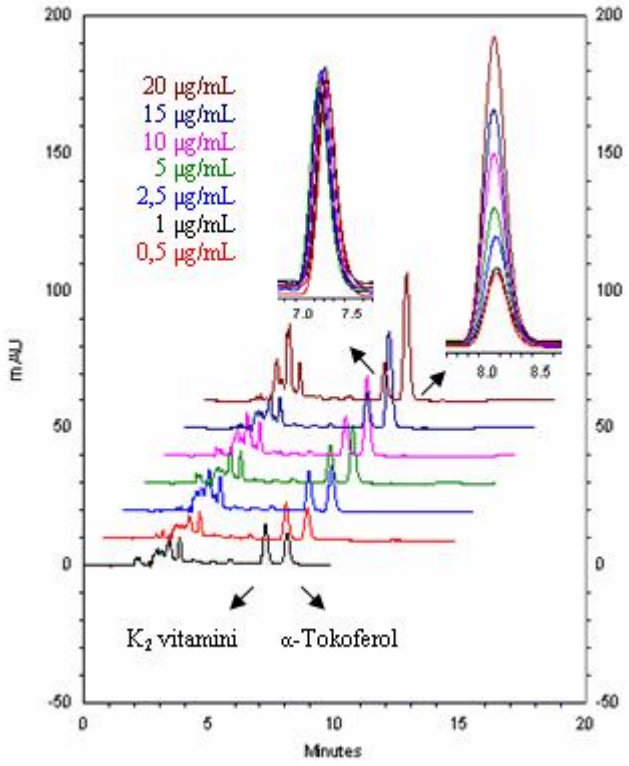
Plazmadan ekstraksiyon ile edilen kromatogramların incelenmesinde bileşenlerin alıkonma zamanları, β-K'nın 7,6 dak. ve iç standart olarak kullanılan $K_2$ vitamininin 4,3 dak. (Şekil 4.28A-B), retinolün 6,4 dak. ve iç standart olarak kullanılan $K_2$ vitamininin 8,6 dak. (Şekil 4.29), α-T'nin 8,1 dak. ve iç standart olarak kullanılan $K_2$ vitamininin 7,1 dak. (Şekil 4.30) ve MN'nin 2,7 dak. ve iç standart olarak kullanılan $K_2$ vitamininin 8,05 dak. (Şekil 4.31A-B) olarak belirlendi. Bütün çalışmalarda plazmadan kaynaklanan herhangi bir interferansa rastlanmadı (Şekil 4.32A-B, 4.33A-D, 4.34A-B, 4.35A-B).



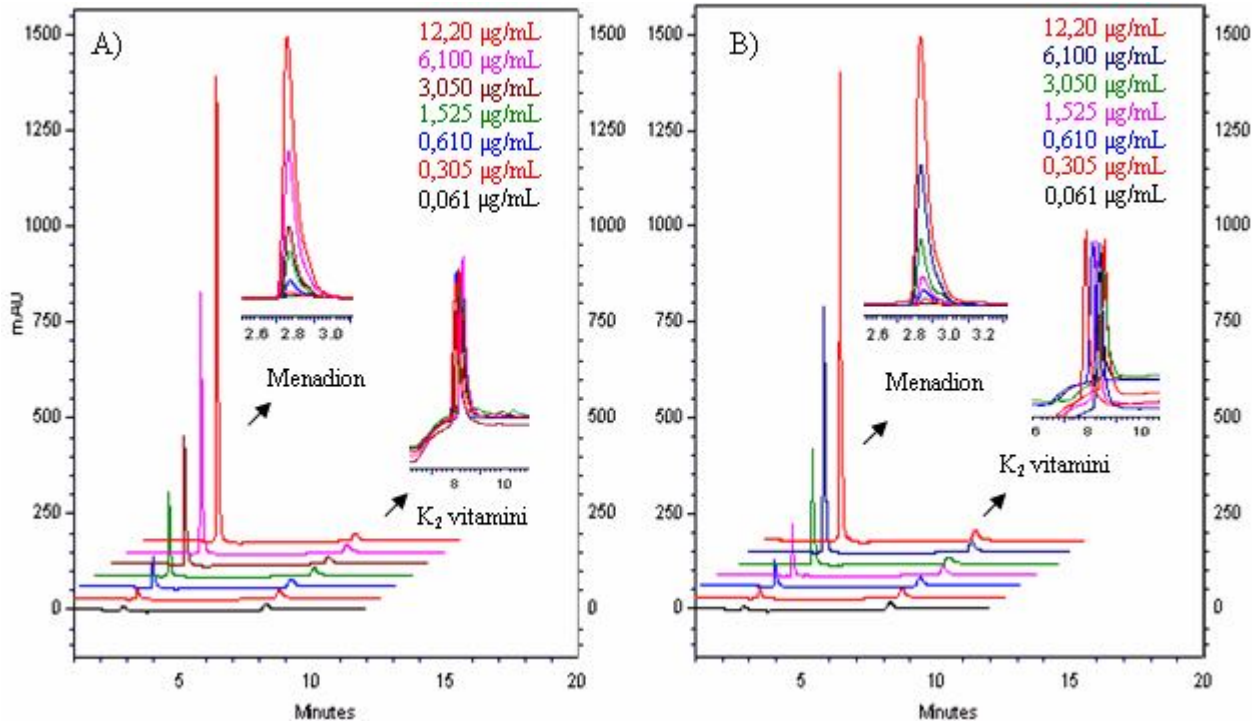

Şekil 4.28: $K_2$ vitamini iç standardı içeren farklı derişimlerde β-K'nın plazma çözeltilerinin HPLC-DAD kromatogramları A) 245 nm'de $K_2$ vitamini, B) 450 nm'de β-K



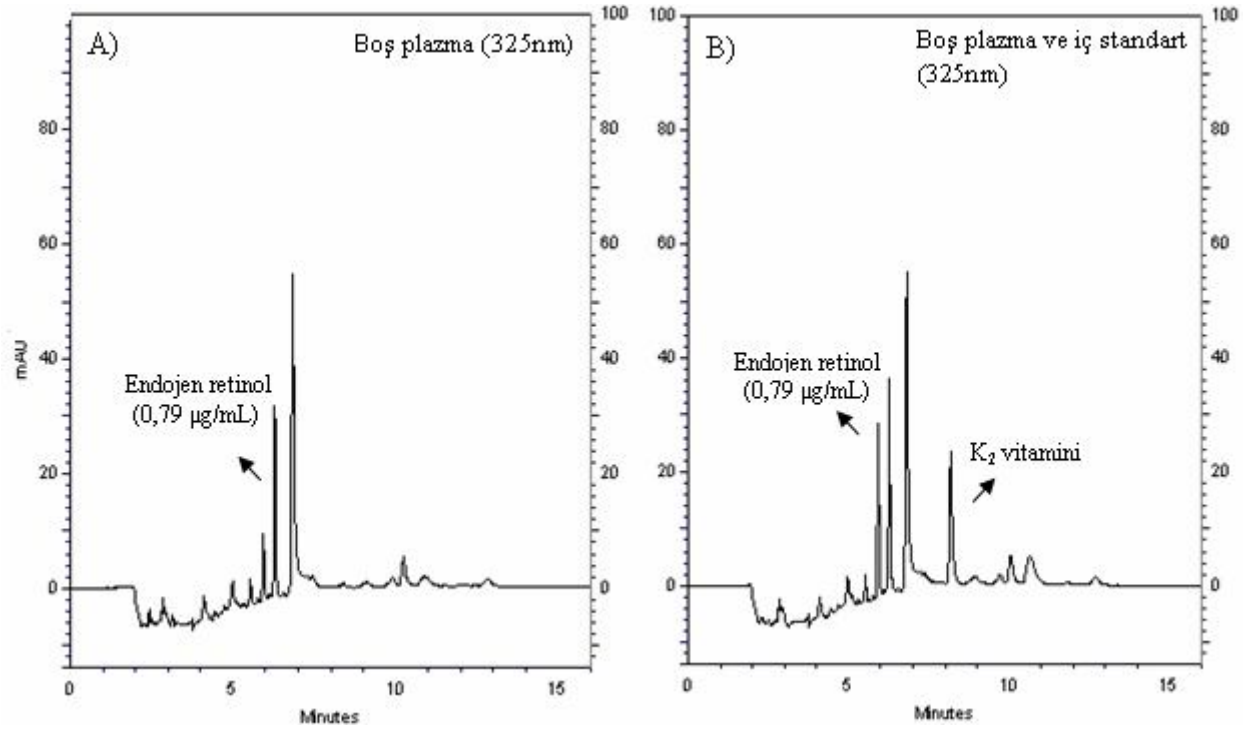

Şekil 4.29: $K_2$ vitamini iç standardı içeren farklı derişimlerde retinolün plazma çözeltilerinin HPLC-DAD kromatogramları (325 nm)



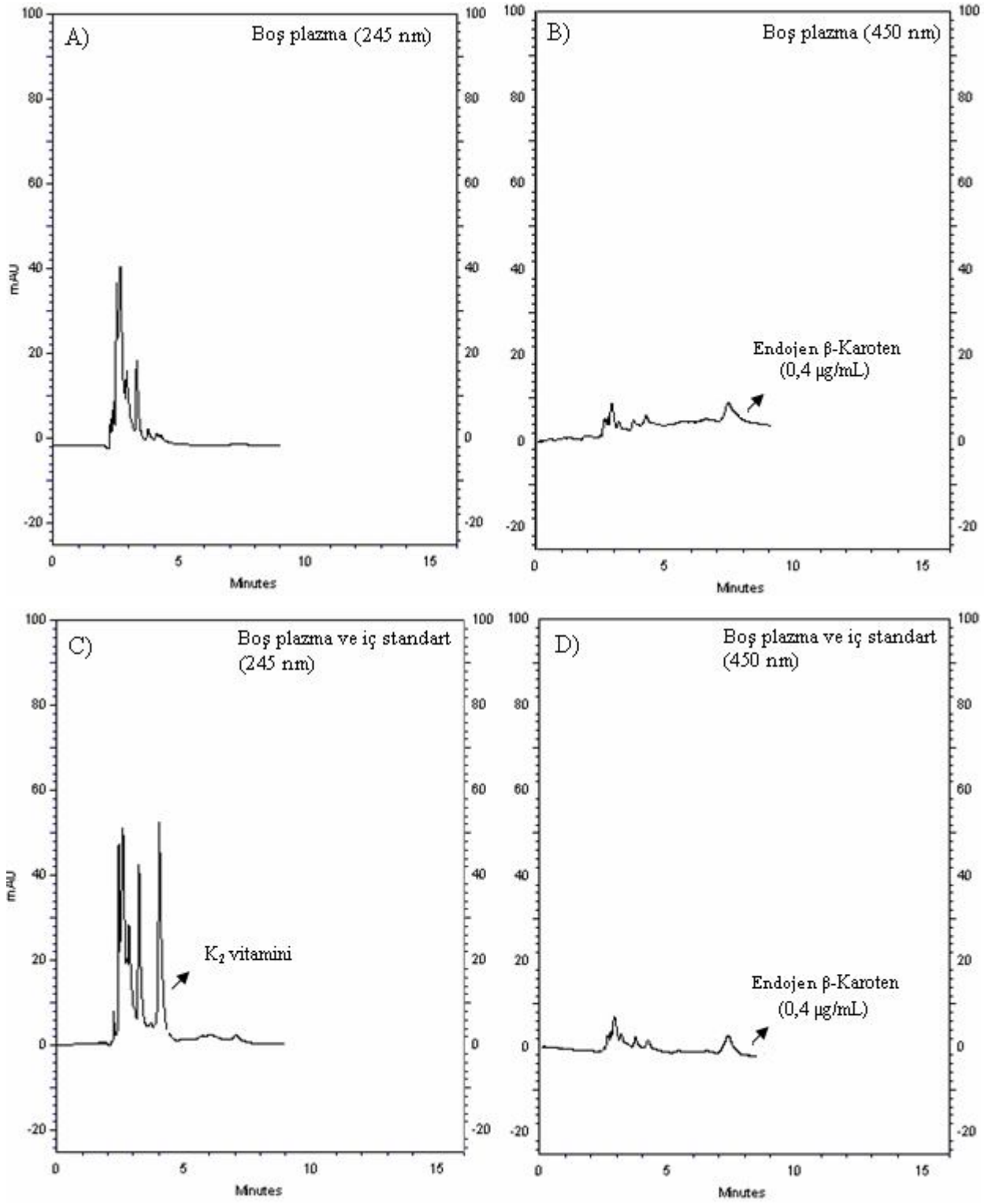

Şekil 4.30: $K_2$ vitamini iç standardı içeren farklı derişimlerde α-T'nin plazma çözeltilerinin HPLC-DAD kromatogramları (292 nm)



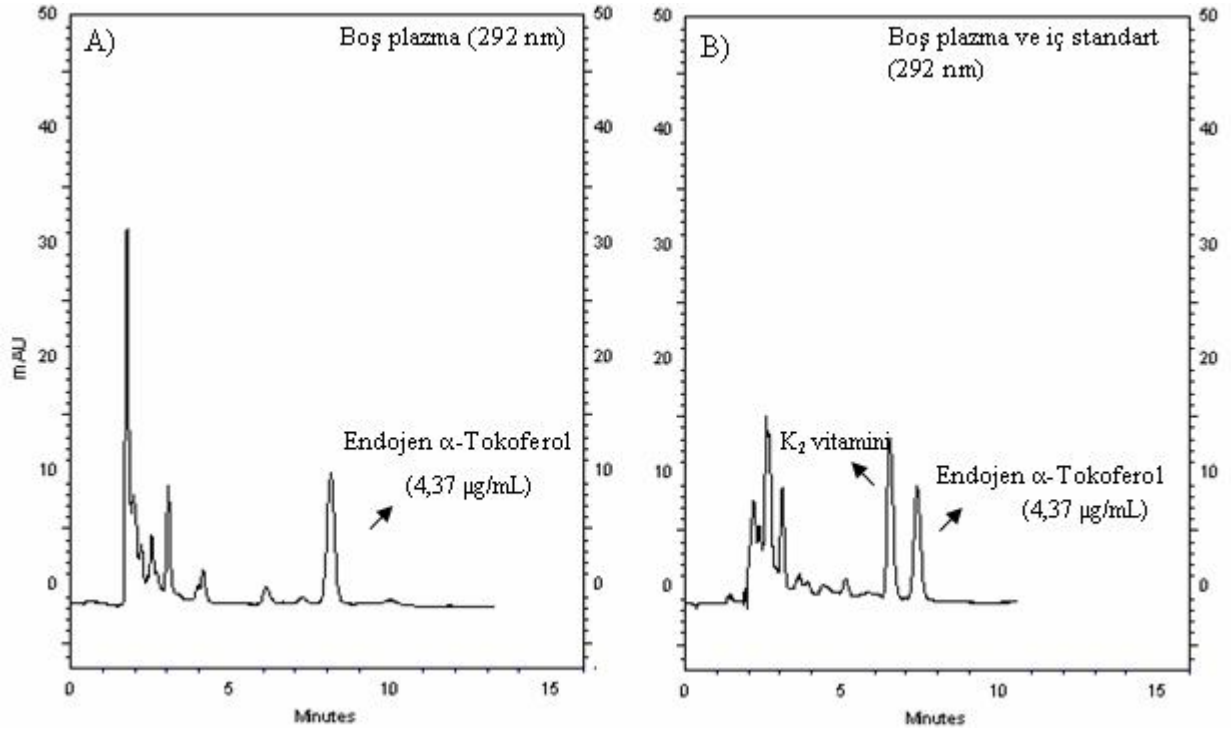

Şekil 4.31: $K_2$ vitamini iç standardı içeren farklı derişimlerde plazma çözeltilerinin HPLC-DAD kromatogramları A) MN B) MN'ye dönüştürülen MBS (330 nm)



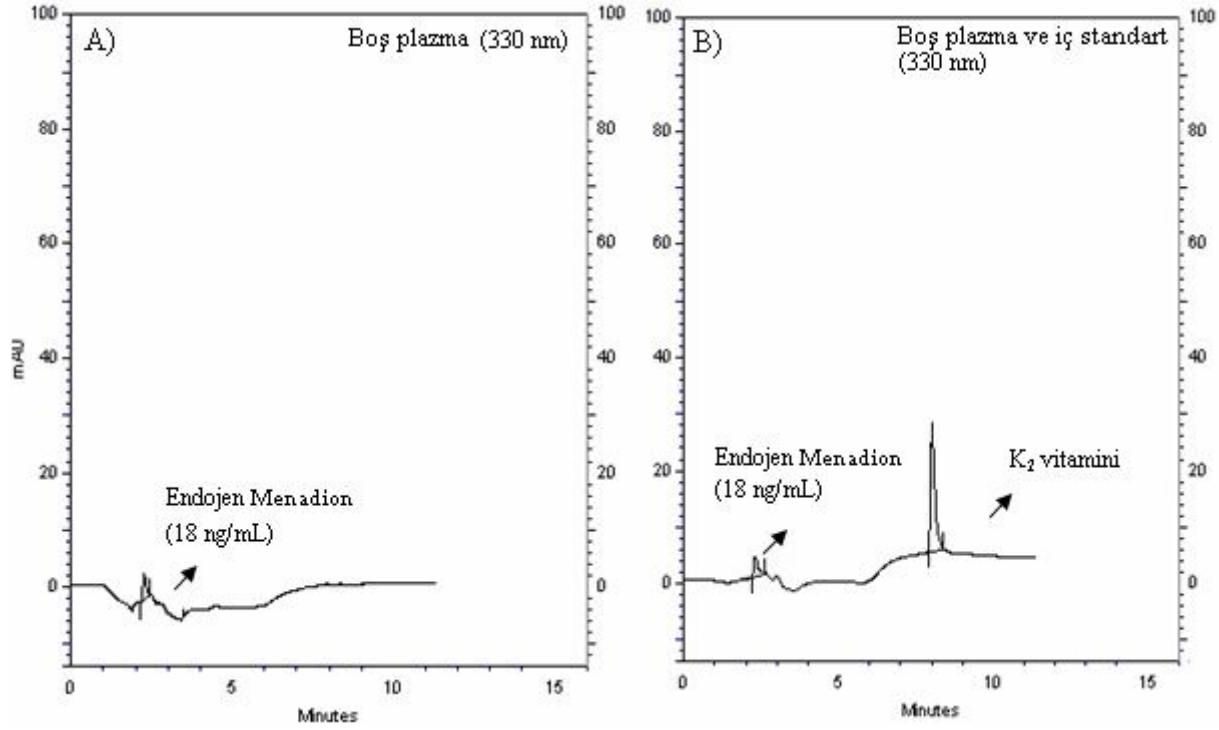

Şekil 4.32: Retinol çalışmasında boş plazmanın HPLC-DAD kromatogramları A) Boş plazma B) İç standart içeren boş plazma




Şekil 4.33: β-K çalışmasında boş plazmanın HPLC-DAD kromatogramları: A) 245 nm'de boş plazma B) 450 nm'de boş plazma C) 245 nm'de iç standart içeren boş plazma D) 245 nm'de iç standart içeren boş plazma




Şekil 4.34: α-T çalışmasında boş plazmanın HPLC-DAD kromatogramları A) Boş plazma B) İç standart içeren boş plazma

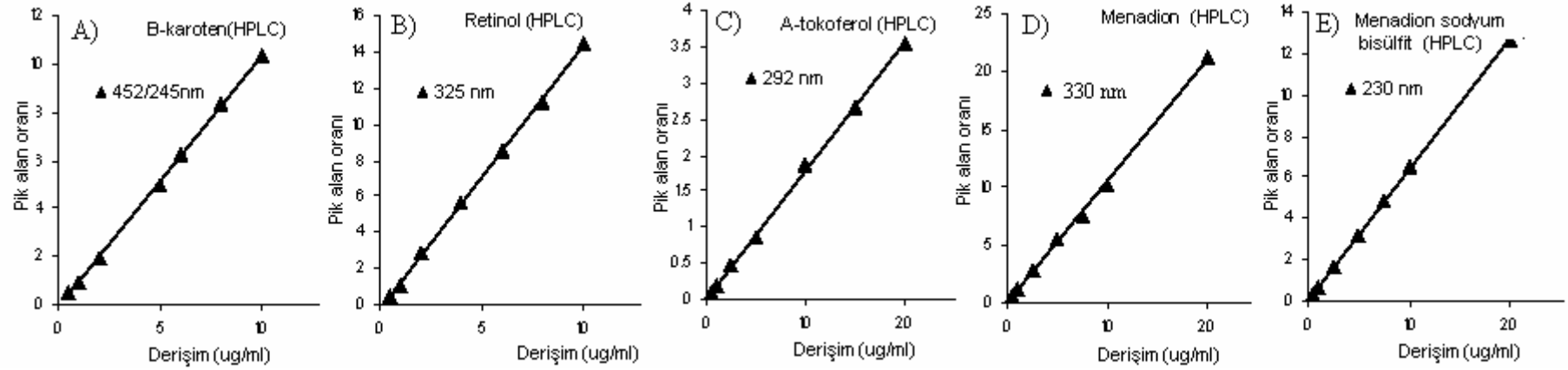



Şekil 4.35: MN çalışmasında boş plazmanın HPLC-DAD kromatogramları: A) Boş plazma B) İç standart içeren boş plazma

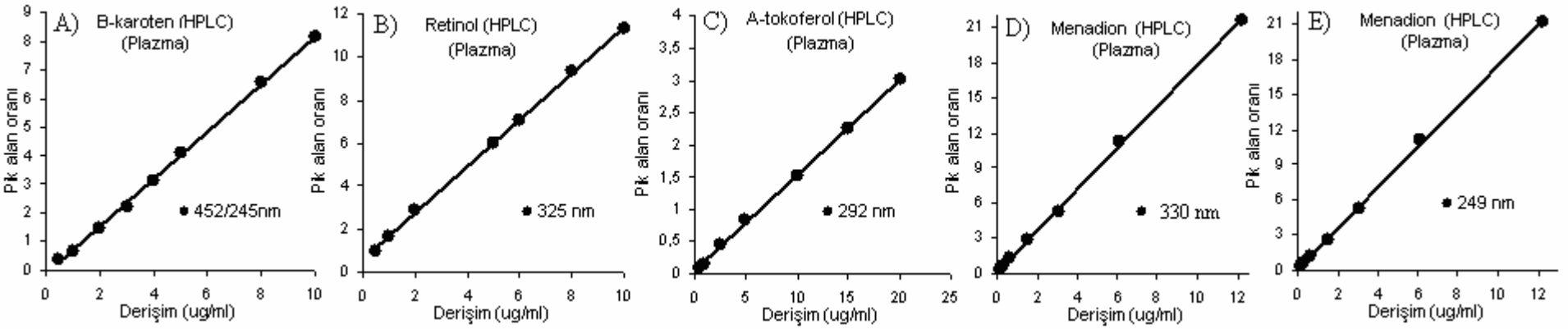
#### 4.3.1.2.2. Doğrusallık/Çalışma Aralığı

0,5–10 μg/mL derişim aralığında β-K'nın derişimine karşı iç standart (trifenilfosfin) ve β-K'nın pik alan oranları; 0,5–10 μg/mL derişim aralığında retinolün derişimine karşı iç standart ($K_2$ vitamini) ve retinolün pik alan oranları; 0,5–20 μg/mL derişim aralığında α-T'nin derişimine karşı iç standart ($K_2$ vitamini) ve α-T'nin pik alan oranları; 0,5–20 μg/mL derişim aralığında MN'nin derişimine karşı iç standart ($K_2$ vitamini) ve MN pik alan oranları ve 0,5–20 μg/mL derişim aralığında MBS'nin derişimine karşı iç standart (diazepam) ve MBS pik alan oranları grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri türetildi. Kalibrasyon eğrileri sırasıyla Şekil 4.36A-E'de verildi.

Plazmaya spike edilip ve plazmadan Bölün 3.4'de verilen ekstraksiyon yöntemleriyle ekstrakte edilen çözeltilerden 0,5–10 μg/mL (endojen β-K ile birlikte nihai derişim 0,9–10,4 μg/mL) derişim aralığında β-K'nın derişimine karşı iç standart ($K_2$ vitamini) ve retinolün pik alan oranları; 0,5–10 μg/mL (endojen retinol ile birlikte nihai derişim 1,29–10,79 μg/mL) derişim aralığında retinolün derişimine karşı iç standart ($K_2$ vitamini) ve retinolün pik alan oranları, 0,5–20 μg/mL (endojen α-T ile birlikte nihai derişim 4,87–24,37 μg/mL) derişim aralığında α-T'nin derişimine karşı iç standart ($K_2$ vitamini) ve α-T'nin pik alan oranları, 0,061–12,2 μg/mL (endojen MN ile birlikte nihai derişim 0,079–12,218 μg/mL) derişim aralığında MN'nin derişimine karşı iç standart ($K_2$ vitamini) ve MN'un pik alan oranları ve 0,061–12,2 (endojen MN ile birlikte nihai derişim 0,079–12,218 μg/mL) derişim aralığında MBS'nin MN'ye dönüştürülen MN'nin derişimine karşı iç standart ($K_2$ vitamini) ve MN pik alan oranları grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri türetildi. Kalibrasyon eğrileri sırasıyla Şekil 4.37A-E'de verildi.




Şekil 4.36: HPLC-DAD yöntemi ile elde edilen standart çalışma çözeltilerin kalibrasyon eğrileri: A) β-K B) Retinol C) α-T D) MN E) MBS




Şekil 4.37: HPLC-DAD yöntemi ile elde edilen plazma çözeltilerinin kalibrasyon eğrileri: A) β-K B) Retinol C) α-T D) MN E) MN'ye dönüştürülmüş MBS

HPLC-DAD yöntemiyle elde edilen kalibrasyon eğrilerinin regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları sırasıyla Tablo 4.28 ve 4.29'da verildi.

Tablo 4.28: HPLC-DAD yöntemi ile β-K, α-T, MN ve MBS standart çalışma çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri

| Etkin Madde | ÇA (μg/mL) | λ(nm) | LR[a] | Sa | Sb | r |
|---|---|---|---|---|---|---|
| β-K | 0,5-10 | 450/260 | Y=1,0431x-0,0983 | 0,0701 | 0,0403 | 0,9996 |
| Retinol | 0,5-10 | 325 | Y=1,4546x-0,2100 | 0,0136 | 0,0053 | 0,9996 |
| α-T | 0,5-20 | 292 | Y=0,1772x+0,0191 | 0,0072 | 0,0024 | 0,9995 |
| MN | 0,5-20 | 330 | Y=1,0498x+0,0656 | 0,1542 | 0,0659 | 0,9992 |
| MBS | 0,5-20 | 230 | Y=0,6348x+0,0502 | 0,0789 | 0,0186 | 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

Tablo 4.29: HPLC-DAD yöntemi ile β-K, α-T, MN ve MN'ye dönüştürülen MBS plazma çözeltilerden elde edilen kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri

| Etkin Madde | ÇA (μg/mL) | λ(nm) | LR[a] | Sa | Sb | r |
|---|---|---|---|---|---|---|
| β-K | 0,5-10 | 450/245 | Y=0,8319x-0,1497 | 0,0764 | 0,0276 | 0,9996 |
| Retinol | 0,5-10 | 325 | Y=1,0761x+0,6134 | 0,0618 | 0,0195 | 0,9996 |
| α-T | 0,5-20 | 292 | Y=0,1485x+0,0468 | 0,0088 | 0,0016 | 0,9995 |
| MN | 0,061-12,2 | 330 | Y=1,7602x+0,1996 | 0,0495 | 0,0590 | 0,9998 |
| MBS | 0,061-12,2 | 330 | Y=1,7330x+0,1622 | 0,0742 | 0,0593 | 0,9996 |

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

#### 4.3.1.2.3.Doğruluk/Kesinlik

β-K, α-T, MN ve MBS kalibrasyon eğrileri içine düşen üç farklı derişimde kalite kontrol çözeltilerinin ve plazmadan ekstraksiyon ile elde edilen plazma kalite kontrol çözeltilerinin güniçi (aynı yöntem ve aynı labaratuar şartlarında 1 günde 6 kez) ve günler arası (aynı yöntemle farklı 3 günde 6 kez) analizleri ile doğruluk ve kesinlik değerleri elde edildi. Analiz sonuçlarının ortalaması ve standart sapmaları belirlendi. Doğruluk bağıl hatayla ve kesinlik bağıl standart sapma (% BSS) ile verildi (Tablo 4.30 ve 4.31).

Tablo 4.30: HPLC-DAD yöntemiyle β-K, α-T, MN ve MBS standart çözeltilerinin güniçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)

| Etkin Madde | λ(nm) | Eklenen (μg/mL) | Güniçi | | | Günler Arası | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Ortalama±SS (μg/mL) | Doğruluk | % BSS | Ortalama±SS (μg/mL) | Doğruluk | % BSS |
| β-K | 450/260 | 0,750 | 0,766±0,017 | 2,133 | 2,247 | 0,789±0,023 | 5,200 | 2,995 |
| | | 4,000 | 4,279±0,094 | 6,975 | 2,214 | 4,249±0,330 | 6,225 | 7,767 |
| | | 8,000 | 8,731±0,267 | 9,137 | 3,065 | 8,658±0,475 | 8,225 | 5,547 |
| α-T | 292 | 0,750 | 0,725±0,045 | -3,381 | 6,183 | 0,732±0,051 | -2,384 | 7,010 |
| | | 5,000 | 5,016±0,163 | 0,321 | 3,254 | 5,096±0,166 | 1,919 | 3,251 |
| | | 15,00 | 14,64±0,213 | -2,361 | 1,456 | 15,03±0,590 | 0,233 | 3,926 |
| MN | 330 | 0,750 | 0,768±0,020 | 2,462 | 2,552 | 0,745±0,058 | -0,732 | 7,842 |
| | | 5,000 | 5,293±0,062 | 5,856 | 1,172 | 5,235±0,071 | 4,709 | 1,353 |
| | | 10,00 | 9,751±0,455 | -2,487 | 4,666 | 9,940±0,579 | -0,601 | 5,827 |
| MBS | 230 | 1,000 | 0,752±0,018 | 0,220 | 2,376 | 0,767±0,034 | 2,286 | 4,386 |
| | | 5,000 | 4,962±0,111 | -0,768 | 2,228 | 5,098±0,165 | 1,952 | 3,241 |
| | | 10,00 | 10,17±0,077 | 1,715 | 0,754 | 10,36±0,232 | 3,578 | 2,235 |

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

Tablo 4.31: HPLC-DAD yöntemiyle β-K, retinol, α-T, MN ve MBS plazma çözeltilerinin güniçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)

| Etkin Madde | λ(nm) | Eklenen (μg/mL) | Güniçi | | | Günler Arası | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Ortalama±SS (μg/mL) | Doğruluk | % BSS | Ortalama±SS (μg/mL) | Doğruluk | % BSS |
| β-K | 450/245 | 0,750 | 0,784±0,020 | 4,533 | 2,551 | 0,704±0,027 | 6,133 | 3,835 |
| | | 4,000 | 4,295±0,186 | -2,392 | 4,342 | 4,352±0,219 | -1,084 | 5,020 |
| | | 8,000 | 8,302±0,384 | -1,165 | 4,621 | 8,092±0,336 | -3,671 | 4,156 |
| Retinol | 325 | 0,750 | 1,399±0,087 | -9,155 | 6,231 | 1,423±0,112 | -7,597 | 7,894 |
| | | 4,000 | 5,283±0,236 | -8,756 | 4,479 | 5,569±0,388 | -3,816 | 6,984 |
| | | 8,000 | 8,573±0,493 | -2,468 | 5,757 | 8,423±0,440 | 4,175 | 5,231 |
| α-T | 292 | 0,750 | 5,116±0,287 | -0,071 | 5,611 | 5,077±0,244 | -0,844 | 4,814 |
| | | 5,000 | 9,837±0,204 | 4,983 | 2,071 | 9,879±0,166 | 5,430 | 1,680 |
| | | 15,00 | 19,54±1,106 | 0,889 | 5,661 | 19,64±0,725 | 1,395 | 3,691 |
| MN | 330 | 0,305 | 0,323±0,021 | 5,968 | 6,497 | 0,326±0,022 | 6,757 | 6,734 |
| | | 1,525 | 1,536±0,043 | 0,697 | 2,797 | 1,565±0,100 | 2,625 | 6,377 |
| | | 6,100 | 6,285±0,105 | 3,033 | 1,676 | 6,269±0,256 | 2,778 | 4,086 |
| MBS | 330 | 0,305 | 0,330±0,015 | 8,299 | 4,582 | 0,329±0,011 | 7,870 | 3,469 |
| | | 1,525 | 1,447±0,039 | -5,136 | 2,699 | 1,438±0,038 | -5,713 | 2,619 |
| | | 6,100 | 6,380±0,168 | 4,596 | 2,637 | 6,268±0,096 | 2,751 | 1,535 |

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

#### 4.3.1.2.4. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)

HPLC-DAD çalışmasında β-K, α-T, MN ve MBS kromatogramlarında sinyal/gürültü (S/G) oranı 3 olduğu derişim gözlenebilme sınırı (LOD) ve 8 olan derişimde tayin alt sınırı (LOQ) değerleri olarak belirlendi.[192-194] HPLC-DAD yönteminin gözlenebilme sınırı ve tayin alt sınırı değerleri Tablo 4.32'de verildi.

Tablo 4.32: HPLC-DAD yöntemi ile çalışılan etkin maddelerin standart çözeltilerinin gözlenebilme sınırı ve tayin alt sınırı

| Etkin Madde | Dalga Boyu (nm) | Duyarlılık Limiti | |
|---|---|---|---|
| | | Gözlenebilme Sınırı (LOD, μg/mL) | Tayin Alt Sınırı (LOQ, μg/mL) |
| β-K | 452 | 0,010 | 0,020 |
| Retinol | 325 | 0,050 | 0,100 |
| α-T | 292 | 0,100 | 0,200 |
| MN | 330 | 0,010 | 0,015 |
| MBS | 230 | 0,005 | 0,015 |

#### 4.3.1.2.5. Geri Kazanım

Farmasötik preparattan geri kazanım çalışmaları standart ekleme yöntemi ile yapıldı. Kloroformda çözülüp etanol ile seyreltilen Carovit® yumuşak kapsül (20 mg β-K / kapsül), ve etanolde çözülen Evicap® yumuşak kapsülden (200 IU α-T / kapsül) sırasıyla 2 μg/mL ve 10 μg/mL derişimlerde; MBS etkin maddesine sahip olan Libavit K® ampul (20 mg MBS / 2mL) preparatı 0,01 M HCl'de çözülerek 5 μg/mL (MBS analizinde) ve 10 μg/mL (MBS'nin MN'ye dönüştürülmesinde) derişimlerde ilaç çözeltileri hazırlandı ve bu çözeltilere daha önce belirtilen analitlerin iç standardları eklenerek kromatogramları alınarak ve pik alan oranları belirlendi. Sonra bu çözeltiler üzerine β-K, α-T, MBS ve MN'nin 3 farklı derişimde hazırlanan standart çalışma

çözeltileri eklendi ve tekrar pik alanları üç kez okunarak iç standart ile etkin maddelerin pik alan oranları belirlendi. Belirlenen pik alan oran değerleri aynı derişimdeki standart çözeltilerinin pik alan oran değerleriyle kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.33'de verildi.

Tablo 4.33: Farmasötik preparatlara katım yapılan çözeltilerin HPLC-DAD yöntemiyle elde edilen geri kazanım değerleri (n=6)

| Ticari Preparat | λ(nm) | Eklenen (μg/mL) | Ortalama±SS (μg/mL) | Geri kazanım | % BSS |
|---|---|---|---|---|---|
| Carovit® 2μg/mL | 450/260 | 0,750 | 0,711±0,025 | 94,89 | 3,542 |
| | | 4,000 | 3,919±0,177 | 97,98 | 4,520 |
| | | 8,000 | 7,895±0,226 | 98,69 | 2,868 |
| Evicap® 10μg/mL | 292 | 0,750 | 0,739±0,042 | 98,53 | 5,782 |
| | | 5,000 | 4,814±0,185 | 96,29 | 3,862 |
| | | 15,00 | 15,17±0,836 | 101,1 | 5,110 |
| Libavit K® 5μg/mL | 230 | 0,750[a] | 0,736±0,038 | 98,20 | 5,217 |
| | | 5,000[a] | 4,740±0,148 | 94,80 | 3,142 |
| | | 10,00[a] | 9,695±0,431 | 96,95 | 4,452 |
| Libavit K® 6,1[c]μg/mL | 330 | 0,750[b] | 0,754±0,040 | 100,5 | 5,394 |
| | | 5,000[b] | 4,948±0,345 | 98,96 | 6,975 |
| | | 10,00[b] | 9,855±0,688 | 98,55 | 6,990 |

λ: dalga boyu, [a]: MBS standart çözeltisi, [b]: MN standart çözeltisi, [c]: 10μg/mL MBS'nin MN'ye eşdeğer derişimi, SS: standart sapma, % BSS: bağıl standart sapma (SS/ortalamax100)

Plazmadan geri kazanım çalışmasında, β-K, α-T, MN ve MBS'nin üç farklı derişimdeki kalite kontrol çözeltileri ile iç standardlarıyla birlikte plazmaya eklendi, karıştırıldı ve Bölüm 3.4'de verilen ekstraksiyon yöntemleriyle ekstraksiyonları yapıldı. Ekstraksiyon sonrasında elde edilen çözeltilerin güniçi ve günler arası yapılan analizlerinde belirlenen pik alan oranları, standart çözeltilerden elde edilen pik alan oranları değerleri ile kıyaslanarak sonuçlar plazmadan yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.34'de verildi.

Tablo 4.34: HPLC-DAD yöntemiyle elde edilen güniçi ve günler arası plazmadan geri kazanım değerleri (n=6)

| Etkin Madde | λ(nm) | Eklenen (μg/mL) | Güniçi | | | | Günler Arası | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Analit | | İç Standart | | Analit | | İç Standart | |
| | | | % Geri kazanım | % BSS | % Geri kazanım | % BSS | % Geri kazanım | % BSS | % Geri kazanım | % BSS |
| β-K | 450 /245 | 0,750 | 104,3 | 4,768 | 102,1 | 4,918 | 106,4 | 5,159 | 101,7 | 4,675 |
| | | 4,000 | 102,0 | 5,656 | 101,1 | 2,261 | 98,31 | 5,243 | 103,4 | 5,062 |
| | | 8,000 | 99,10 | 4,035 | 101,8 | 3,647 | 98,06 | 1,750 | 100,6 | 4,291 |
| Retinol | 325 | 0,750 | 95,29 | 7,279 | 98,76 | 4,243 | 93,45 | 6,142 | 97,00 | 7,256 |
| | | 4,000 | 91,92 | 3,579 | 93,38 | 7,245 | 94,29 | 3,481 | 98,72 | 3,460 |
| | | 8,000 | 96,23 | 7,777 | 94,28 | 3,320 | 98,66 | 5,889 | 98,56 | 5,222 |
| α-T | 292 | 0,750 | 95,74 | 7,427 | 94,55 | 5,287 | 93,45 | 6,142 | 97,00 | 7,256 |
| | | 5,000 | 94,82 | 4,048 | 98,21 | 2,864 | 94,29 | 3,481 | 98,72 | 3,460 |
| | | 15,00 | 87,38 | 2,235 | 98,60 | 4,046 | 85,75 | 5,699 | 93,33 | 3,339 |
| MN | 330 | 0,305 | 86,92 | 5,885 | 97,49 | 2,862 | 87,29 | 4,268 | 98,20 | 2,340 |
| | | 1,525 | 94,78 | 2,503 | 96,09 | 1,938 | 96,27 | 3,632 | 96,83 | 4,016 |
| | | 6,100 | 96,32 | 2,373 | 101,9 | 4,784 | 97,16 | 2,972 | 102,8 | 4,219 |
| MBS | 330 | 0,305 | 88,12 | 3,853 | 101,4 | 3,174 | 88,20 | 4,660 | 99,24 | 2,599 |
| | | 1,525 | 88,63 | 2,556 | 97,47 | 2,627 | 86,81 | 5,297 | 96,82 | 5,071 |
| | | 6,100 | 98,49 | 1,528 | 103,8 | 5,464 | 97,40 | 2,572 | 104,1 | 5,406 |

λ:dalga boyu, % BSS: bağıl standart sapma (standart sapma/ortalamax100)(n=6)

#### 4.3.1.2.6.Matriks Etkisi

Matriks etkisi çalışmasında, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Alma merkezinden (1.plazma), Erzurum Kızılay Kan Alma Merkezinden (2.plazma) ve Erzurum Palandöken Hastanesi Kan Alma Merkezinden (3.plazma) sağlanan üç farklı plazmayla gerçekleştirildi. Bu plazmaların her birine β-K, retinol, α-T, MN ve MBS'nin üç farklı derişimdeki kalite kontrol çözeltileri ayrı ayrı eklendi ve karıştırıldı. Daha sonra Bölüm 3.4'de verilen ekstraksiyon yöntemleriyle ekstraksiyonları yapıldı. Ayrıca çalışılan plazmalardaki etkin maddelerin endojen miktarlarını bulabilmek için plazma örnekleri katım yapılmadan direk olarak ekstraksiyonları yapıldı. Ekstraksiyon sonrasında elde edilen çözeltilerin analizlerinde bulunan değerlerinin standart çözeltilerden elde edilen değerlerle kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.35'de verildi.

Tablo 4.35: HPLC-DAD yöntemi ile matriks etkisi

| Etkin Madde | Eklenen (μg/mL) | 1.Plazma | | 2.Plazma | | 3.Plazma | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | % Geri kazanım | % BSS | % Geri kazanım | % BSS | % Geri kazanım | % BSS |
| β-K | Endojen | 0,400 μg/mL | | 0,320 μg/mL | | 0,280 μg/mL | |
| | 0,750 | 104,3 | 4,768 | 98,85 | 3,825 | 93,53 | 6,470 |
| | 4,000 | 102,0 | 5,656 | 98,30 | 5,878 | 95,24 | 5,042 |
| | 8,000 | 99,10 | 4,035 | 96,40 | 7,573 | 94,66 | 5,549 |
| Retinol | Endojen | 0,790 μg/mL | | 0,920 μg/mL | | 0,550 μg/mL | |
| | 0,750 | 95,29 | 7,279 | 98,83 | 2,537 | 95,98 | 5,785 |
| | 4,000 | 91,92 | 3,579 | 93,51 | 8,187 | 94,15 | 6,863 |
| | 8,000 | 96,23 | 7,777 | 94,07 | 5,633 | 96,96 | 7,783 |
| α-T | Endojen | 4,370 μg/mL | | 7,100 μg/mL | | 5,200 μg/mL | |
| | 0,750 | 95,74 | 7,427 | 98,230 | 3,162 | 96,47 | 9,658 |
| | 5,000 | 94,82 | 4,048 | 94,80 | 6,031 | 91,38 | 4,823 |
| | 15,00 | 87,38 | 2,235 | 96,35 | 5,485 | 93,30 | 4,099 |
| MN | Endojen | 18 ng/mL | | 0,024μg/mL | | 0,037 μg/mL | |
| | 0,305[a] | 86,92 | 5,885 | 92,29 | 6,518 | 94,50 | 6497 |
| | 1,525[a] | 94,78 | 2,503 | 95,73 | 2,912 | 98,31 | 2,797 |
| | 6,100[a] | 96,32 | 2,373 | 93,65 | 1,740 | 92,23 | 3,717 |
| MBS | Endojen | 18 ng/mL | | 0,024μg/mL | | 0,037 μg/mL | |
| | 0,305[b] | 88,12 | 3,853 | 89,88 | 5,423 | 87,86 | 4,523 |
| | 1,525[b] | 88,63 | 2,556 | 91,53 | 3,430 | 90,37 | 3,489 |
| | 6,100[b] | 98,49 | 1,528 | 90,06 | 4,260 | 89,43 | 4,613 |

[a]:MN standart çözeltisi, [b]: MBS'nin MN'ye eşdeğer derişimi, % BSS: bağıl standart sapma (standart sapma/ortalamax100)

## 4.4. Gerçek Numunelere Uygulama

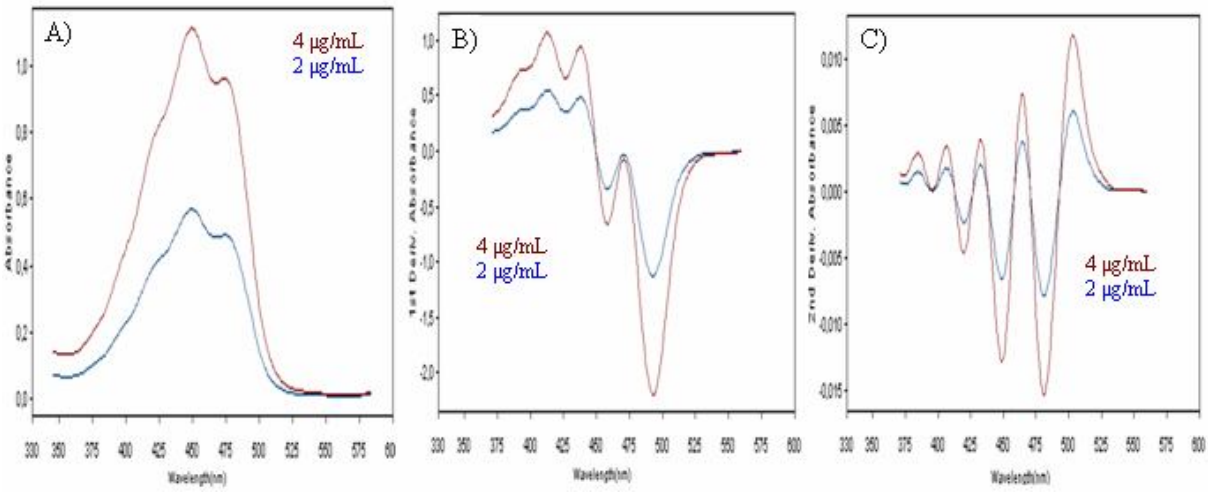
### 4.4.1. Geliştirilen Yöntemlerin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Geliştirilen ve geçerlilik testleri yapılan yöntemlerin uygulanabilir olduğunu görmek amacıyla β-K, α-T ve MBS içeren farmasötik preparatlarda etken madde miktar analizleri yapıldı.

#### 4.4.1.1. Carovit® Yumuşak Kapsül (20 mg β-K / Kapsül)

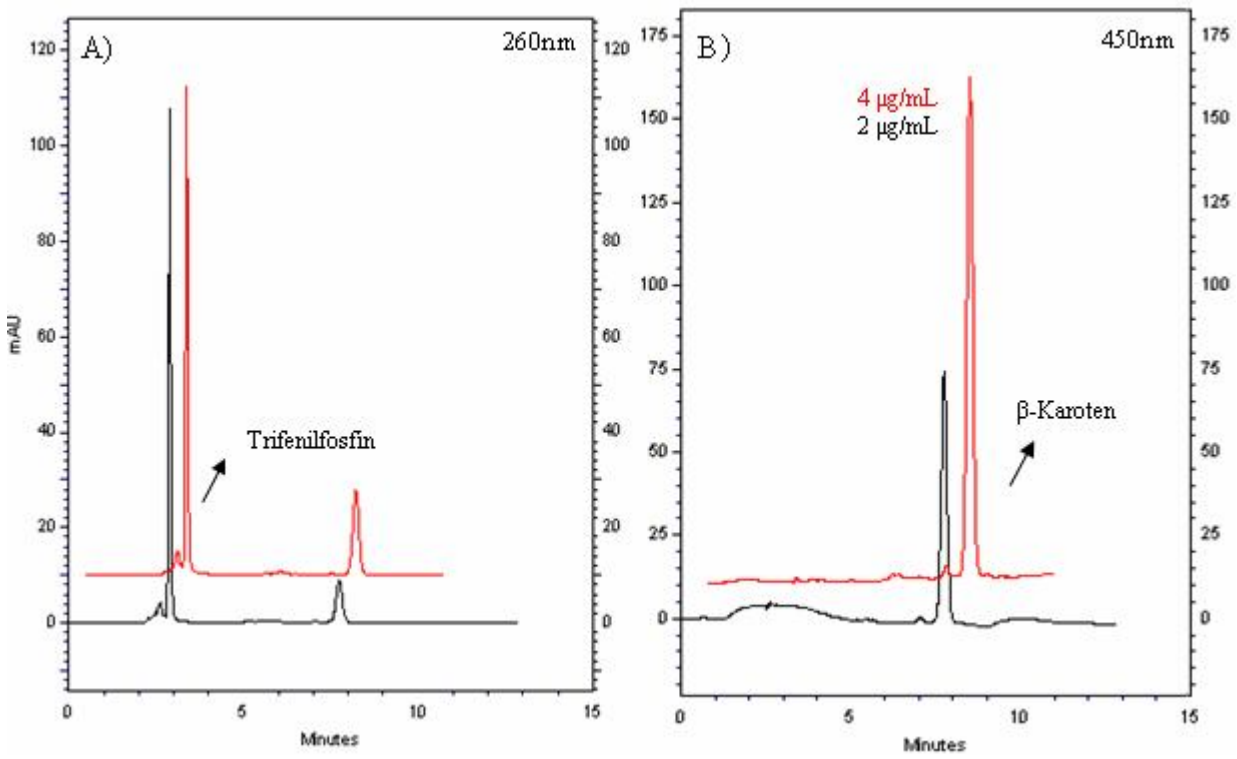
UV Görünür Bölge, 1D ve 2D Spektrofotometri yöntemlerin uygulamasında, 20 mg β-K içeren Carovit® yumuşak kapsül içeriği hekzanda çözüldü. Hazırlanan çözelti etanol ile seyreltilerek 2 ve 4 μg/mL derişimlerde çözeltileri hazırlandı. Elde edilen

çözeltilerin UV- Görünür Bölge, 1D- ve 2D- spektrumları(Şekil 4.38A-C) alındı ve absorbansları okundu. Absorbans değerleri ortalama kalibrasyon eğrisine konularak miktar tayini gerçekleştirildi (Tablo 4.36).




Şekil 4.38: 2 ve 4 µg/mL derişimlerde Carovit® ilaç çözeltilerinin: A) UV-Görünür Bölge spektrumları B) 1D- spektrumları C) 2D- spektrumları

HPLC-DAD uygulamasında, 20 mg β-K içeren Carovit® yumuşak kapsül içeriği kloroformda çözüldü. Hazırlanan çözelti etanol ile seyreltilerek 2 ve 4 µg/mL derişimlerde çözeltileri hazırlandı ve 4 µg/mL trifenilfosfin (iç standart) ilaç çözeltilerine eklendi. Çözeltiler HPLC'ye 10 µL enjekte edilerek kromatogramları alındı (Şekil 4.39A-B) ve pik alan oranları kalibrasyon eğrisine konularak miktar tayini gerçekleştirildi (Tablo 4.36).




Şekil 4.39: 2 ve 4 µg/mL derişimlerde Carovit® ilaç çözeltilerinin HPLC-DAD kromatogramları A) 260 nm B) 450 nm

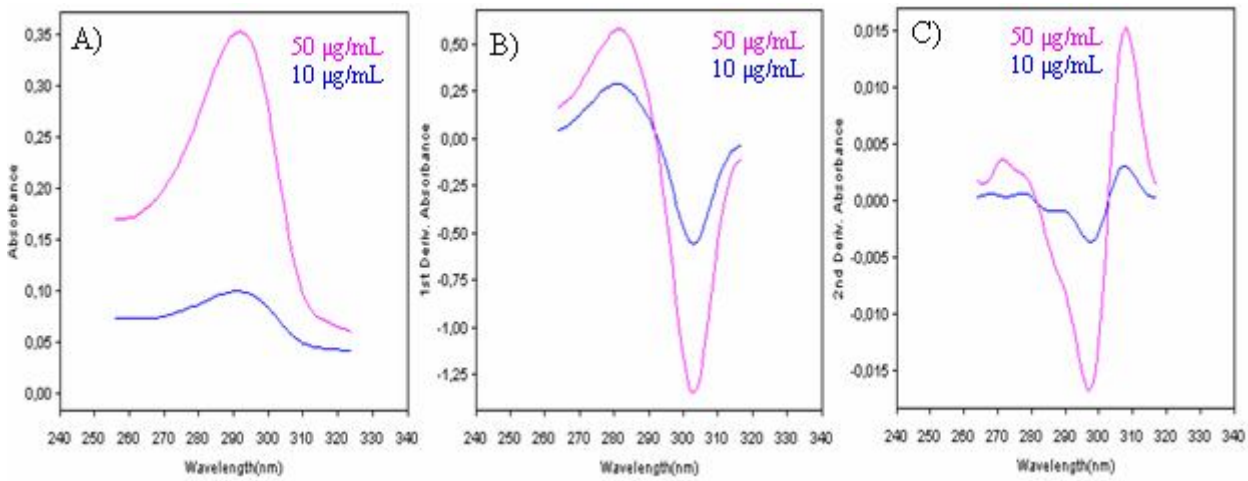
Tablo 4.36: β-K (20 mg) içeren Carovit® yumuşak kapsülün miktar tayini

| Ticari Preparat | Yöntem | λ (nm) | n | Ortalama±SS (mg) | %Geri kazanım | % BSS | Güven Aralığı |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Carovit® yumuşak kapsül | UV Görünür Bölge Spektrofotometri | 452 | 6 | 20.30±0.293 | 101,5 | 1,441 | 99,68-103,5 |
| | | 476 | 6 | 21.12±0.307 | 105.6 | 1.455 | 103.3-107.5 |
| | 1.Türev Spektrofotometri | 439 | 6 | 17,90±0,300 | 89,53 | 1,677 | 87,94-92,09 |
| | | 460 | 6 | 19,26±1,053 | 96,31 | 5,465 | 89,93-102,2 |
| | | 496 | 6 | 20,55±0,460 | 102,7 | 2,237 | 98,26-104,3 |
| | 2.Türev Spektrofotometri | 433 | 6 | 18,50±1,387 | 92,53 | 7,493 | 86,77-104,9 |
| | | 451 | 6 | 20,42±0,547 | 102,0 | 2,680 | 98,44-106,2 |
| | | 467 | 6 | 18,25±1,029 | 91,27 | 5,635 | 83,33-97,62 |
| | | 484 | 6 | 20,62±0,159 | 103,1 | 0,795 | 102,1-103,9 |
| | | 505 | 6 | 19,55±0,837 | 97,76 | 4,278 | 93,90-104,8 |
| | HPLC-DAD | 260/450 | 6 | 20,39±0,480 | 101,9 | 2,354 | 98,95-105,0 |

λ: dalga boyu, SS: standart sapma, % BSS: bağıl standart sapma (SS/ortalamax100)

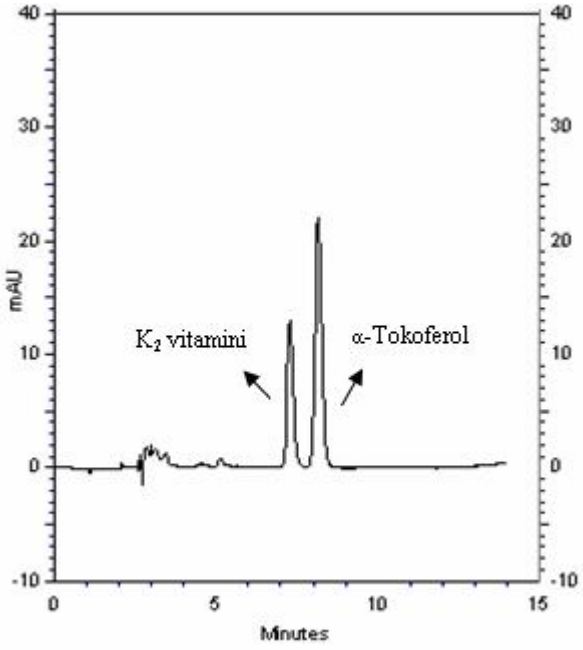
### 4.4.1.2. Evicap® Yumuşak Kapsül (200 IU (134,23 mg) α-T / Kapsül)

UV-Görünür Bölge, 1D- ve 2D- spektrofotometri yöntemlerinin uygulamasında, 134,23 mg α-T içeren Evicap® yumuşak kapsül içeriği etanolde çözüldü. Hazırlanan çözelti etanol ile seyreltilerek 10 ve 50 µg/mL derişimlerde çözeltileri hazırlandı. Elde edilen çözeltinin UV-Görünür Bölge, 1D- ve 2D- spektrumları alınarak (Şekil 4.40A-C) absorbansları okundu. Absorbans değerleri ortalama kalibrasyon eğrisine konularak miktar analizleri gerçekleştirildi (Tablo 4.37).




Şekil 4.40: 10 ve 50 µg/mL derişimlerde Evicap® ilaç çözeltisinin: A) UV-Görünür Bölge spektrumları B) 1D- spektrumları C) 2D- spektrumları

HPLC-DAD uygulamasında, 134,23 mg α-T içeren Evicap® yumuşak kapsül içeriği etanolde çözüldü. 10 µg/mL iç standart içerecek şekilde ($K_2$ vitamini) 10 µg/mL derişimde ilaç çözeltileri hazırlandı ve 20 µL HPLC-DAD sistemine enjekte edilerek kromatogramları alındı (Şekil 4.41) ve kromatogramlardan elde edilen pik alan oranları kalibrasyon eğrilerine konularak miktar analizleri gerçekleştirildi (Tablo 4.37).




Şekil 4.41: 10 μg/mL derişimdeki Evicap® ilaç çözeltisinin HPLC-DAD kromatogramı (292 nm)

Tablo 4.37: α-T içeren (200 IU/134,23 mg) Evicap® yumuşak kapsülün miktar tayini

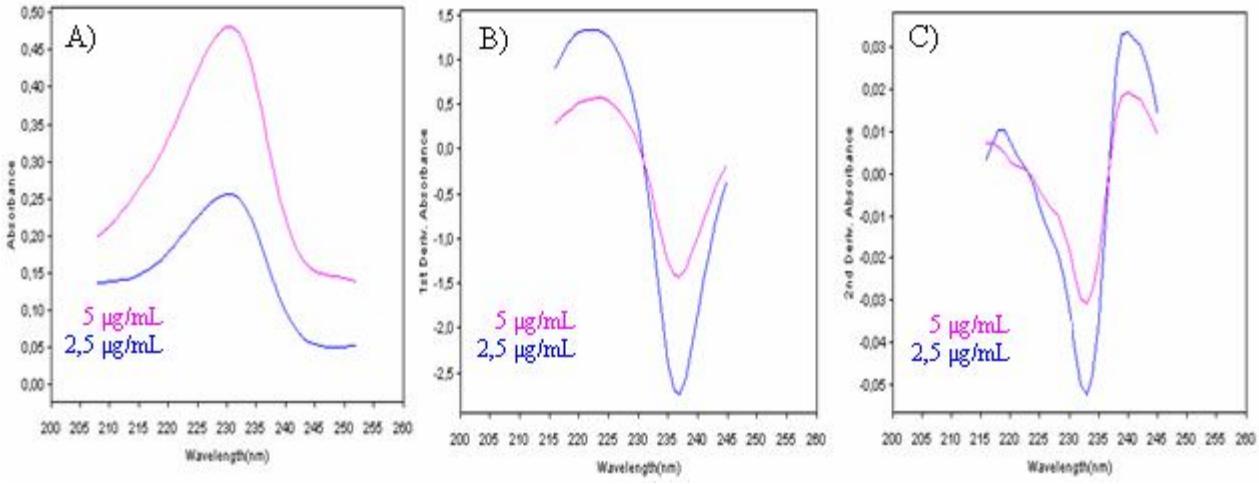
| Ticari Preparat | Yöntem | λ(nm) | n | Ortalama±SS (mg) | %Geri kazanım | %BSS | Güven Aralığı |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Evicap® Yumuşak kapsül | UV Görünür Bölge Spektrofotometri | 292 | 10 | 135,8±2,314 | 101,2 | 1,704 | 98,50-104,4 |
| | 1.Türev Spektrofotometri | 298 | 10 | 135,2±3,090 | 100,8 | 2,284 | 99,60-105,6 |
| | | 303 | 10 | 134,6±3,443 | 100,3 | 2,558 | 97,26-103,7 |
| | 2.Türev Spektrofotometri | 299 | 10 | 135,3±6,352 | 100,8 | 4,695 | 92,00-106,0 |
| | | 308 | 10 | 136,7±7,366 | 101,8 | 5,386 | 95,00-113,2 |
| | HPLC-DAD | 292 | 10 | 137,5±0,870 | 102,4 | 0,632 | 101,4-103,2 |

λ: dalga boyu, SS: standart sapma, % BSS: bağıl standart sapma (SS/ortalamax100)

### 4.4.1.3. Libavit K® Ampul (20 mg MBS / 2mL)

UV-Görünür Bölge, 1D- ve 2D- spektrofotometri yöntemlerinin uygulamasında 20 mg /2 mL MBS içeren Libavit K® ampul preparatının analizinde iki şekilde çözelti hazırlandı.

**1-)** 20 mg / 2 mL MBS içeren Libavit K® ampulden 2 mL alındı. 0,01 M HCl'de çözülerek 2,5 ve 5 µg/mL derişimlerde çözeltileri hazırlandı. Elde edilen çözeltinin UV-Görünür Bölge, 1D- ve 2D- spektrumları (Şekil 42A-C) alınarak absorbansları okundu. Absorbans değerleri ortalama kalibrasyon eğrisine konularak miktar analizleri gerçekleştirildi (Tablo 38).




Şekil 4.42: 2,5 ve 5 µg/mL derişimlerdeki Libavit K® ilaç çözeltilerinin: A) UV-Görünür Bölge spektrumları B) 1D- spektrumları C) 2D- spektrumları

Tablo 4.38: MBS içeren (20 mg) Libavit K® ampulün miktar tayini

| Ticari Preparat | Yöntem | λ(nm) | n | Ortalama±SS (mg) | %Geri kazanım | %BSS | Güven Aralığı |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Libavit K® ampul | UV Görünür Bölge Spektrofotometri | 230 | 12 | 19,66±0,717 | 98,32 | 3,647 | 91,69-102,6 |
| | 1.Türev Spektrofotometri | 224 | 12 | 17,53±1,190 | 87,65 | 6,785 | 81,24-101,6 |
| | | 236 | 12 | 18,64±1,230 | 93,23 | 6,598 | 86,90-94,24 |
| | 2.Türev Spektrofotometri | 233 | 12 | 19,01±1,169 | 95,08 | 6,148 | 85,35-103,3 |

λ: Dalga boyu, SS: Standart sapma, % BSS: Bağıl standart sapma (SS/ortalamax100)

**2-)** 20mg/2mL MBS içeren Libavit K® ampulden 2 mL (10 mg MBS 6,1 mg MN'ye eşdeğerdir.) alındı. 100 mL 0,01 M HCl'de çözüldü. MBS pH>11'de MN'ye dönüşmektedir (Şekil 3.1)[114]. pH'sı 12'ye NaOH ile ayarlanan $Na_2CO_3$ çözeltisi hazırlandı. İlaç çözeltisine $Na_2CO_3$ çözeltisi eklenerek çözeltinin pH'sı 9,50, 10,50, 11,10, 11,20, 11,30 ve 11,50'ye ayarlandı. Her bir pH'daki çözeltinin UV-Görünür Bölge, 1D- ve 2D- spektrumları alındı ve absorbansları okundu. Absorbans değerleri ortalama kalibrasyon eğrisine konularak miktar analizleri gerçekleştirildi (Tablo 4.39). En iyi değerler pH:11,30 da elde edildi.

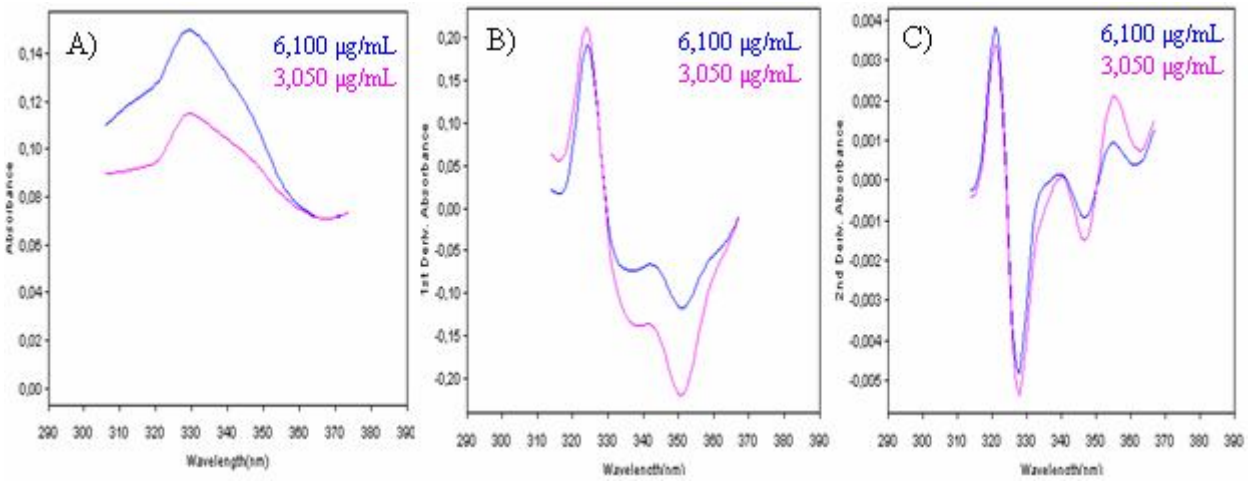
Tablo 4.39: MBS (6,1 mg MN) içeren Libavit K® ampulün farklı pH'larda miktar tayini

| Ticari Preparat | Yöntem | λ(nm) | pH | Bulunan (mg) | %Geri kazanım |
|---|---|---|---|---|---|
| Libavit K® ampul 6,1 mg menadion | UV Görünür Bölge Spektrofotometri | 330 | 9,50 | 2,205 | 42,42 |
| | | | 10,50 | 4,507 | 86,68 |
| | | | 11,10 | 5,071 | 97,53 |
| | | | 11,20 | 5,346 | 102,82 |
| | | | 11,30 | 5,702 | 109,6 |
| | | | 11,50 | 6,353 | 122,18 |
| | 1.Türev Spektrofotometri | 350 | 10,50 | 2,678 | 51,50 |
| | | | 11,10 | 4,284 | 82,4 |
| | | | 11,20 | 4,244 | 81,62 |
| | | | 11,30 | 4,711 | 90,60 |
| | | | 11,50 | 4,016 | 77,22 |

λ: Dalga boyu

MBS'nin MN'ye dönüşümü gerçekleştiren ideal pH değeri belirlendikten sonra, MN'un final derişimi 3,05 ve 6,10 μg/mL olacak şekilde Libavit K® ampul içeriği 0,01 M HCl ile çözüldü. Bölüm 3.4'de belirtildiği şekilde MBS MN'ye dönüştürülüp ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Elde edilen çözeltilerin UV-Görünür Bölge, 1D- ve 2D-

spektrumları (Şekil 4.43 A-C) alındı ve absorbansları okundu. Absorbans değerleri ortalama kalibrasyon eğrilerine konularak miktar tayini gerçekleştirildi (Tablo 4.40).




Şekil 4.43: 3,05 ve 6,10 µg/mL derişimlerdeki Libavit K® ilaç çözeltisinin: A) UV-Görünür Bölge spektrumları B) 1D- spektrumları C) 2D- spektrumları

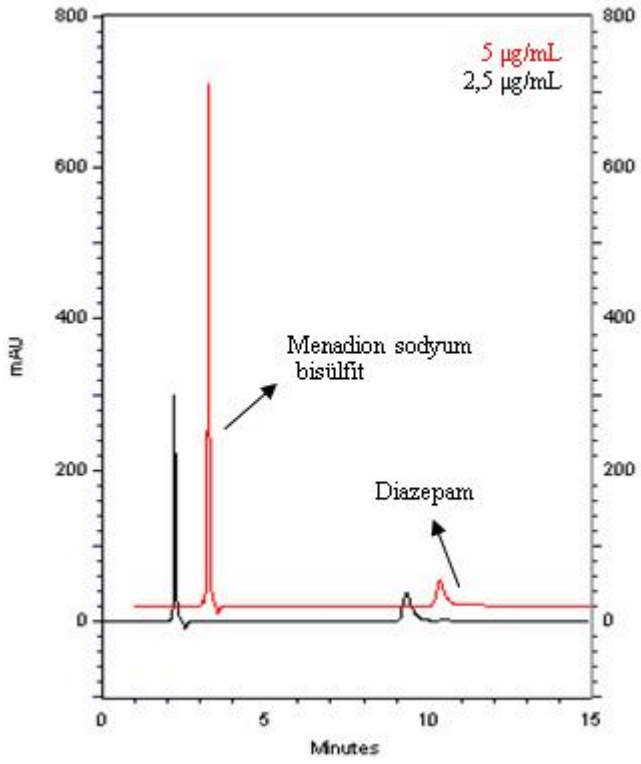
Tablo 4.40: MBS (20 mg) içeren Libavit K® ampulün miktar tayini

| Ticari Preparat | Yöntem | λ(nm) | n | Ortalama±SS (mg) | %Geri kazanım | %BSS | Güven Aralığı |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Libavit K® ampul | UV Görünür Bölge Spektrofotometri | 330 | 12 | 19,44±0,529 | 97,20 | 2,721 | 91,15-102,3 |
| | 1.Türev Spektrofotometri | 350 | 12 | 19,00±0,852 | 95,00 | 4,484 | 90,30-104,5 |
| | 2.Türev Spektrofotometri | 330 | 12 | 19,41±1,099 | 97,05 | 5,662 | 87,45-103,8 |
| | | 347 | 12 | 15,10±1,046 | 75,54 | 6,925 | 65,57-81,96 |
| | | 355 | 12 | 17,14±1,074 | 85,73 | 6,266 | 84,59-91,80 |

λ: dalga boyu, SS: standart sapma, % BSS: bağıl standart sapma (SS/ortalamax100)

HPLC-DAD uygulamasında, 20 mg / 2 mL MBS içeren Libavit K® ampul preparatının analizinde iki şekilde çözelti hazırlandı.

**1-)** 20mg/2mL MBS içeren Libavit K® ampulden 2 mL alındı. 100 mL deiyonize suda çözüldü. 2,5 µg/mL iç standart içerecek şekilde (Diazepam) 2,5 ve ve 5 µg/mL derişimlerde ilaç çözeltileri hazırlandı ve 20 µL HPLC-DAD sistemine enjekte edilerek kromatogramları alındı (Şekil 4.44) ve kromatogramlardan elde edilen pik alan oranları kalibrasyon eğrilerine konularak miktar analizleri gerçekleştirildi (Tablo 4.41).



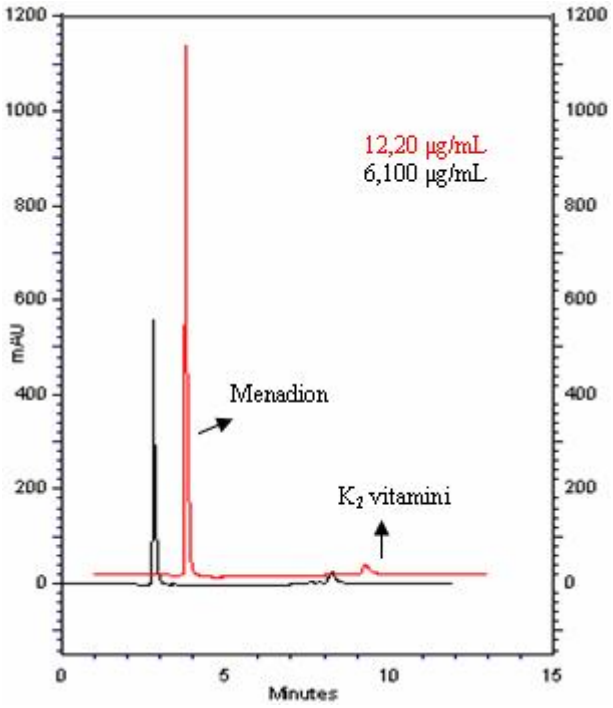

Şekil 4.44: 2,5 ve 5 µg/mL derişimlerdeki Libavit K® ilaç çözeltilerinin HPLC-DAD kromatogramı (230 nm)

Tablo 4.41: HPLC-DAD yöntemiyle MBS (20 mg) içeren Libavit K® ampulün miktar tayini

| Ticari Preparat | n | λ(nm) | Yöntem | Ortalama±SS (mg) | %Geri kazanım | % BSS | Güven Aralığı |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Libavit K® ampul | 6 | 230 nm | HPLC-DAD | 19,10±1,072 | 95,50 | 5,612 | 85,35-103,4 |

λ: dalga boyu, SS: standart sapma, % BSS: bağıl standart sapma (SS/ortalamax100)

**2-)** MBS'nin MN'ye dönüşümünün gerçekleştiği ideal pH değeri belirlendikten sonra, MN'nin final derişimi 6,10 ve 12,2 μg/mL olacak şekilde 0,01 M HCl çözeltisine MBS içeren Libavit K® çözeltisi eklendi. Bölüm 3.4'de belirtildiği şekilde MBS, MN'ye dönüştürülüp ekstraksiyonu gerçekleştirildi. İç standart olarak $K_2$ vitamini kullanıldı. Elde edilen çözeltiden 20 μL HPLC-DAD sistemine enjekte edilerek kromatogramları alındı (Şekil 4.45) ve kromatogramlardan elde edilen pik alan oranları kalibrasyon eğrilerine konularak miktar analizleri gerçekleştirildi (Tablo 4.42).




Şekil 4.45: 6,10 ve 12,25 μg/mL derişimlerde Libavit K® ilaç çözeltilerinin HPLC-DAD kromatogramı (330 nm)

Tablo 4.42: HPLC-DAD yöntemiyle MBS (20 mg) içeren Libavit K® ampulün miktar tayini

| Ticari Preparat | n | λ(nm) | Yöntem | Ortalama±SS (mg) | %Geri kazanım | % BSS | Güven Aralığı |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Libavit K® ampul | 6 | 330 nm | HPLC-DAD | 19,43±0,858 | 97,15 | 4,415 | 87,45-105,2 |

λ: dalga boyu, SS: standart sapma, % BSS: bağıl standart sapma (SS/ortalamax100)

### 4.4.1.4. Farmasötik Preparatlarda Elde Edilen Verilerin İstatiksel Analizi

Farmasötik preparatlarda β-K, α-T, MBS'nin miktar tayini için uygulanan HPLC-DAD, UV-Görünür Bölge, 1D- ve 2D-Spektrofotometri yöntemlerinin, birbiriyle karşılaştırılması amacıyla *F*-testi yapıldı (Tablo 4.43).

Tablo 4.43: Farmasötik preparatlarda β-K, α-T, MBS'nin belirlenmesi için uygulanan yöntemlerin birbirleri ile karşılaştırılması (*F*-testi)

| Etkin madde | λ(nm) | Yöntem | n | Ortalama±SS | *F* değeri | P değeri |
|---|---|---|---|---|---|---|
| β-K | 452/245 | HPLC-DAD | 6 | 20,39±0,480 | 0,947 | 0,437 |
| | 477 | UV Görünür Bölge Spektrofotometri | 6 | 20,30±0,292 | | |
| | 496 | 1.Türev Spektrofotometri | 6 | 20,55±0,461 | | |
| | 484 | 2.Türev Spektrofotometri | 6 | 20,62±0,159 | | |
| α-T | 292 | HPLC-DAD | 10 | 137,5±0,870 | 1,103 | 0,360 |
| | 292 | UV Görünür Bölge Spektrofotometri | 10 | 135,8±2,314 | | |
| | 303 | 1.Türev Spektrofotometri | 10 | 134,6±3,443 | | |
| | 299 | 2.Türev Spektrofotometri | 10 | 135,3±6,352 | | |
| MBS | 230 | HPLC-DAD | 12 | 19,09±0,970 | 1,960 | 0,134 |
| | 230 | UV Görünür Bölge Spektrofotometri | 12 | 19,66±0,717 | | |
| | 236 | 1.Türev Spektrofotometri | 12 | 18,64±1,230 | | |
| | 233 | 2.Türev Spektrofotometri | 12 | 19,01±1,169 | | |
| MBS'nin MN'ye dönüştürülerek yapılan analizi | 330 | HPLC-DAD | 12 | 19,85±0,726 | 2,150 | 0,107 |
| | 330 | UV Görünür Bölge Spektrofotometri | 12 | 19,44±0,529 | | |
| | 350 | 1.Türev Spektrofotometri | 12 | 19,00±0,852 | | |
| | 330 | 2.Türev Spektrofotometri | 12 | 19,41±1,099 | | |

n: analiz sayısı, SS: Standart sapma, P>0,05'de istatistiksel bir fark yoktur

### 4.4.2. Geliştirilen Yöntemlerin Gerçek Numunelere Uygulanması

Plazma çalışmasında geliştirilen ve geçerlilik testleri yapılan yöntemlerin uygulanabilir olduğunu görmek amacıyla tavşan ve sağlıklı gönüllüler ile mesane kanserli hastaların plazmalarında β-K, retinol, α-T ve MN'nin miktar analizleri gerçekleştirildi.

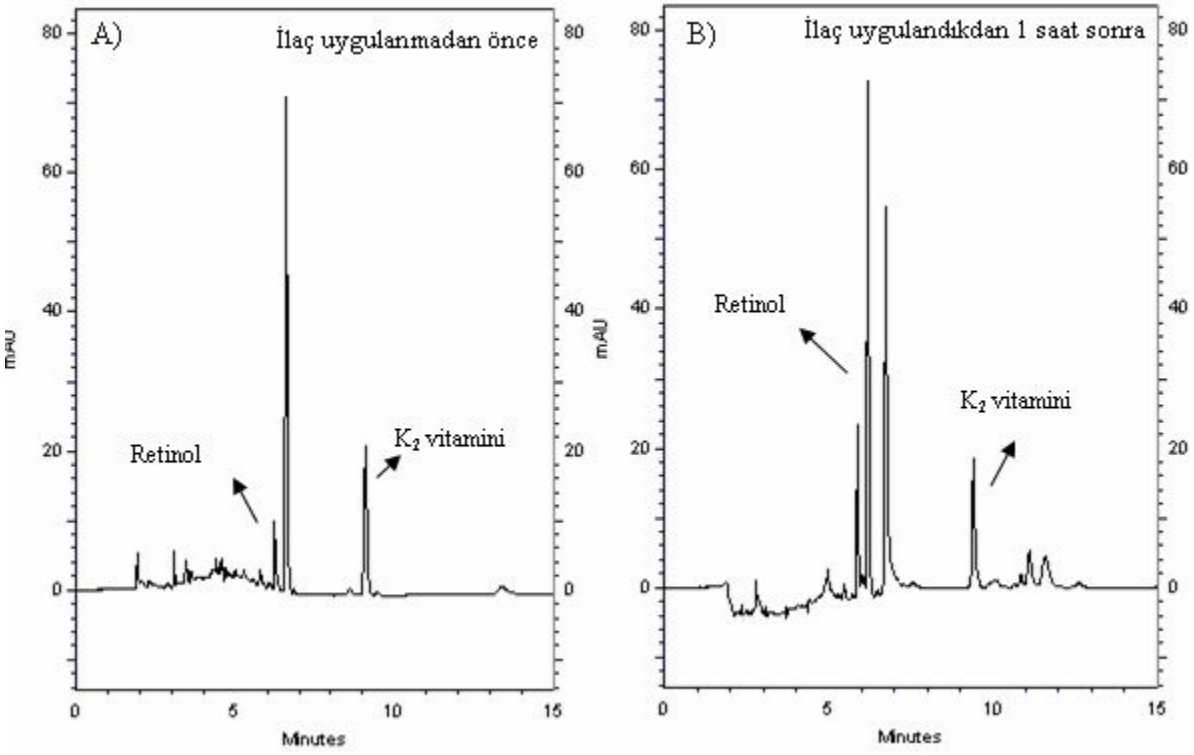
#### 4.4.2.1.Tavşanlarda β-K, Retinol, α-T ve MN'nin Farmakokinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

Çalışmada, β-K, α-T ve MBS etkin maddelerini içeren farmasötik preparatlar tavşanlara ayrı ayrı uygulandıktan sonra tavşanlardan belirli sürelerde alınan kan örneklerinde bu etkin maddelerin plazma seviyeleri geliştirilen ve geçerlilik testleri yapılan yöntemlerle belirlendi.

##### 4.4.2.1.1. Tavşanda β-K Çalışması

100 mg β-K olacak şekilde 5 adet Carovit® (20mg/kapsül) yumuşak kapsül tek doz oral olarak yaklaşık 4 kg New Zealand cinsi beyaz sağlıklı tavşana uygulandı. β-K çözeltisi verilmeden önce ve verildikten sonra 0,33, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 6 ve 8'inci saatlerde tavşanın kulaklarındaki damarlardan 1 mL kan EDTA içeren ve ışıktan korunan plastik tüpler içerisine alındı. Alınan kanlar 3000 g ve 15 dak.'da santrifüjlenerek plazmaları ayrıldı ve analiz edilinceye kadar -70°C'de depolandı. Plazma örnekleri Bölüm 3.4'de belirtildiği şekilde ekstraksiyonları yapıldı. Ekstraktlar HPLC-DAD sistemine enjekte edildi. β-K ile ilgili herhangi bir pike rastlanmadı. Literatür taramasında β-K vücutta retinole dönüştüğü bilgisine ulaşınca ekstraktlarda retinol analizi yapıldı[68,70]. Şekil 4.46'da tavşan plazmasından ekstrakte edilen retinolün kromatogramları verildi. Kromatogramlardan pik alan oranları kalibrasyon eğrisine

konularak derişim-zaman eğrisi elde edildi (Şekil 4.47). Elde edilen derişim-zaman eğrisinden ilacın farmakokinetik parametreleri belirlendi (Tablo 4.44).

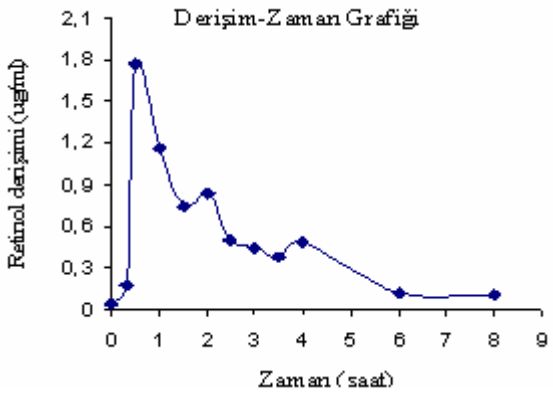



Şekil 4.46: Carovit® ilacı (100 mg β-K) verilen tavşan plazmalarının HPLC-DAD kromatogramları A) İlaç uygulanmadan önce B) İlaç uygulandıktan 1 saat sonra

Tablo 4.44: Carovit ilacı (100 mg β-K) verilen tavşanda (n=1) retinolün farmakokinetik parametreleri

| Farmakokinetik Parametreler | Tavşan |
|---|---|
| $T_{max}$ (saat) | 1,000 |
| Cmax (µg/mL) | 1,126 |
| CL (L/saat) | 42,13 |
| $T_{1/2}$ (saat) | 15,61 |
| kel ($sa^{-1}$) | 0,044 |
| $AUC_{0-8}$ (µg.saat/mL) | 3,327 |
| $AUC_{0-\infty}$ (µg.saat/mL) | 4,747 |

$t_{max}$: maksimum zaman, $C_{max}$: maksimum derişim, $AUC_{0-8}$: eğri altındaki alan (0-8 saat arası), $AUC_{0-\infty}$: eğri altındaki alan (0-∞ saat arası) $t_{1/2}$: yarı ömür, CL: klerens, kel: eliminasyon sabiti

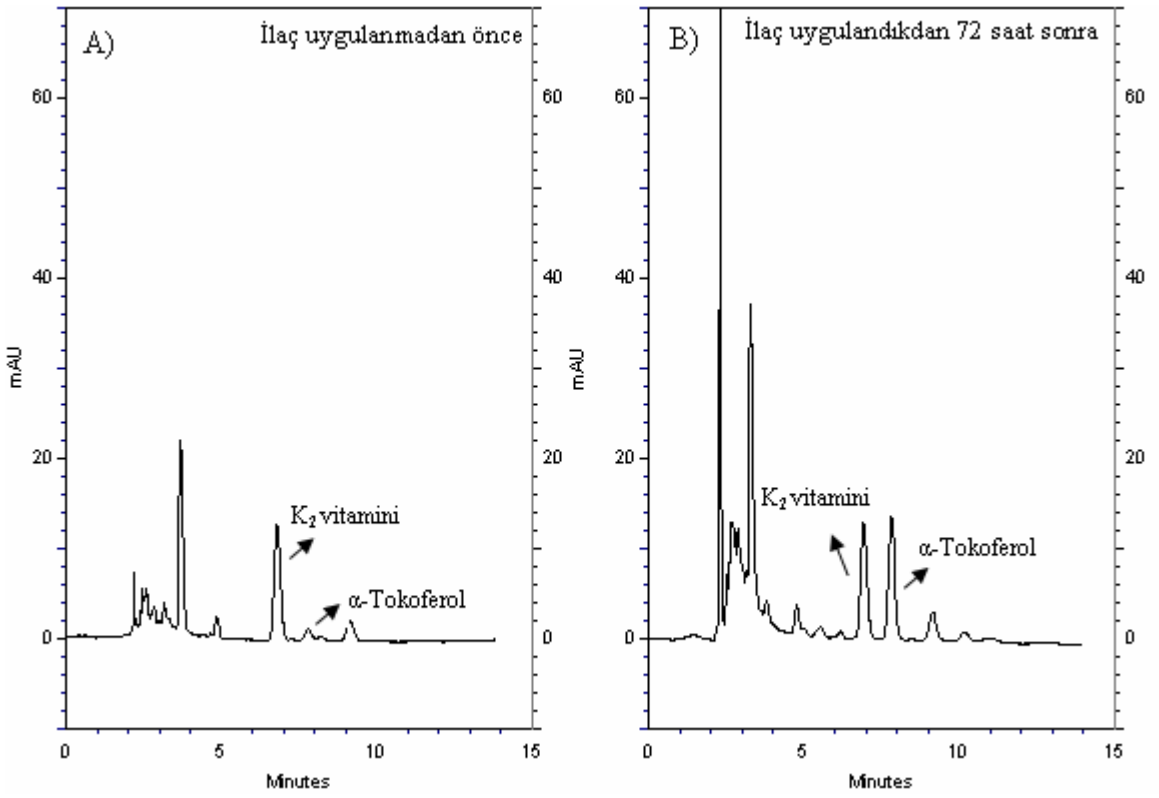



Şekil 4.47: Carovit® ilacı (100 mg β-K) verilen tavşan plazmasında retinolün derişim-zaman grafiği

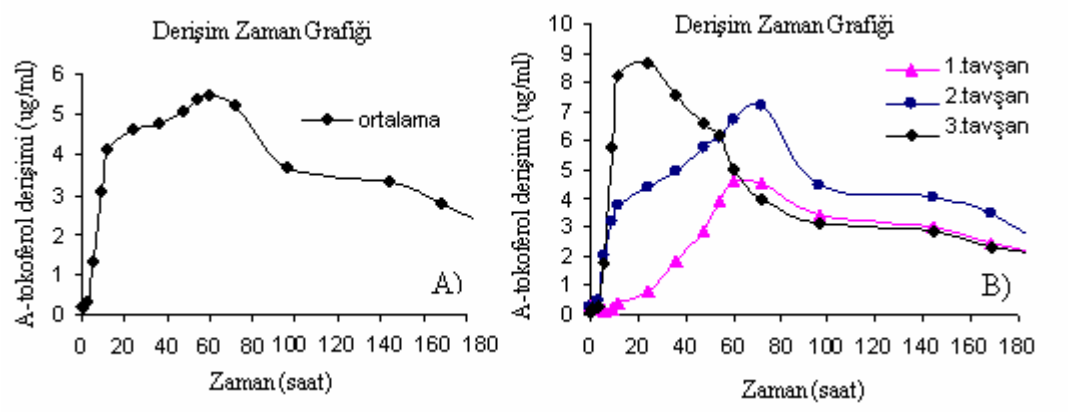
#### 4.4.2.1.2. Tavşanlarda α-T Çalışması

α-T içeren bir adet Evicap® yumuşak kapsül (400 IU / kapsül) tek doz oral olarak ortalama 4 kg New Zealand cinsi üç adet beyaz sağlıklı tavşana uygulandı. İlaç verilmeden önce ve verildikten sonra ki 0,5, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 54, 60, 72, 96, 144 ve 168'inci saatlerde tavşanın kulaklarındaki damarlardan 1 mL kan EDTA içeren ve ışıktan korunan plastik tüpler içerisine alındı. Alınan kanlar 3000 g ve 15 dak.'da santrifüjlenerek plazmaları ayrıldı ve analiz edilinceye kadar -70°C'de depolandı. Alınan plazma örnekleri Bölüm 3.4'de belirtildiği şekilde ekstraksiyonları yapıldı.

Elde edilen ekstraktlar HPLC-DAD sistemine enjekte edildi ve kromatogramları alındı (Şekil 4.48A-B) ve pik alan oranları kalibrasyon eğrisine konularak derişim-zaman eğrileri elde edildi (Şekil 4.49A-B). Elde edilen derişim-zaman eğrilerinden ilacın farmakokinetik parametreleri belirlendi ve bu değerler Tablo 4.45'de verildi.




Şekil 4.48: Evicap® ilacı (400 IU α-T / kapsül) verilen ikinci tavşan plazmasının HPLC-DAD kromatogramları A) İlaç uygulanmadan önce B) İlaç uygulandıktan 72 saat sonra




Şekil 4.49: Evicap® ilacı verilen tavşan plazmasında HPLC-DAD yöntemi ile α-T derişim zaman grafikleri A) Üç tavşanın ortalama derişim-zaman grafiği B) Üç tavşanın ayrı ayrı derişim-zaman grafiği

Tablo 4.45: Evicap ilacı (400 IU α-T / kapsül) verilen tavşanlarda (n=3) α-T'nin farmakokinetik parametreleri

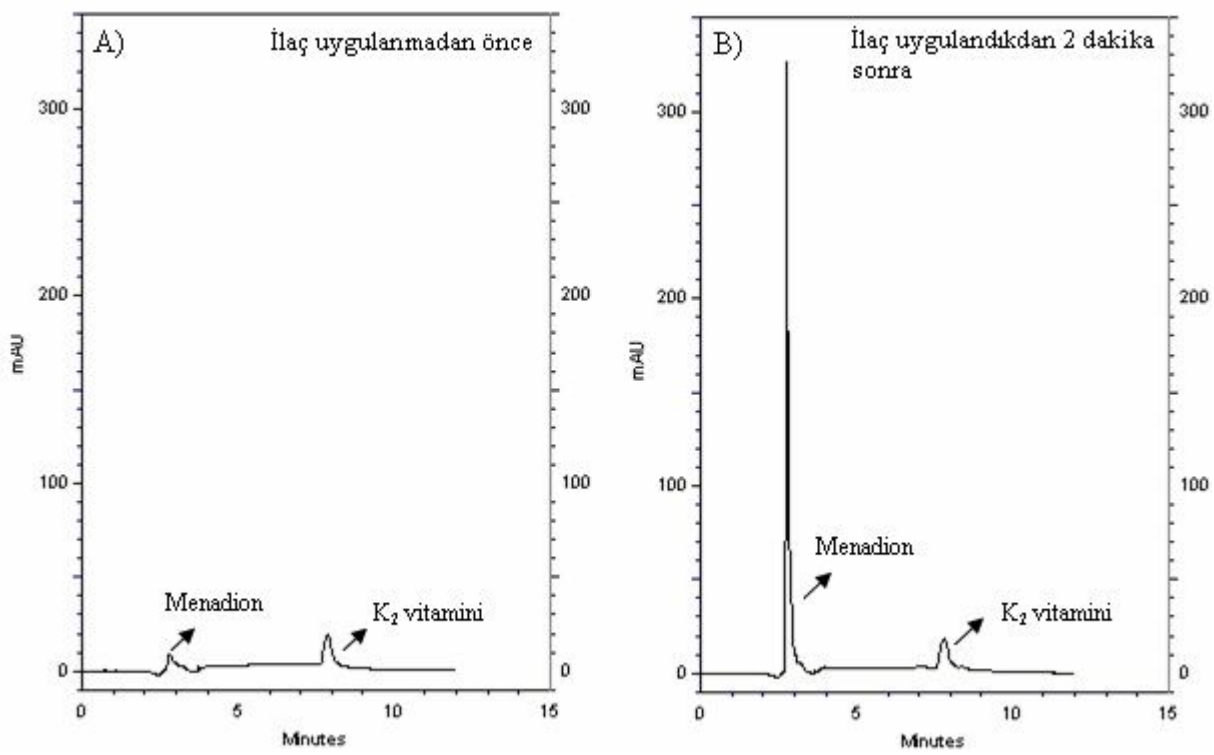
| Farmakokinetik Parametreler/Tavşan | 1 | 2 | 3 | Ortalama±SS |
|---|---|---|---|---|
| $T_{max}$ (saat) | 60,000 | 72,000 | 24,000 | 52,000±24,980 |
| Cmax (μg/mL) | 4,6203 | 7,1735 | 8,6482 | 6,8140±2,0378 |
| CL (L/saat) | 0,2994 | 0,2068 | 0,2603 | 0,2554±0,0464 |
| $T_{1/2}$ (saat) | 121,58 | 97,605 | 79,655 | 99,613±21,033 |
| kel ($sa^{-1}$) | 0,0057 | 0,0071 | 0,0087 | 0,0071±0,0015 |
| $AUC_{0-168}$ (μg.saat/mL) | 468,73 | 808,54 | 761,86 | 679,71±184,20 |
| $AUC_{0-\infty}$ (μg.saat/mL) | 896,76 | 1298,2 | 1031,4 | 1075,4±204,30 |

$t_{max}$: maksimum zaman, $C_{max}$: maksimum derişim, $AUC_{0-168}$: eğri altındaki alan (0-168 saat arası), $AUC_{0-\infty}$: eğri altındaki alan (0-∞ saat arası) $t_{1/2}$: yarı ömür, CL: klerens, kel: eliminasyon sabiti, SS: standart sapma

#### 4.4.2.1.3. Tavşanlarda MBS (MN) Çalışması

100 mg MBS içerecek şekilde 5 adet Libavit K® ampul (20mg MBS/2ml) tek doz intravenöz (iv) olarak ortalama 4 kg New Zealand cinsi üç adet beyaz sağlıklı tavşana uygulandı. İlaç verilmeden önce ve verildikten sonra ki 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 60, 90, 120, 150 ve 180 inci dak.larda tavşanın kulaklarındaki damarlardan 1 mL kan alındı. Ayrıca kontrol amaçlı olarak ilaç verilmeyen bir tavşandan çalışılan aynı sürelerde kan örnekleri alındı. Kanlar EDTA içeren ve ışıktan korunan plastik tüpler içerisine alındı. Alınan kanlar 3000 g ve 15 dak.'da santrifüjlenerek plazmaları ayrıldı ve analiz edilinceye kadar -70°C'de depolandı. Alınan plazma örnekleri Bölüm 3.4'de belirtildiği şekilde MBS plazmada MN'ye dönüştürülüp ekstraksiyonları yapıldı.

Elde edilen ekstraktlar HPLC-DAD sistemlerine enjekte edildi ve kromatogramları alındı (Şekil 4.50A-B) ve pik alan oranları kalibrasyon eğrisine konularak derişim-zaman eğrileri elde edildi (Şekil 4.51A-C). Elde edilen derişim-zaman eğrilerinden ilacın farmakokinetik parametreleri belirlendi ve bu değerler Tablo 4.46'da verildi.

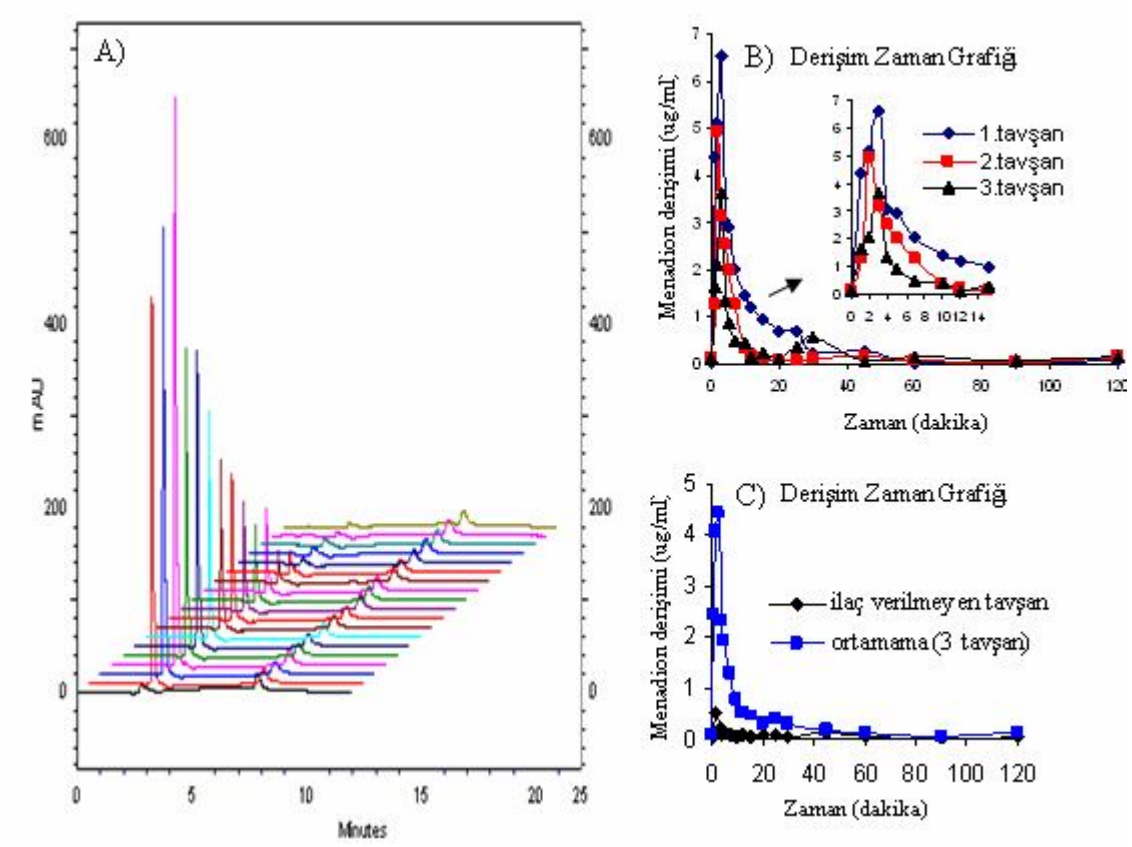



Şekil 4.50: Libavit K® ilacı (100 mg / 10 ml) verilen ikinci tavşan plazmasının HPLC-DAD kromatogramları A) İlaç uygulanmadan önce B) İlaç uygulandıktan 2 dak. sonra

Tablo 4.46: Libavit K ilacı (100 mg / 10ml) verilen tavşanlarda (n=3) MN'nin farmakokinetik parametreleri

| Farmakokinetik Parametreler/Tavşan | 1 | 2 | 3 | Ortalama±SS |
|---|---|---|---|---|
| $T_{max}$ (dak.) | 3,0000 | 2,0000 | 3,0000 | 2,6666±0,5735 |
| Cmax (µg/mL) | 6,5559 | 4,9544 | 3,6376 | 5,0493±1,4614 |
| CL (L/dak.) | 1,6685 | 2,9403 | 2,7465 | 2,4515±0,6852 |
| $T_{1/2}$ (dak.) | 28,170 | 55,000 | 44,140 | 42,436±13,495 |
| kel ($dak.^{-1}$) | 0,0246 | 0,0126 | 0,0157 | 0,0176±0,0062 |
| $AUC_{0-120}$ (µg.dak./mL) | 57,250 | 30,017 | 30,787 | 39,351±15,505 |
| $AUC_{120-\infty}$ (µg.dak./mL) | 2,6853 | 3,9920 | 5,6234 | 4,1002±1,4720 |
| $AUC_{0-\infty}$ (µg.dak./mL) | 59,935 | 34,009 | 36,410 | 43,451±14,325 |

*: $AUC_{0-20}$, **: $AUC_{20-\infty}$, $t_{max}$: maksimum zaman, $C_{max}$: maksimum derişim, $AUC_{0-120}$: eğri altındaki alan (0-120 dak. arası), $AUC_{0-\infty}$: eğri altındaki alan (0-∞ saat arası) $t_{1/2}$: yarı ömür, CL: klerens, kel: eliminasyon sabiti, SS: standart sapma




Şekil 4.51: Libavit K® ilacı verilen tavşan plazmasında HPLC-DAD yöntemi ile MN derişim zaman grafikleri A) Birinci tavşanın 0-180 dak. kromatogramı B) Üç tavşanın ayrı ayrı derişim-zaman grafiği C) Üç tavşanın ortalama derişim-zaman grafiği

### 4.4.2.2. Sağlıklı Gönüllü ve Mesane Kanserli Kişilerde β-K, Retinol, α-T ve MN Plazma Seviyelerinin Belirlenmesi

β-K, α-T ve MBS etkin maddelerini içeren farmasötik preparatlar tek doz olarak sağlıklı gönüllülere ve mesane kanserli hastalara verilerek belirli sürelerde alınan kan örneklerinde β-K, retinol, α-T ve MN plazma seviyeleri, geliştirilen ve geçerlilik testleri yapılan yöntemlerle belirlendi.

#### 4.4.2.2.1. Numune Alımı Protokolü ve Deneklere Ait Özellikler

Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurulundan çalışma onayı alındıktan sonra sağlıklı gönüllülerde ve Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji servisinde yatan mesane kanserli hastalarda çalışma gerçekleştirilmiştir. Sağlıklı

gönüllülerde çalışmaya başlamadan önce sağlık kontrolleri Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim dalıyla işbirliği yapılarak gerçekleştirilmiştir. Sağlıklı gönüllüler daha önce önemli bir rahatsızlık geçirmemiş olan kişilerden seçilmiş olup bu kişilerin karaciğer ve böbrek fonksiyon testleri incelenerek sağlık kontrolleri gerçekleştirilmiş ve çalışmaya alınıp alınmamaları ile ilgili onay klinisyen hekim tarafından yapılmıştır. Ayrıca deneklere çalışma hakkında yazılı ve sözlü bilgi verildikten sonra gönüllü olarak çalışmaya katıldıkları yazılı bir protokol ile tespit edilmiştir. Her üç ilaç için çalışmaya alınan gönüllü kişilerin özellikleri Tablo 4.47'de verilmiştir.

Tablo 4.47: Çalışmaya alınan sağlıklı ve mesane kanserli gönüllü kişilerin özellikleri

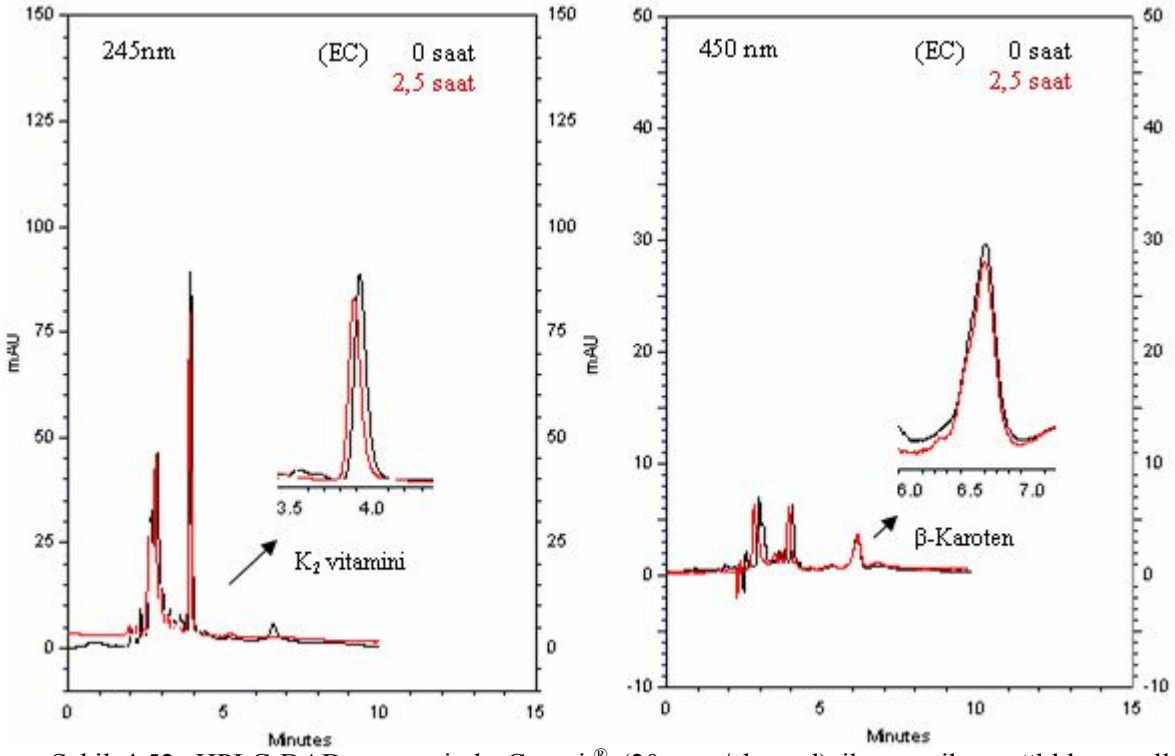
| Sağlıklı Gönüllü Kişiler | | | | | Mesane Kanserli Gönüllü Kişiler | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| β-K içeren 1 adet Carovit yumuşak kapsül ( 20 mg) | | | | | | | | | |
| İsim | C | Yaş(yıl) | Ağırlık(kg) | Boy (cm) | İsim | C | Yaş(yıl) | Ağırlık(kg) | Boy (cm) |
| FD | K | 29 | 48 | 164 | NK(i) | E | 56 | 95 | 167 |
| TD | K | 24 | 54 | 170 | HY(i) | E | 58 | 62 | 170 |
| OŞ | E | 24 | 51 | 172 | KT(y) | K | 56 | 80 | 157 |
| MA | E | 27 | 63 | 178 | HU(y) | E | 66 | 70 | 180 |
| EÇ | K | 26 | 69 | 155 | ŞS (y) | E | 57 | 72 | 170 |
| BP | K | 24 | 65 | 170 | MV(y) | E | 68 | 65 | 175 |
| X±SS | | 25,6±2,06 | 58,3±8,47 | 168±7,85 | …, | … | 60,1±5,38 | 74,0±12,0 | 169±7,78 |
| α-T içeren 1 adet Evicap® yumuşak kapsül ( 200 IU) | | | | | | | | | |
| FD | K | 29 | 48 | 164 | HS(y) | E | 55 | 75 | 172 |
| OŞ | E | 24 | 51 | 172 | BZ(i) | E | 47 | 67 | 171 |
| ÖM | E | 27 | 67 | 185 | FA(y) | E | 48 | 66 | 165 |
| GD | K | 27 | 55 | 170 | FK(y) | K | 58 | 75 | 165 |
| DA | E | 26 | 71 | 173 | KÇ(y) | E | 56 | 65 | 168 |
| AK | E | 28 | 76 | 183 | LT(i) | E | 65 | 55 | 145 |
| X±SS | | 26,8±1,72 | 61,3±11,5 | 174±8,02 | …, | … | 54,8±6,67 | 67,1±7,44 | 164±9,91 |
| 2 adet Libavit K® ampul (40 mg) | | | | | | | | | |
| FD | K | 29 | 48 | 164 | SA(y) | E | 75 | 85 | 170 |
| MÖ | E | 30 | 90 | 181 | HA(i) | E | 69 | 73 | 169 |
| NK | K | 29 | 54 | 163 | HC(y) | E | 61 | 60 | 170 |
| SS | K | 30 | 61 | 160 | NK(i) | E | 58 | 78 | 166 |
| ÖM | E | 27 | 67 | 175 | SC(i) | E | 51 | 70 | 175 |
| GG | K | 25 | 53 | 166 | CA(i) | E | 52 | 70 | 179 |
| X±SS | | 28,3±1,96 | 62,1±15,1 | 168±8,08 | …, | … | 61,0±9,48 | 72,6±8,43 | 171±4,68 |

C:Cinsiyet, X:ortalama, SS: Standart sapma, K: kadın, E: erkek, y: yüzeysel TM, i: invaziv TM

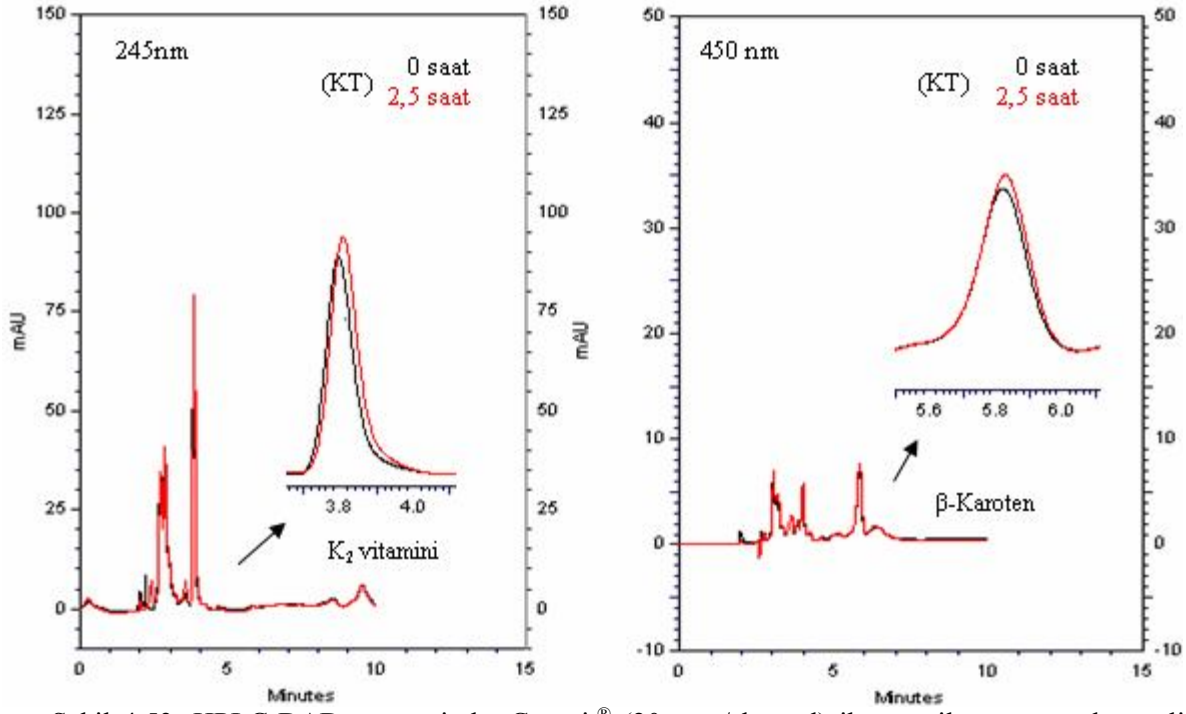
#### 4.4.2.2.2. Sağlıklı Gönüllülerde ve Mesane Kanserli Hastalarda β-K Çalışması

Yaşları 24-29 arasında değişen 4 bayan 2 erkek olmak üzere toplam 6 sağlıklı gönüllü ve Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalında mesane kanseri teşhisi koyulmuş ve üroloji servisinde yatan yaşları 56-68 arasında değişen 1 bayan 5 erkek olmak üzere toplam 6 hasta çalışmaya alındı. Çalışmada denekler, deneyden önceki günün akşamında saat $24^{00}$ den itibaren yemek yememiş ve sabah $8^{00}$ de 20 mg'lık β-K içeren piyasa preparatını (Carovit® yumuşak kapsül) 100 mL su ile almışlardır. Denekler ilacı aldıktan sonra sıvı almalarına ve 2,5 saat sonra yemek yemelerine izin verildi. Oral yoldan ilaç uygulanmadan hemen önce ve 2,5 saat sonra 1 mL kan örneği EDTA'lı tüplere alındı. Kan örnekleri 4500 rpm de 10 dak. santrifüjlenerek plazmaları ayrıldı ve analiz edilinceye kadar -70°C'de derin dondurucuda saklandı.

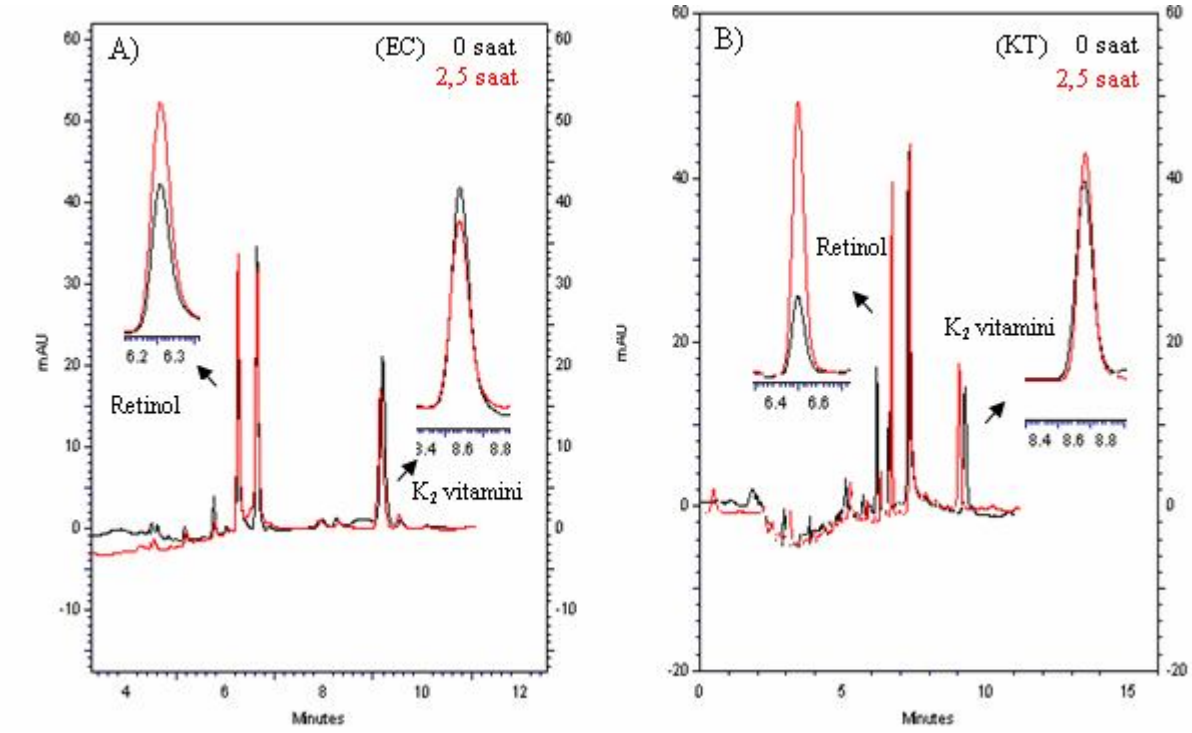
Bölüm 3.4'de verilen yöntemlerle alınan plazma örnekleri ekstrakte edilerek HPLC-DAD sistemine enjekte edildi ve kromatogramları alındı. Sağlıklı ve mesane kanserli gönüllü kişilerde, β-K ve retinol analizi sonucu elde edilen kromatogramlar ve plazma derişimleri aşağıdaki şekillerde ve tablolarda verildi (Şekil 4.52A-B, 4.53A-B, 4.54A-B ve 4.55A-D; Tablo 4.48) ve her iki gruptan elde edilen veriler istatiksel (*t*-testi) olarak karşılaştırıldı (Tablo 4.49).




Şekil 4.52: HPLC-DAD yönteminde Carovit® (20 mg / kapsül) ilacı verilen sağlıklı gönüllü kişilerden EC'nin ilaç uygulanmadan önce ve 2,5 saat sonra β-K plazma kromatogramları




Şekil 4.53: HPLC-DAD yönteminde, Carovit® (20 mg / kapsül) ilacı verilen mesane kanserli hastalardan KT'nin ilaç uygulanmadan önce ve 2,5 saat sonra β-K plazma kromatogramları

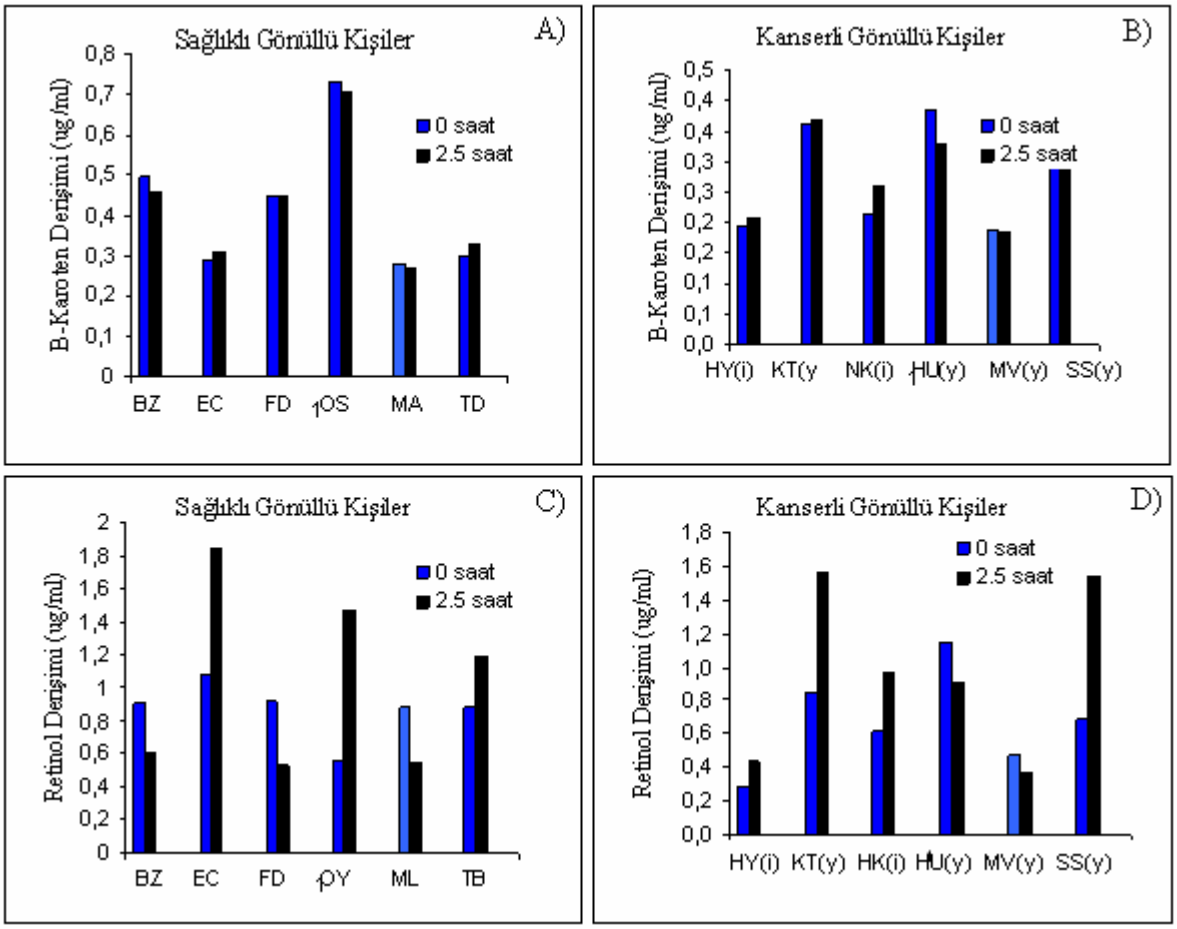



Şekil 4.54: HPLC-DAD yönteminde, Carovit® (20 mg / kapsül) ilacı verilen kişilerin ilaç uygulanmadan önce ve 2,5 saat sonra retinol plazma kromatogramları A) Sağlıklı gönüllü EC B) Mesane kanserli hasta KT

Tablo 4.48: β-K içeren Carovit® (20 mg / kapsül) ilacı sağlıklı gönüllülere ve mesane kanserli hastalara oral olarak uygulandıktan sonra HPLC-DAD yöntemi ile elde edilen β-K ve retinol derişimleri

| | | Retinol (µg/mL) | | β-K(µg/mL) | |
|---|---|---|---|---|---|
| Zaman (saat) | | 0 saat | 2,5 saat | O, saat | 2,5 saat |
| Sağlıklı Gönüllü Kişiler | FD | 0,9205 | 0,5314 | 0,4479 | 0,4471 |
| | TD | 0,8769 | 1,1914 | 0,2879 | 0,3316 |
| | OŞ | 0,5500 | 1,4656 | 0,7323 | 0,7059 |
| | MA | 0,8845 | 0,5382 | 0,2800 | 0,2685 |
| | EÇ | 1,0847 | 1,8426 | 0,3011 | 0,3111 |
| | BP | 0,9011 | 0,6069 | 0,4936 | 0,4597 |
| X±SS | | 0,869±0,175 | 1,029±0,555 | 0,424±0,176 | 0,420±0,159 |
| Mesane Kanserli Gönüllü Kişiler | HY | 0,2849 | 0,4370 | 0,1937 | 0,2068 |
| | KT | 0,8409 | 1,5689 | 0,3628 | 0,3679 |
| | HK | 0,6140 | 0,9742 | 0,2157 | 0,2589 |
| | HU | 1,1453 | 0,9021 | 0,3838 | 0,3283 |
| | MV | 0,4793 | 0,3703 | 0,1896 | 0,1849 |
| | SS | 0,6918 | 1,5367 | 0,3555 | 0,3285 |
| X±SS | | 0,679±0,297 | 0,964±0,515 | 0,283±0,092 | 0,279±0,074 |

X: ortalama, SS: standart sapma




Şekil 4.55: β-K içeren Carovit® (20 mg / kapsül) ilacı sağlıklı gönüllülere ve mesane kanserli hastalara oral olarak uygulandıktan sonra HPLC-DAD yöntemi ile elde edilen β-K ve retinol derişimleri

Tablo 4.49: β-K içeren Carovit® (20 mg / kapsül) ilacı sağlıklı gönüllülere ve mesane kanserli hastalara oral olarak uygulandıktan sonra her iki gruptan elde edilen verilerin istatistiksel (*t*-testi) olarak karşılaştırılması

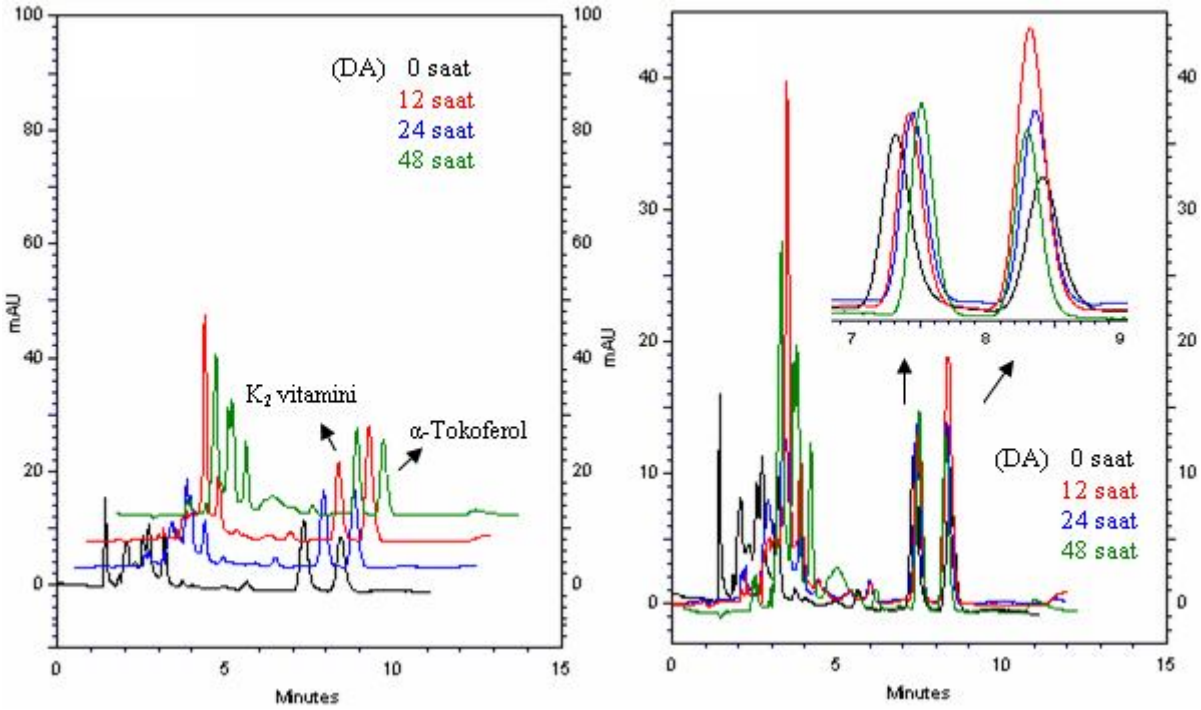
| Etkin madde | Yöntem | T (saat) | Gönüllü Kişiler | n | X±SS | *t* değeri | P değeri | Etki boyutu |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Retinol | HPLC-DAD | 0 | sağlıklı | 6 | 0,869±0,174 | 1,374 | 0,199 | % 58,9 ( -1,10) |
| | | | mesane kanseri | 6 | 0,679±0,297 | | | |
| | | 2,5 | sağlıklı | 6 | 1,029±0,555 | 0,208 | 0,839 | %7,7 (-0,10) |
| | | | mesane kanseri | 6 | 0,964±0,515 | | | |
| β-K | HPLC-DAD | 0 | sağlıklı | 6 | 0,424±0,176 | 1,727 | 0,115 | % 47,4 (-0,80) |
| | | | mesane kanseri | 6 | 0,283±0,092 | | | |
| | | 2,5 | sağlıklı | 6 | 0,420±0,159 | 1,975 | 0,076 | %51,6 (-0,90) |
| | | | mesane kanseri | 6 | 0,279±0,074 | | | |

T: zaman (saat), n: gönüllü kişi sayısı, X: ortalama, SS: standart sapma, P>0,05'de istatistiksel bir fark yoktur

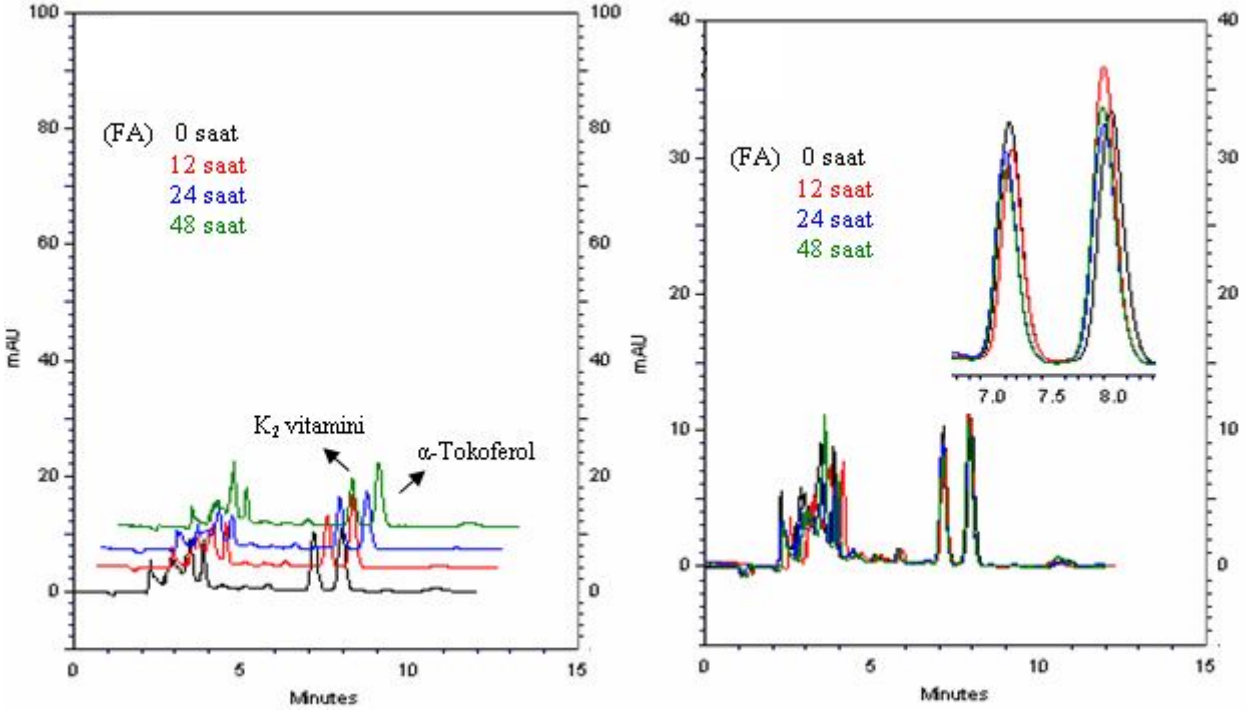
#### 4.4.2.2.3. Sağlıklı Gönüllülerde ve Mesane Kanserli Hastalarda α-T Çalışması

Yaşları 24-29 arasında değişen 2 bayan 4 erkek olmak üzere toplam 6 sağlıklı gönüllü ve Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalında mesane kanseri teşhisi koyulmuş ve üroloji servisinde yatan yaşları 47-65 arasında değişen 1 bayan 5 erkek olmak üzere toplam 6 hasta çalışmaya alındı. Çalışmada denekler, deneyden önceki günün akşamında saat $24^{00}$ den itibaren yemek yememişler ve sabah saat $8^{00}$ de 268,26 mg'lık α-T içeren piyasa preparatını (Evicap) 100 mL su ile almışlardır. Denekler ilacı aldıktan sonra sıvı almalarına ve 4 saat sonra yemek yemelerine izin verildi. Oral yoldan ilaç uygulanmadan hemen önce ve 12, 24 ve 48'inci saatlerinde 1 mL kan örnekleri EDTA'lı tüplere alındı. Kan örnekleri 3000g ve 7 dak. santrifüjlenerek plazmaları ayrıldı ve analiz edilinceye kadar –70°C de derin dondurucuda saklandı.

Alınan plazma örneklerinin analizi için Bölüm 3.4'de belirtilen yöntemlerle ekstraksiyonları yapılarak 20 µl HPLC-DAD sistemine enjekte edildi ve kromatogramları alındı. Sağlıklı gönüllülerin ve mesane kanserli hastaların her iki yöntemle analiz sonucunda elde edilen kromatogramlar ve plazma derişimleri aşağıdaki şekil ve tablolarda verildi (Şekil 4.56A-B, 4.57A-B, 4.58A-B; Tablo 4.50). HPLC-DAD yöntemi ile her iki grubtan (sağlıklı ve mesane kanserli) elde edilen veriler istatiksel (*t*-testi) olarak analiz edilerek birbirleriyle karşılaştırıldılar (Tablo 4.51).




Şekil 4.56: HPLC-DAD yönteminde Evicap® (268,46 mg / kapsül) ilacı verilen sağlıklı gönüllü kişilerden DA'nın ilaç uygulanmadan önce ve sonra 12, 24 ve 48'inci saatlerdeki α-T plazma kromatogramları

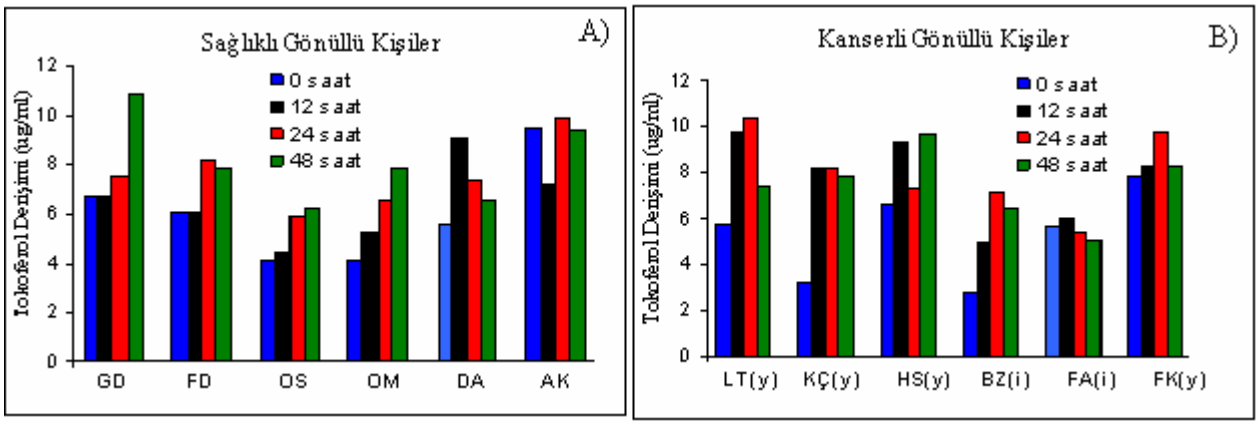



Şekil 4.57: HPLC-DAD yönteminde Evicap® (268,46 mg / kapsül) ilacı verilen mesane kanserli hastalardan FA'nın ilaç uygulanmadan önce ve sonra 12, 24 ve 48'inci saatlerdeki α-T plazma kromatogramları

Tablo 4.50: α-T içeren Evicap® (268,46 mg / kapsül) ilacı sağlıklı gönüllülere ve mesane kanserli hastalara oral olarak uygulandıktan sonra HPLC-DAD yöntemi ile elde edilen α-T derişimleri

| Etkin Madde | | α-T (µg/mL) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Zaman (saat) | | 0 saat | 12 saat | 24 saat | 48 saat |
| Sağlıklı Gönüllü Kişiler | GD | 6,6893 | 6,6889 | 7,5345 | 10,8226 |
| | FD | 6,0539 | 6,0266 | 8,1534 | 7,8795 |
| | OS | 4,1271 | 4,4893 | 5,8659 | 6,2661 |
| | ÖM | 4,1131 | 5,2608 | 6,5662 | 7,8743 |
| | DA | 5,5865 | 9,1407 | 7,3750 | 6,5710 |
| | AK | 9,4769 | 7,2260 | 9,8793 | 9,3812 |
| X±SS | | 6,008±1,990 | 6,472±1,633 | 7,562±1,387 | 8,132±1,723 |
| Mesane Kanserli Hastalar | LT | 5,7727 | 9,7629 | 10,3436 | 7,4638 |
| | KÇ | 3,2232 | 8,1735 | 8,1534 | 7,8795 |
| | HS | 6,6157 | 9,3604 | 7,2952 | 9,7343 |
| | BZ | 2,7175 | 4,9219 | 7,1098 | 6,4612 |
| | FA | 5,7017 | 5,9856 | 5,3824 | 5,0227 |
| | FK | 7,8852 | 8,3120 | 9,7959 | 8,3326 |
| X±SS | | 5,319±1,911 | 7,753±1,911 | 8,013±1,837 | 7,482±1,615 |

X: ortalama, SS: standart sapma




Şekil 4.58: α-T içeren Evicap® (268,46 mg/kapsül) ilacı sağlıklı gönüllülere ve mesane kanserli hastalara oral olarak uygulandıktan sonra HPLC-DAD yöntemi ile elde edilen α-T derişimleri

Tablo 4.51: α-T içeren Evicap® (268,46 mg / kapsül) ilacı oral olarak uygulanan sağlıklı gönüllülerden ve mesane kanserli hastalardan elde edilen verilerin istatistiksel (*t*-testi) olarak karşılaştırılması

| Yöntem | T(saat) | Gönüllü Kişiler | n | X±SS | *t* değeri | P değeri | Etki Boyutu |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| HPLC-DAD | 0 | sağlıklı | 6 | 6,008±1,990 | 0,470 | 0,648 | % 21,3 ( -0,280) |
| | | mesane kanseri | 6 | 5,319±1,911 | | | |
| | 12 | sağlıklı | 6 | 6,472±1,633 | 1,316 | 0,218 | %51,6 (0,867) |
| | | mesane kanseri | 6 | 7,753±1,911 | | | |
| | 24 | sağlıklı | 6 | 7,562±1,387 | 0,628 | 0,544 | % 27,4 (0,420) |
| | | mesane kanseri | 6 | 8,013±1,837 | | | |
| | 48 | sağlıklı | 6 | 8,132±1,723 | 0,674 | 0,515 | % 27,4 (0,376) |
| | | mesane kanseri | 6 | 7,482±1,615 | | | |

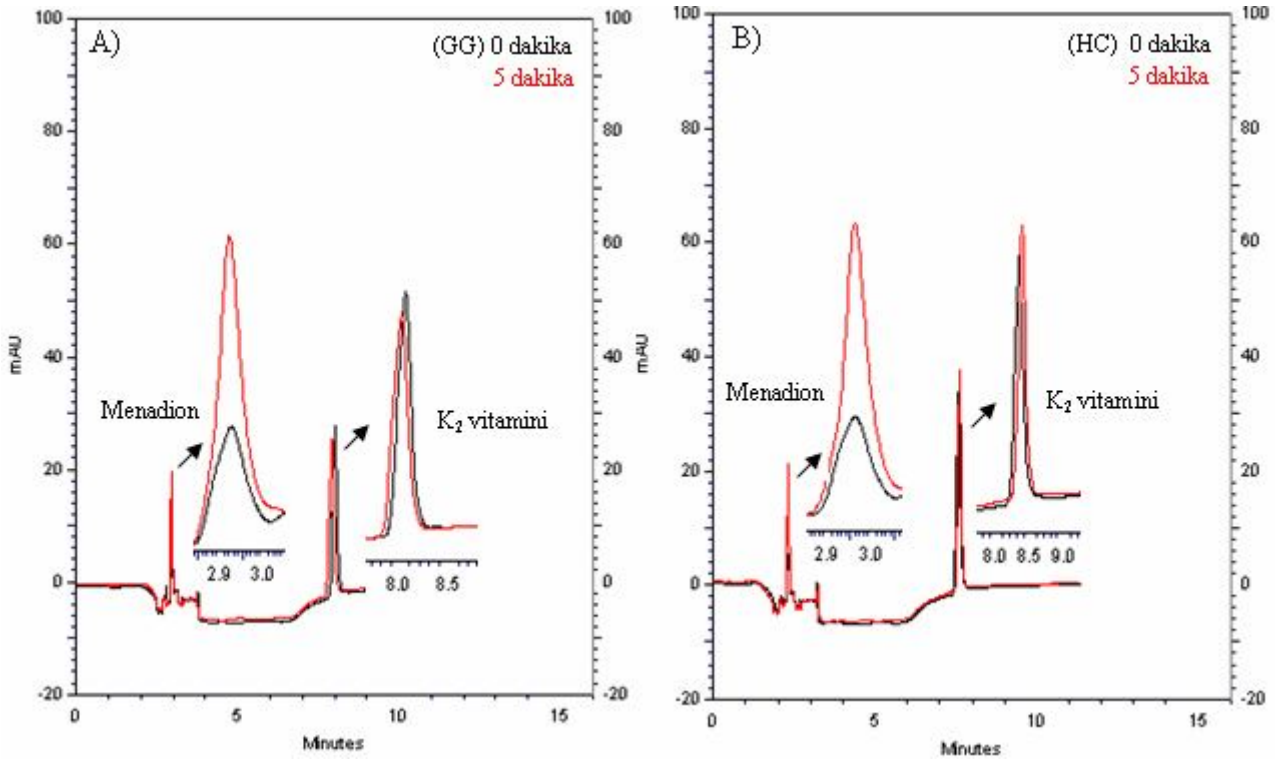
T: zaman (saat), n: gönüllü kişi sayısı, X: ortalama, SS: standart sapma, P>0,05'de istatistiksel bir fark yoktur

#### 4.3.2.2.4. Sağlıklı Gönüllülerde ve Mesane Kanserli Hastalarda MN Çalışması

Yaşları 25-30 arasında değişen 3 bayan 3 erkek olmak üzere toplam 6 sağlıklı gönüllü ve Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalında mesane kanseri teşhisi koyulmuş ve üroloji servisinde yatan yaşları 51-75 arasında değişen toplam 6 hasta (erkek) çalışmaya alındı. Çalışmada denekler, deneyden önceki günün akşamında saat $24^{00}$ den itibaren yemek yememişler ve sabah saat $8^{00}$de MBS içeren piyasa preparatı Libavit K'dan 40 mg MBS olacak şekilde intravenöz olarak uygulanmıştır. Denekler ilacı aldıktan sonra sıvı almalarına ve 15 dak. sonra yemek yemelerine izin verildi. İntravenöz olarak ilaç uygulanmadan hemen önce ve sonra 3, 5 ve 10'uncu dak.'larda 1 mL kan örnekleri EDTA'lı tüplere alındı. Kan örnekleri 3000g ve 30 dak. santrifüjlenerek plazmaları ayrıldı ve analiz edilinceye kadar -70°C'de derin dondurucuda saklandı.

Alınan plazma örneklerinin analizi için Bölüm 3.4'de belirtilen yöntemlerle plazmada bulunan MBS, MN'ye dönüştürülüp ekstraksiyonları yapılarak 20 µL HPLC-DAD sistemine enjekte edildi ve kromatogramları alındı.

Sağlıklı gönüllülerin ve mesane kanserli hastaların HPLC-DAD yöntemiyle analizi sonucunda elde edilen kromatogramları ve plazma derişimleri aşağıdaki şekil ve tablolarda verildi (Şekil 4.59A-B, 4.60A-B; Tablo 4.52). HPLC-DAD yöntemi ile her iki gruptan (sağlıklı ve mesane kanserli) elde edilen veriler istatiksel (*t*-testi) olarak analiz edilerek birbirleriyle karşılaştırıldılar (Tablo 4.53).

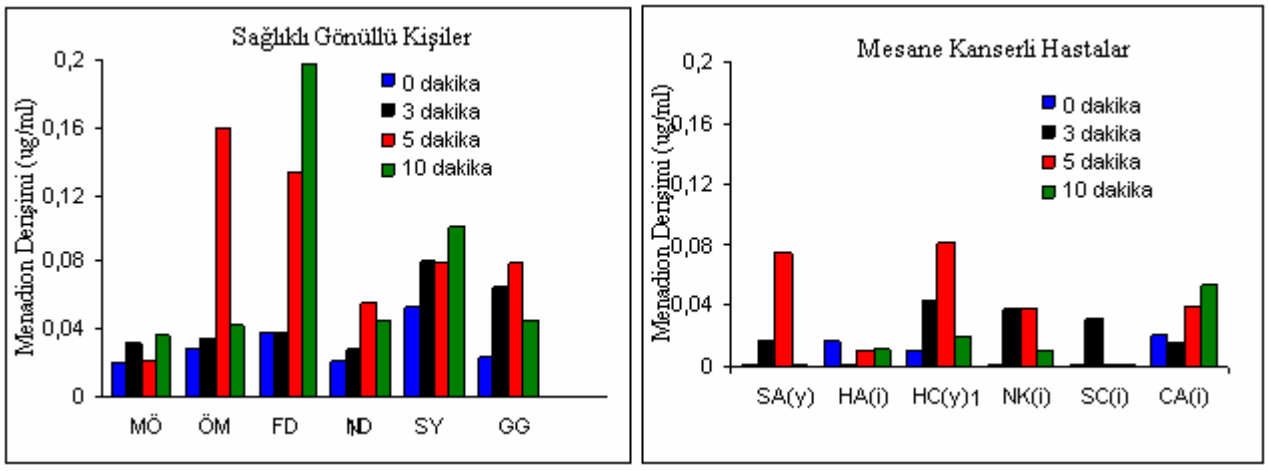



Şekil 4.59: Libavit K® (40 mg / 4 mL) ilacı verilen kişilerin ilaç uygulanmadan önce ve 5 dak. sonra plazma MN derişimlerinin HPLC-DAD kromatogramları: A) Sağlıklı gönüllü kişi GG B) Mesane kanserli hasta HC

Tablo 4.52: MBS içeren Libavit K® (40 mg / 4 mL) ilacı sağlıklı gönüllülere ve mesane kanserli hastalara iv olarak uygulandıktan sonra HPLC-DAD yöntemi ile elde edilen MN derişimleri

| | | MN (µg/mL) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Zaman (saat) | | 0 saat | 3 dak. | 5 dak. | 10 dak. |
| Sağlıklı Gönüllü Kişiler | FD | 0,0375 | 0,0380 | 0,1341 | 0,1971 |
| | MÖ | 0,0195 | 0,0316 | 0,0212 | 0,0370 |
| | NK | 0,0215 | 0,0279 | 0,0560 | 0,0445 |
| | SS | 0,0526 | 0,0800 | 0,0792 | 0,1008 |
| | ÖM | 0,0279 | 0,0340 | 0,1593 | 0,0427 |
| | GG | 0,0239 | 0,0650 | 0,0792 | 0,0450 |
| X±SS | | 0,030±0,012 | 0,046±0,021 | 0,088±0,051 | 0,078±0,063 |
| Mesane Kanserli Gönüllü Kişiler | SA | nd | 0,0172 | 0,0744 | nd |
| | HA | nd | nd | 0,0109 | 0,0122 |
| | HC | 0,0175 | 0,0426 | 0,0808 | 0,0194 |
| | NK | 0,0108 | 0,0378 | 0,0372 | 0,0102 |
| | SC | nd | 0,0309 | nd | nd |
| | CA | 0,0205 | 0,0156 | 0,0394 | 0,0535 |
| X±SS | | 0,010±0,007 | 0,026±0,013 | 0,041±0,032 | 0,018±0,018 |

X: ortalama, SS: standart sapma, nd: dedeksiyon limitinin altındadır




Şekil 4.60: MBS içeren Libavit K® (40 mg / 4mL) ilacı sağlıklı gönüllülere ve mesane kanserli hastalara iv olarak uygulandıktan sonra HPLC-DAD yöntemi ile elde edilen MN derişimleri

Tablo 4.53: MBS içeren Libavit K® (40 mg / 4 mL) ilacı iv olarak uygulanan sağlıklı gönüllülerden ve mesane kanserli hastalardan elde edilen verilerin istatistiksel (*t*-testi) olarak karşılaştırılması

| Yöntem | T(dak.) | Gönüllü Kişiler | n | X±SS | *t* değeri | P değeri | Etki boyutu |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| HPLC-DAD | 0 | sağlıklı | 6 | 0,030±0,012 | 3,399 | 0,007 | % 73,1 ( -1,60) |
| | | mesane kanseri | 6 | 0,010±0,007 | | | |
| | 3 | sağlıklı | 6 | 0,046±0,021 | 1,993 | 0,074 | % 55,4 (1,00) |
| | | mesane kanseri | 6 | 0,026±0,013 | | | |
| | 5 | sağlıklı | 6 | 0,088±0,051 | 1,934 | 0,082 | % 47,4 (0,90) |
| | | mesane kanseri | 6 | 0,041±0,032 | | | |
| | 10 | sağlıklı | 6 | 0,078±0,063 | 2,236 | 0,049 | % 55,4 (1,00) |
| | | mesane kanseri | 6 | 0,018±0,018 | | | |

T: zaman (dak.), n: gönüllü kişi sayısı, X: ortalama, SS: standart sapma, P>0,05'de istatistiksel bir fark yoktur,

# 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yöntem geliştirme ve geçerlilik testlerinde ilk adım, yöntem için kabul edilebilir şartlar olan minimum kriterleri belirlemektir. Minimum kriterler yöntem geliştirciler tarafından yöntemin tasarlanmış amaçlarını karşılayana kadar geliştirilmelidir. Geliştirilen yöntemin problemlerini minimize etmenin yolu ise geçerlilik testlerini tam olarak yapmaktır. Geçerlilik testleri bir analitik uygulamada, bir analiz yönteminin performans özelliklerinin, tasarlanmış amaçlara uygun olduğunu göstermek için yapılan işlemlerin tümüdür. Deneylerden elde edilen analitiksel verilerin niteliği, yöntem geliştirme ve geçerlilik testlerinin kalitesi üzerinde direk bir etkiye sahiptir. Bu yüzden analitik kimyacılar, uygun zamanda, doğru ve güvenilir veri sağlayabilmek için çalışılacak konu ile ilgili iyi bir literatür taraması yapmalı ve kullanılacak analitik yöntemlerin üstünlükleri ve sınırlamaları hakkında yeteri kadar bir bilgi donanımına ve iyi bir karar verme yetisine sahip olması gerekmektedir.[194]

Çalışmamızda, provitamin A (β-K), E vitamini (α-T) ve $K_3$ (MN ve MBS) vitaminlerinin standart çözeltilerde, farmasötik preparatlarda (Carovit®, Evicap® ve Libavit K®) ve plazmada miktar düzeylerinin belirlenmesi için HPLC-DAD, UV-Görünür Bölge, 1D- ve 2D- Spektrofotometresi yöntemleri geliştirilip geçerlilik testleri yapılması amaçlanmıştır.

**Retinol ve β-Karoten**

Retinoidler ve karotenoidler, oksijen ve ışık varlığında geometrik izomerizasyona duyarlı olduğu, örnek hazırlama ve ekstraksiyon boyunca bu yıkıcı faktörlerden sakınılması gerektiği literatürler de belirtilmiştir. Bu yüzden retinol ve β-K analiz çalışmalarımız etrafı alimunum folyo ile sarılı karanlık ortamlarda gerçekleştirildi.[11]

Depolanan biyolojik örneklerde, retinoidler ve karotenoidlerin stabilitesi hakkında önemli kaygılar vardır. Craft ve ark.[195] retinol ve β-K'nın -70ºC'de en az 28 ay ve -20 ºC'de ise 5 ay stabil kaldığını fakat depolama süreci uzadıkça β-K'nın retinolden daha az stabil olduğunu, ayrıca depolamadan önce azot gazı ile biyolojik örneğin oksijenden yıkanmasının bu vitaminlerin stabilitesi üzerinde yararlı bir etkiye sahip olmadığını belirtmişlerdir. Comstock ve ark.[196] β-K'nın ve retinolün yıllarca -70ºC'de depolanabileceğini fakat -40ºC'de depolandığı takdirde β-K'nın miktarında azalma olduğunu göstermiştir. Ito ve ark.[197] da, plazmada retinolün buzdolabında 25 gün stabil kaldığını fakat β-K'nın 21 gün sonra derişiminin düşmeye başladığını göstermişlerdir. Karppi ve ark.[141] ekstrakte edilmiş plazma örneklerinde +4ºC'de retinol ve β-K'nın 3 gün stabil kaldığını belirtmiştir. Talwar ve ark.[140] ekstrakte edilmiş plazma çözeltilerinde retinol ve β-K'nın oda sıcaklığında antioksidan eklendiği taktirde 4-24 saat stabil kaldığını belirtmiştir. Gross ve ark.[198] ise β-K içeren plazma örneklerinin örnek hazırlama süresince havaya ve ışığa maruz kaldığı ortamlarda stabilitesinin değişmediğini belirlemişlerdir. Ayrıca, bazı bilim adamları β-K, retinol, α-T'ün havaya ve ışığa maruz kaldığı ortamlarda stabiliteyi sağlamak için örnek hazırlama adımlarında askorbik asit, bütillenmiş hidroksi toluen, pirogallol veya bütillenmiş hidroksi anizol gibi bir antioksidanın eklenmesini tavsiye ederken,[199] Craft ve ark.[195] antioksidan eklenmesinin hiçbir avantajının olmadığını belirtmişlerdir.

Yukarıda belirtilen yayınlanmış literatürlerde β-K, ve retinolün stabilite koşulları belirlenmiş olup bu bilgiler ışığında çalışmamızda, 60 saat boyunca çalışılan laboratuvar şartlarında, nem, ısı, ışık, hava gibi etkilere karşı bu vitaminlerin standart ve plazma çözeltilerindeki stabilite koşulları araştırıldı. β-K, ve retinolün stabilite çalışması, BHT içeren karanlık ortamlarda kalite kontrol çözeltileri ile yapıldı. FDA rehberinde

belirtilen kurallara göre (ortalamanın ± %10),[194] analitlerin stabilite şartları belirlendi. β-K'in standart çözeltilerinin, oda sıcaklığında 48 saat, +4°C'de düşük derişimde (0,75 µg/mL) 48 saat, yüksek derişimlerde ise (4 µg/mL ve 8 µg/mL) 60 saat ve -20°C'de 60 saat stabil kaldığı; plazma çözeltilerinin ise oda sıcaklığında 24 saat, -20°C'de 48 saat, -70°C'de 60 saat, -70°C'de yapılan donma-erime turlarından sonra 60 saat ve otoörnekleyici üzerinde ekstraksiyonu yapılmış plazma örneklerin 24 saat stabil kaldığı belirlendi (Tablo 4.1, 4.2 ve 4.3). Retinolün standart çözeltilerinin ise her üç sıcaklıkta da (oda sıcaklığında, +4°C ve -20°C'de) 60 saat stabil kaldığı; plazma çözeltilerinin ise oda sıcaklığında 24 saat, -20°C, -70°C ve -70°C'de yapılan donma-erime turlarından sonra 60 saat ve otoörnekleyici üzerinde ekstraksiyonu yapılmış plazma örneklerin 24 saat stabil kaldığı belirlendi (Tablo 4.1, 4.2 ve 4.3).

Retinol ve β-K lipofilik bileşikler olduğu için organik çözücülerde sulu sistemlerden çok daha fazla çözünürler. Bu yüzden biyolojik sıvılardan ve farmasötik preparatlardan organik çözücülerle retinol ve β-K ekstrakte edilebilir. Literatürlerde, retinol ve β-K'nın ekstraksiyonu sırasında oluşabilecek lipit peroksidasyonu ve pigment oksidasyonu engellemek için BHA, BHT ve hidrokinon gibi bir antioksidanın ekstraksiyonda eklenmesi gerektiğini ve güçlü asitlerin karotenoidlerin renklerini açacağı için bir $MgCO_3$ gibi asit nötralizer kullanmak gerektiğini[200] ya da ekstraksiyonda kullanılan çözücülerin asit içermemesi gerektiğini belirtilmiştir. Plazma ve serum örneklerinin ekstraksiyonunda genellikle önce eşit hacimde metanol, etanol veya asetonitril eklenerek plazma proteinleri denature edilmiş ve daha sonra hekzan, etil asetat, dietil eter gibi çözücülerle ya tek başına ya da karışımlar halinde kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Protein çöktürücü olarak kullanılan asetonitrilin silgimsi peletler oluşturduğunu ve organik fazdan ayrılmasının zor olduğundan dolayı, dietil eterin

yüksek buhar basıncına ve çabuk yanabilme özelliklerinden dolayı dezavatajının olduğunu belirtmişlerdir. Hekzan ise serum veya plazmadan kolayca ayrılabildiği, azot ya da argon gazı altında kolayca uzaklaştırılabildiği için en çok tercih edilebilen ekstraksiyon çözücüsü olduğu belirtilmiştir. Ayrıca izomerizasyonu engelemek için azot ya da argon gazı altında ekstraktlardan çözücüleri uzaklaştırmasının 40ºC altındaki sıcaklıklarda azaltılmış basınç altında yapılması gerektiğini belirtmişlerdir. Bazı çalışmalarda ise ekstraksiyondaki çözücü uzaklaştırma adımındaki analit kaybını ve bozunmayı önlemek için direk kromatografi sistemine enjekte etmişlerdir.[201-202] Diğer bir çalışmada ise katı faz ekstraksiyonu uygulanmış ve geri kazanım değeride % 50 civarlarında bulunmuştur.[203] Bu bilgiler ışığında çalışmamızda Bölüm 3.4.1'de anlatıldığı gibi farklı bir ekstraksiyon işlemi uygulandı.

İç standart çalışmalarda hatayı minumuma indirmek için kullanılmaktadır. Retinol analizlerinin bazılarında iç standart olarak retinil asetat kullanıldığını fakat ekstraksiyon esnasında hidroliz olabileceği için ideal bir iç standart olmadığı belirtilmiştir. Ayrıca bazı çalışmalarda retinal oksim ve 15-metilretinol gibi bileşikler kullanılmıştır.[11] Karotenoidlerin analizlerinde ise 8'-apo- β-karotenal, C45- β-K, etil- β-apo-8'-karotenoat ve 3R-8'-apo- β-K-3,8'-diol, β-apo-10'karotenal, β-apo-karotenil dekanoat ve ekinenon iç standartlar kullanılmıştır.[11] Çalışmamızda retinol ve β-K analizlerinde iç standart olarak $K_2$ vitamini tercih edildi.

Farmasötik preparatlarda β-K'nın belirlenmesine yönelik yapılan literatür taramasında sadece Üçüncü Türev Spektrofotometre yöntemi ile β-K ve antisiyanosidinin birlikte belirlendiği bir çalışmaya raslandı.[98] UV-Görünür Bölge, 1D- ve 2D- Spektrofotometre yöntemleriyle farmasötik preparatlarda miktar tayinine yönelik bir çalışmaya rastlanılmadı. Bu sebeple çalışmada, β-K'nın farmasötik

preparatlarda miktar tayini için yeni yöntemler olan UV-Görünür Bölge, 1D- ve 2D-Spektrofotometre yöntemleri geliştirildi ve geçerlilik testleri yapıldı.

Yapılan literatür taramasında multivitamin tabletlerde A ve E vitaminin belirlenmesi için süper kritik akış ekstraksiyonunu kullanılan HPLC yöntemine[168] ve yine multivitamin tabletlerde β-K, A ve E vitaminlerinin ve belirlenmesi için HPLC-UV yöntemlerine[167,170,171] rastlandı. Fakat sadece β-K içeren vitamin preparatlarında β-K miktar tayinine yönelik bir çalışmaya rastlanılmadı.

Literatürlerdeki farmasötik preparatlarda β-K'in belirlenmesi için geliştirilen HPLC çalışmaların hepsinde $C_{18}$ kolon kullanılmış olup metanol,[146] % 0,25 amonyum asetat içeren metanol ve % 0,05 trietilamin içeren diklormetan[167] ve asetonitril-diklormetan-metanol[171] (60:20:20 h/h) hareketli fazları ile ayırımı gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada geliştirilen yöntemlerden farklı daha hızlı ayırım için $C_8$ kolon ve metanol asetonitril hareketli faz karışımı kullanıldı. Paulo ve ark.[146] β-K'nın alıkonma zamanını 1,5 mL/dak. akış hızında 18-20 dak. arasında ve tayin alt sınırı değerini 37 ng/mL olarak; Wang ve Huand [171] ise toplam alıkonma zamanını 1,0 mL/dak. akış hızında 12 dak. olarak ve gözlenebilme sınırını 1,84 ng/mL olarak tespit etmiştir. 1,0 mL/dak. akış hızında 7,6 dak. gibi oldukça kısa bir analiz süresi ile ve 20 ng/mL tayin alt sınırı ile geliştirdiğimiz yöntemin literatürlerdeki diğer yöntemlere göre oldukça kolay, hassas ve hızlı bir yöntem olduğu söylenebilir. Farmasötik preparatlarda β-K'nın miktar tayini için uygulanan UV-Görünür Bölge (476 nm) ve 1D- (496 nm) ve 2D- (462 nm) Spektrofotometre ve HPLC yöntemlerinin birbiriyle karşılaştırılması amacıyla da *F*-testi yapıldı. Bu test sonucunda dört yöntemin istatiksel olarak aralarında herhangi bir farkın olmadığı görüldü. ($F_h$: 0,947, $p>0,05$) (Tablo 4.43). Sonuç olarak, geliştirilen bu dört

yöntemin ilaç endüstrisinde kalite kontrol çalışmalarında başarıyla uygulanabilir olduğu söylenebilir.

Yapılan literatür taramasında, insan serumunda β-K'in belirlenmesi[97] ve diyabet hastaların serumlarında MDA, α-T, β-K düzeylerini belirlenmesine[154] yönelik spektrofotometre yöntemlerine rastlandı. Fakat plazmada UV-Görünür Bölge, 1D- ve 2D-Spektrofotometre yöntemleri ile β-K miktar tayinine yönelik bir çalışmaya rastlanılmadı. Bu sebeble β-K'nın plazmada miktar tayini için UV-Görünür Bölge, 1D- ve 2D- Spektrofotometre yöntemleri geliştirildi ve geçerlilik testleri yapıldı. Optimum çalışma koşulları belirlenen yöntemler ile plazmadan Bölüm 3.4'de belirtildiği şekilde ekstrakte edilen β-K'nın spektrumları alındı. Literatürde, UV-Görünür Bölge Spektrofotometresi ile serumda β-K'nın miktar tayini çalışmalarında 0,75 mL[154] ve 3 mL[97] serum hacimlerinde çalışılmış olup geçerlilik testi sonuçları hakkında bilgi verilmemiştir. Çalışmamızda da 0,3 mL gibi oldukça küçük hacimde çalışıldı. Geliştirilen ve geçerlilik testleri yapılan her üç yöntemin belirtilen dalga boylarında plazmada β-K'in miktar tayini için uygulanabilir olduğu söylenebilir.

Literatürde, serum veya plazmada β-K ve retinolün miktar tayini için birçok HPLC yöntem çalışmasına rastlanmıştır. Ters faz $C_{18}$ kolon, gradient veya izokratik elüsyon ile major karotenoidlerin ayırımı gerçekleştirilmiştir. [81-83,86-88,92,93,138-143,146-153,155-157,160,161,163,173] Bazı karotenoidlerin izomerlerinin ayırımında da $C_{30}$ kolon[79,80,94,95] kullanılmıştır. β-K ve retinolün plazmada belirlenmesinde $C_8$ kolon[78] ile ilgili sadece bir LC-MS/MS yöntemine rastlanmıştır. Çalışmamızda $C_8$ kolon kullanılan HPLC-DAD yöntemiyle β-K ve retinolün plazmada miktar tayini gerçekleştirildi Ayrıca Khachik ve ark.[83] normal faz HPLC yöntemi ile karotenoidleri belirlemişlerdir. Plazmada retinoidlerin, karotenoidlerin ve bunlar ile birlikte bazı yağda çözünen vitaminlerin, UV

Dedektörlü[78,79,84,85-88,93,139,140,143,145-147,149,156,160], Diyode Array Dedektörlü (DAD)[138,141, 144,148,150,151-153,155,159,161,173], Floresans Dedektörlü[142,149,162,163], Elektrokimyasal Dedektörlü[90,149,158] ve Kütle Spektrometre Dedektörlü[80,81,85,92,94-96] HPLC yöntemiyle belirlenmesi gerçekleştirilmiştir.

Endojen β-K içeren plazmadan Bölüm 3.4'de belirtildiği şekilde ekstrakte edilen β-K'nın miktar tayini için geliştirilen ve geçerlilik testleri yapılan HPLC-DAD yönteminde, ters faz $C_8$ kolonda (5 μm, 150 x 4,6 mm), metanol-asetonitril hareketli fazında (95:5 h/h), 29 $^0$C kolon sıcaklığında, 1 mL/dak. kolon akış hızında, 245 nm ve 450 nm dalga boylarında kromatografik ayırım gerçekleştirildi.

Endojen retinol içeren plazmadan (0,79 μg/mL) Bölüm 3.4'de belirtildiği şekilde ekstrakte edilen retinolün miktar tayini için geliştirilen ve geçerlilik testleri yapılan HPLC-DAD yönteminde kromatografik ayırımı ise, ters faz $C_8$ kolonda (5 μm, 150 x 4,6 mm), metanol-bütanol-su hareketli fazının gradient elüsyonu ile 29°C kolon sıcaklığında, 1 mL/dak. kolon akış hızında ve 325 nm dalga boyunda gerçekleştirildi.

Literatürlerde, karotenoidlerin ayırımında etilasetat, diklormetan, tetrahidrofuran ile güçlendirilmiş veya modifiye edilmiş metanol, asetonitril veya bunların karışımını içeren[82,86,87,92,93,95,138,140,142,145,151,155,160,161] bazen bu sisteme kloroform[139,141], izoprapanol[150] ya da su eklenen[146] hareketli fazlarda $C_{18}$ kolon kullanılırken, metanol-metilen kloritden[78], metanol-metiltersiyer bütileter[96] bazen bu sisteme amonyum asetat[80] veya su[94] eklenerek oluşturulan hareketli fazlarda $C_{30}$ kolon kullanılmıştır. Suplex pKb100 kolonunda ise metanol-metiltersiyer bütileter-su[159] veya asetonitril-su-2-propanol[88] hareketli fazları ile karotenlerin kromatografik ayırımı gerçekleştirilmiştir. Retinol ve β-K'nın birlikte belirlendiği başka bir çalışmada ise $C_{18}$ kolon ve metanol-asetonitril-diklormetan-1-oktanolden oluşan hareketli faz kullanılmıştır. Ayrıca Nelis ve

ark.[5] ile Epler ve ark.[165] $C_{18}$ kolonda hareketli faz olarak asetonitril kullanıldığı zaman karotenoidlerin geri kazanımını artırmak için hareketli faza amonyum asetat eklenmesi gerektiğini belirtmişlerdir. Çalışmamızda, $C_8$ kolon ve amonyum asetat içermeyen metanol-asetonitril hareketli fazı kullanılarak % 98'den büyük bir geri kazanım elde edilmiştir. Retinol çalışmalarında ise $C_{18}$ kolon ve metanol[144], metanol-asetonitril[142], metanol-su[147,149,153], metanol-hekzan[143], metanol-diklormetan[144], metanol-su-bütanol[148], asetonitril-su-bütanol[163] ve asetonitril-su-etilasetat-2-propanol[157] dan oluşan hareketli fazlar kullanılmıştır. Karotenlerin ve retinollerin birlikte analiz edildiği çalışmalarda ise yukarıda belirtilen karoten için kullanılan hareketli fazlar kullanılmıştır.[138-140,145,161]

Çalışmamızda literatürden farklı olarak $C_8$ kolon, DAD dedektör, metanol-asetonitrilden oluşan hareketli faz (β-K için), metanol-su-bütanolden oluşan hareketli faz (retinol için) kullanılmış olup literatürde belirtilen birçok yöntemden[79,82,86-88,92,94,76,141,150-152,159] daha hızlı (β-K'nın alıkonma zamanı 7,2 dak. ve retinolün alıkonma zamanı 6,4 dak.) ve daha basittir.

Plazmada β-K ve retinolün analizi için geliştirilen ve geçerlilik testleri yapılan HPLC-DAD yöntemlerinin uygulanabilir olduğunu görmek için tavşan ve insan çalışması yapıldı.

Yapılan literatür taramasında Van Breemen,[81] oral olarak verilen sağlıklı insan plazmasında β-K'nın biyoyararlanımı ve β-K'nın retinole dönüşümünü LC/MS yöntemi ile belirlemiş, Xiong ve ark.[77] da β-K içeren çiğneme ve kapsül tabletleri verilen erkek sağlıklı insan serumlarında β-K'nın biyoyararlanımını çalışmış, Parvin ve ark.[91] ise HPLC yöntemi ile β-K'nın A vitaminine dönüşüm ilişkisini incelemiştir. Tavşanlarda β-K'nın farmakokinetiği ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Ayrıca Yamanushi ve Igarashi[89] retinole dönüşmeden β-K'nın sıçanlarda absorbe edilemediğini belirtmişler ve β-K'nın süspansiyon formunun intravenöz olarak verildiğinde β-K'nın vücutta depolandığı yerleri tespit etmişlerdir. Teorik olarak bir mol β-K iki mol A vitaminine dönüşmesine rağmen biyolojik sistemlerde bu dönüşüm oranının değiştiği ve β-K'nın A vitaminine dönüşüm oranını, karaciğer depolama deneyleri, radyolojik olarak işaretlenmiş β-K'in absorbsiyon ve dönüşümü deneyleri ile belirlenebileceği belirtilmiştir. Parvin ve ark.[91] ise ratlara ve çocuklara A vitamini ve β-K'ı ayrı ayrı verip HPLC yöntemi ile her iki sistemde A vitamini derişimini belirledikten sonra ayrı ayrı belirledikleri AUC değerlerini karşılaştırarak yeni bir yöntem geliştirmiş ve β-K'in A vitaminine dönüşüm oranını ratlarda 0,50 ve çocuklarda ise 0,21-0,32 arasında belirlemişlerdir. Aynı zamanda düşük derişimlerde (20μg / rat) β-K veya A vitamini ratlara uygulandığı zaman A vitamini seviyesinin değişmediğini yüksek derişimlerde β-K uygulandığı zaman ise (günlük ihtiyacın 10 katı) β-K'nın A vitaminine dönüşümü arasında ters bir ilişkinin gözlenilebileceği belirtilmiştir[70].

Çalışmamızda, β-K içeren Carovit® (20 mg / kapsül) ilacı 100 mg olacak şekilde beyaz sağlıklı tavşana oral olarak verildi. Plazma örnekleri Bölüm 3.4'de belirtildiği şekilde ekstrakte edildi. Geliştirilen ve geçerlilik testleri yapılan HPLC-DAD yöntemiyle tavşandan elde edilen plazma ekstraktlarında hem retinol hemde β-K analizleri yapıldı. Yapılan analizler sonucu β-K ile ilgili herhangi bir pike rastlanmadı. Yukarıdaki bilgiler ışığında tavşanların oral olarak verilen β-K'nın retinole dönüşmeden absorbe edilemediğini[91] ve bu yüzdende β-K'nın farmokokinetik bilgilerinin retinol analizi yapılarak elde edilebileceği sonucu çıkarıldı ve ekstraktlarda retinol analizi yapıldı. Retinol için geliştirilen ve geçerlilik testleri yapılan yöntem ile ekstraktların kromatogramları alındı ve pik alanları okundu. Süreye karşılık plazma retinol derişim-

zaman eğrisinden ilacın farmakokinetik parametreleri Tablo 4.44'de verildi. Elde edilen verilerin bir kanser koruyucusu olarak bilinen β-K'nın insan vücudundaki farmokinetiği ve metabolizması ile ilgili çalışmalara yardımcı olabileceği söylenebilir.

Yapılan literatür taramasında β-K ve retinolün sağlıklı insan plazmasında belirlenmesi ile ilgili birçok çalışmaya rastlanmış olup mesane kanserli hastalarla ilgili olarak tek bir çalışmaya rastlanmıştır.[54] Bu çalışmada, plazmada lutein, zeaksantin, β-kriptoksantin, likopen, α-K, β-K, retinol, α-T ve γ-T, HPLC yöntemi ile belirlenmiş ve hastaların yaşları, cinsiyeti, eğitimi ve sigara içimleri göz önüne alınarak mesane kanseri üzerinde karotenoidlerin koruyucu bir etkisinin olduğu belirtilmiştir[54]. Ayrıca β-K'li beslenme ve mesane kanseri arasında bir ilişkinin bulunmadığını[48,49] belirten çalışmalar olmasına rağmen bazı çalışmalarda da yüksek miktarda β-K'li beslenmenin mesane kanserine yakalanma riskini azalttığı belirtilmiştir.[44-49]

Serum örnekleri alınıp dondurularak bekletilen kişilerin zamanla mesane kanserine yakalandıkları belirtilmiş ve bu kişilerin serum örnekleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında mesane kanserli kişilerin β-K derişimlerinin kontrol grubuna göre bazılarında düşük olduğu[50,52] ve bazılarında ise yüksek olduğu[51] gösterilmiştir. Bazı çalışmalarda ise serum derişimleri ile mesane kanserine yakalanma riski arasında olumlu bir ilişki kurulurken[51-54] bazı çalışmalarda ise bir ilişki kurulamamıştır.[50] Sağlıklı gönüllü kişilerde β-K ve retinol derişimlerini sırasıyla Talwar ve ark.[140] yaşları 19-62 arasında olan erkeklerde ortalama 0,193 μg/mL ve 0,630 (45 kişi) ve bayanlarda 0,767 μg/mL ve 0,544 μg/mL (60 kişi) olarak; Karppi ve ark.[141] 34 kişide yaptıkları çalışmada ortalama 0,214 μg/mL ve 0,523 μg/mL olarak; Zaman ve ark.[138] yaşları 23-50 arasında olan genç kişilerde ortalama 0,249 μg/mL ve 0,652 μg/mL ve yaşları 77-89 arasında olan yaşlı kişilerde 0,300 μg/mL ve 0,610 μg/mL olarak; Krinsky va ark.[87] β-K

derişimini 4 kişide ortalama 0,338 μg/mL olarak; Quaseda ve ark.[150] farklı yaş gruplarında çalışmış olup retinol derişimini ortalama bayanlarda 0,658 μg/mL ve erkeklerde 0,549 μg/mL olarak; Siluk ve ark.[142] Balitmore aging çalışmasında yer alan 221 hastada retinol derişimini 0,34 μg/mL ile 1,18 μg/mL arasında ve Karpinska ve ark.[143] yaşların 2-9 arasında sağlıklı ve rejim yapan çocukların retinol derişimlerini sırasıyla 0,943 μg/mL ve 0,697 olarak tespit etmişlerdir. Zhao ve ark.[151] ise Çin'de bir sağlıklı gönüllüye antioksidan kapsül içirmişler, β-K, A ve C vitaminleri ile derişimlerini 40 gün boyunca incelemişler ve ortalama β-K derişimini 1,26 μg/mL olarak belirlemişlerdir. Ayrıca, Johnson ve Russel,[204] tek doz oral olarak verilen β-K'nın plazma derişiminin bireyler arasında farklılık gösterdiğini ve kapsül formundaki tek doz oral olarak 120 mg β-K'ı verdikten sonra plazma β-K seviyesindeki küçük veya olumsuz artışın 17 erkeğin 7'sinde gözüktüğünü rapor etmişlerdir. Kullanılan ve benzer doz koşulları ile varyasyonların bireyler arasındakine nazaran bireyler içindekinin daha düşük olduğunu göstermişlerdir. Bireyler arasında yapılan çalışmada tekrarlanmış dozlarda verilen β-K plazma derişiminin genellikle tek dozda verilen β-K'nın plazma derişiminden daha az değiştiği bildirilmiştir. Xu ve ark.[205] günlük 0 ile 60 mg arasındaki dozlarda 9 aylık dönemde β-K verilen bireylerde plazma E vitamin seviyesindeki azalmayı rapor etmişlerdir. Her iki vitaminin kabaca benzer plazma seviyeleri ile sonuçlanan tüm dozları ile E vitaminin plazma seviyesinde ya da β-K'nın plazma seviyesi arasında bir ilişki bulamamışlardır. Literatürde mesane kanserli hastalara ve sağlıklı gönüllülere β-K kapsülünün tek doz uygulanmasından sonra miktar tayinine yönelik bir çalışmaya ratlanmadı.

Çalışmamızda, Carovit® (20 mg / kapsül) tek doz oral olarak sağlıklı gönüllülere ve mesane kanserli hastalara verildi. Plazma örnekleri Bölüm 3.4'de belirtildiği şekilde ekstraksiyonları yapıldı. Altı sağlıklı gönüllü ve altı mesane kanserli hastadan elde edilen plazma ekstraktları geliştirilen ve geçerlilik testleri yapılan HPLC-DAD yöntemleriylehem retinol hemde β-K miktar tayinleri yapıldı. Sağlıklı gönülü ve mesane kanserli hastaların plazma retinol derişimleri (μg/mL) ilaç verilmeden hemen önce sırasıyla 0,869±0,174 ve 0,679±0,297 ve ilaç verildikten 2,5 saat sonra sırasıyla 1,029±0,555 ve 0,964±0,515 olarak; plazma β-K derişimleri (μg/mL) ilaç verilmeden hemen önce sırasıyla 0,424±0,176 ve 0,283±0,092 ve ilaç verildikten 2,5 saat sonra sırasıyla 0,420±0,159 ve 0,279±0,074 olarak tespit edildi (Tablo 4.48). Sağlıklı gönüllülerin ve mesane kanserli hastaların sürelere göre elde edilen plazma β-K ve retinol derişimleri sağlıklı gönüllülerde mesane kanserli hastalara göre daha yüksek olmasına rağmen *t*-testi ile yapılan istatiksel analizinde aralarında bir fark gözlenemedi (Tablo 4.49) (retinolün; 0 saat için; $t_{(0)}$=1.374; P>0.05, 2,5 saat için; $t_{(2,5)}$=0,208; P>0.05, β-K'nın $t_{(0)}$=1.727; P>0.05, 2,5 saat için; $t_{(2,5)}$=1,975; P>0.05). Ayrıca tek doz oral olarak 20 mg β-K içeren kapsül verdikten sonra plazma retinol derişiminin artışı plazma β-K derişiminin artışında fazla olduğu belirlendi. Retinol derişimindeki küçük artışın altı sağlıklı gönüllünün üçünde ve altı mesane kanserli hastanın dördünde ve β-K derişimindeki küçük ve önemsiz artışın altı sağlıklı gönüllünün birinde ve altı mesane kanserli hastanın üçünde gözüktüğü belirlendi (Tablo 4.48).

**α-Tokoferol**

α-T, oksijen ve ışığa duyarlı olduğu ve örnek hazırlama ve ekstraksiyon boyunca bu yıkıcı faktörlerden sakınılması gerektiği literatür de belirtilmiştir. Bu yüzden α-T analiz çalışmalarımız etrafı alimunum folyo ile sarılı karanlık ortamlarda

gerçekleştirildi[5]. Literatürde, depolanan biyolojik örneklerde α-T'nin stabilitesi ile ilgili çalışmalara rastlanmış olup Craft ve ark.[195] α-T'nin -70ºC'de en az 28 ay ve -20 ºC'de ise 5 ay stabil kaldığını ve depolamadan önce azot gazı ile biyolojik örneğin oksijenden yıkanmasının bu vitaminlerin stabilitesi üzerinde yararlı bir etkiye sahip olmadığını belirtmişlerdir. Ayrıca Comstock ve ark.[196] α-T'nin yıllarca -70ºC'de depolanabileceğini, Talwar ve ark.[140] plazma çözeltilerinde α-T'nin antioksidan eklendiği ve azot gazı ile örneğin oksijenden yıkandığı taktirde -70ºC'de 12 ay stabil kaldığını, Ito ve ark.[197] plazmada α-T'nin buzdolabında 25 gün stabil kaldığını, Teissier ve ark.[109] ise α-T'nin stok çözeltilerinin ve plazma örneklerinin -20ºC'de iki aydan daha fazla, -20ºC'de donma-erime turlarında ise 6 ay stabil kaldığını göstermiştir. α-T içeren plazma örneklerinin örnek hazırlama süresince havaya ve ışığa maruz kaldığı ortamlarda stabilitesini ise Gross ve ark.[198] çalışmışlar ve stabilitesinin değişmediği sonucuna varmışlardır. Teissier ve ark.[109] ise α-T'i plazmadan hekzan ve etilasetat ile ekstrakte etmiş ve bu ekstraksiyon çözücülerini uçurur uçurmaz α-T'nin oksidasyonunu engellemek için metanol ilave ettiğini belirtmiş ve metanolde çözerek hazırladığı α-T çözeltisinin -20ºC'de birkaç gün stabil kaldığını göstermiştir. Colleen ve ark.[115] plazmadan ekstrakte edilen α-T çözeltilerinin oto örnekleyici üzerinde 24 saat ve α-T içeren plazma örneklerinin -80ºC'de 24 saat ve -80ºC'deki donma-erime turlarında da 24 saat stabil kaldığını göstermişlerdir. Zaman ve ark.[138] 7 gün boyunca oda sıcaklığında bekletildiğinde ve buzdolabında bekletilip donma-erime turlarının tekrarlığında α-T'nin bozulmadığını belirtmişlerdir. Karppi ve ark.[141] ve Alvarez ve Mazancourt [153] ekstrakte edilmiş plazma örneklerinde α-T'nin +4 ºC'de 3 gün stabil kaldığını belirtmiştir. Talwar ve ark.[140] ise ekstrakte edilmiş plazma çözeltilerinde α-T'ün oda sıcaklığında antioksidan eklendiği taktirde 4-24 saat saat kaldığını belirtmiştir.

Ayrıca, bazı bilim adamları α-T'nin havaya ve ışığa maruz kaldığı ortamlarda stabiliteyi sağlamak için örnek hazırlama adımlarında askorbik asit, bütillenmiş hidroksi toluen pirogallol veya bütillenmiş hidroksi anizol gibi bir antioksidanın eklenmesini tavsiye ederken[5], Craft ve ark.[195] antioksidan eklenmesinin hiçbir avantajının olmadığını belirtmişlerdir.

Yukarıda belirtilen literatürlerde α-T'nin stabilite koşulları belirlenmiş olup bu çalışmada, 60 saat boyunca çalışılan laboratuvar şartlarında, nem, ısı, ışık, hava gibi etkilere karşı bu vitaminin standart ve plazma çözeltilerindeki stabilite koşulları araştırıldı. α-T'nin stabilite çalışması, karanlık ortamlarda kalite kontrol çözeltileri ile yapıldı ve FDA rehberinde belirtilen kurallara göre (ortalamanın ± %10),[194] analitlerin stabilite şartları belirlendi. α-T'nin standart çözeltilerinin, oda sıcaklığında, +4°C ve -20°C'de 60 saat stabil kaldığı; plazma çözeltilerinin ise oda sıcaklığında 24 saat, -20°C'de düşük derişimlerde (endojen α-T içeren plazma, 0,75 μg/mL ve 5 μg/mL) 60 saat ve yüksek derişimlerde (15 μg/mL) 24 saat, -70°C'de ve -70°C'de yapılan donma-erime turlarından sonra 60 saat ve otoörnekleyici üzerinde ekstraksiyonu yapılmış plazma örneklerin 24 saat stabil kaldığı belirlendi (Tablo 4.1, 4.2 ve 4.3).

α-T, lipofilik bileşikler olduğu için organik çözücülerde sulu sistemlerden çok daha fazla çözünürler. Bu yüzden biyolojik sıvılardan ve farmasötik preparatlardan organik çözücülerle α-T ekstrakte edilebilir. Literatürde, E vitamini kimyasal olarak proteinlere, lipitlere ve karbohidratlara kimyasal olarak bağlanamadığı ve bu yüzden E vitaminini serbest hala getirmek için vitaminlere zarar verecek güçlü kimyasalların eklenmesine gerek olmadığı belirtilmiştir. Fakat biyolojik örneklerde bulunan organik çözücüler ile çözünemeyen protein ve karbohidratlar gibi büyük moleküllerin α-T'nin ekstraksiyonundaki interfere etkisini engellemek için etanol,[103,109,115,

[138,141,142,148,151,153,154,157,159,160] etanol-su,[144] metanol,[102,143,149] sodyum dodesil sülfat,[31] asetonitril[156] ve tetrahidrofuran gibi çözücülerle ya tek başına ya da karışımlar halinde[139] kullanılarak denatüre edilmesi gerektiği bildirilmiştir. α-T'nin ekstraksiyonu sırasında oksidasyonu engellemek için bazı araştırmacılar BHT[100,141,142,160] ve askorbik asit[103,140,156] gibi antioksidan maddelerin eklenmesi gerektiğinin belirtirken çoğu araştırmacı[109,115,138,143,144,148,149,151,153], α-T'nin belirlenmesinde antioksidan eklenmesinin gereksiz olduğunu belirtmiş ve yöntemlerini antioksidansız geliştirmişlerdir. Hatta Su ve ark.[206] antioksidan eklenmemiş α-T içeren plazma çözeltilerinin oda sıcaklığında ve floresans ışığın altında 4 saat stabil kaldığını ve % 4'lük bir kayıp ile de 24 saat stabil kaldığını belirtmişler ve ekstraksiyon işlemi boyunca antioksidan eklenmesinin gereksiz olduğunu belirtmişlerdir. Literatürlerde, plazma proteinleri denatüre edilmiş plazma çözeltilerinden α-T, hekzan,[100,102,115,138,140-144,148,149,154,156,157,159,160] hekzan-etil asetat,[102,109] hekzan-diklometan,[153] heptan,[139] ve kloroform[151] çözücüleri kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Daha sonra organik faz uçurulmuş (40-45ºC'de azot gazı altında) ve kalıntılar hareketli faz bileşiminde veya kromatografide analiz edilebilecek bir çözücüde çözülmüştür. Literatürde bulunan diğer bir çalışmada,[163] da bu çözücülerin genellikle α-T yanında ekstrakte edilen plazma interfere maddelerinide çözebileceğini belirtmiş ve ekstraksiyonu bütanol ve etil asetat ile yapmış ve direk kromatografi sistemine enjekte etmiştir. Karppi ve ark.[141] yukarıda belirtilen sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemlerinden farklı olarak hekzan ekledikten sonra su eklemiş ve -70ºC'de bekleterek sulu plazma çözeltisinin donmasını sağlamış ve daha sonra organik fazı ayırmıştır. Plazmada α-T'i belirlenmesine yönelik yapılan başka bir çalışmada[83] ise plazmadan, asetonitril ve tetrahidrofuran karışımı kullanılarak α-T ekstrakte edilmiş fakat literatürdeki diğer çalışmalar asetonitrilin sulu plazma çözeltisi

ile karışabileceğinden dolayı plazmada bulunan diğer maddelerin α-T'nin belirlenmesine engel olabileceğini belirtmişlerdir[5]. Man Po ve ark.[173] ise tavşan plazmasında çalışmış olup plazma örneklerine 1 M HCl eklemiş ve daha sonda metanol, etanol, hekzan, benzen, izo-oktan ve kloroform çözücülerinden birini ekleyerek α-T'i ekstrakte ederek farklı bir ektraksiyon işlemi gerçekleştirmiştir. Ayrıca katı faz[114,174,180] ile de α-T biyolojik sıvılardan ekstrakte edildiği çalışmalara rastlanmıştır. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda Bölüm 3.4.'de anlatıldığı gibi Alvarez ve ark.[153] kullandığı ektraksiyon işlemi modifiye edilerek kullanıldı ve elde etmiş oldukları ortalama % 84'lük geri kazanım değeri, plazmanın, etanol ve hekzan ve diklormetan çözücülerinin oranlarını değiştirilerek yükseltildi (Geri kazanım değerleri, UV-görünür Bölge, 1D- ve 2D- spektrofotometre ve HPLC-DAD çalışmalarında sırasıyla % 89,10 – % 98,43, % 91,97 – % 102,0, % 86,6 – 97,02, % 87,38 – % 98,60) (Tablo 4.11, 4.26, 4.27 ve 4,34).

E vitamini analizlerinde geri kazanım önemli bir problem olabileceği ve ekstraksiyon sırasındaki kaybı önlemek için iç standart kullanılması tavsiye edilmektedir.[207] α-T analizlerinde kullanılan tokol[149,160,161] ve 5,7-dimetil tokolün[207] karakteristik yapılarının benzer olduğu için ideal bir iç standart olduğu, fakat ticari olarak elde edilemeyeceğini ancak sentezlenerek sağlanabileceği için elde etmesinin güç olduğu belirtilmişdir[207]. Ayrıca δ-[109] ve γ-[143] tokoferoller, γ- tokotrienol,[158] 5,7-dimetil-$H_6$-α-tokoferolkinon,[100] 2,2,5,7,8-pentametil kromanol[115] ve α-T asetatın[139,140,141,153,163] iç standart olarak kullanılabileceği belirtilmiş fakat α-T asetatın α-T'nin bir formu olarak farmasötik preparatlarla ve beslenme ile vücuda alınabileceği için vücutta endojen α-T asetatın olabileceğini ve biyolojik sıvılarda iç standart olarak kullanıldığı takdirde de problem yaratabileceği bildirilmiştir.[207] Ayrıca, α-T'nin diğer yağda çözünen vitaminlerle birlikte yapılan analizlerin bazılarında retinil

asetat,[140,142,144,148,150,152,159] K vitamini,[114] ekinenon[138,161] ve ksantofil[174] iç standartları kullanılmıştır. Çalışmamızda α-T'nin analizinde iç standart olarak $K_2$ vitamini kullanıldı.

α-T ile ilgili yapılan literatür taramasında UV-Görünür Bölge, 1D- ve 2D-Spektrofotometre yöntemleriyle farmasötik preparatlarda miktar tayinine yönelik çalışmalara ratlanmadı. Bu sebeple çalışmada, α-T'nin farmasötik preparatlarda miktar tayini için yeni bir yöntem olan UV-Görünür Bölge, 1D- ve 2D-Spektrofotometre, yöntemleri geliştirildi ve geçerlilik testleri yapıldı.

Farmasötik preparatlarda α-T miktar tayini için ayrıca HPLC-DAD yöntemi geliştirildi ve geçerlilik testleri yapıldı. Yapılan literatür taramasında multivitamin tabletlerde A ve E vitaminin belirlenmesi için süper kritik akış ekstraksiyonunu kullanılan HPLC yöntemine[168], multivitamin tabletlerde A ve E vitamini ve β-K'nın belirlenmesi için HPLC-UV yöntemlerine[167,170,171] rastlandı. Fakat $C_8$ kolon ile HPLC-DAD sisteminde α-T'nin miktar tayinine yönelik bir çalışmaya rastlanmadı.

α-T'nin belirlenmesi için geliştirilen HPLC-DAD yönteminde kromatografik ayırım, ters faz $C_8$ kolon, (5 μm, 150 x 4,6 mm) metanol, asetonitril ve su hareketli fazı, (84,5/10/5,5 h/h/h) 25°C kolon sıcaklığı, 1 mL/dak. kolon akış hızı ve 292 nm dalga boyunda gerçekleştirildi.

Literatürlerdeki farmasötik preparatlarda α-T'nin belirlenmesinde, metanol[146], % 0,25 amonyum asetat içeren metanol-% 0,05 trietilamin içeren diklormetan[167] ve asetonitril-diklormetan-metanol (60/20/20, h/h/h)[171] hareketli fazlarında $C_{18}$ kolon kullanılmıştır. Çalışmamızda $C_8$ kolon ve metanol-asetonitril hareketli fazı kullanılmış olup literatürdeki birçok yöntemden daha basittir.

Paulo ve ark.[146] α-T'nin 1,5 mL/dak. akış hızında alıkonma zamanını 5 dak., tayin alt sınırını 0,836 μg/mL ve çalışma aralığını 5,36–25 mg/mL olarak belirlemişlerdir.

Diğer iki çalışmada ise gözlenebilme sınırını 10 ng[167] ve 0,01 ng/mL[171] olarak belirlenmiş olup diğer geçerlilik testi parametreleri ile bilgiye rastlanmamıştır. Çalışmamızda ise bu çalışma derişimlerinden oldukça küçük olan 0,5-20 μg/mL arasında doğrusallık belirlendi (Tablo 4.28) ve tayin alt sınırı değerini ise bu çalışma derişiminden daha küçük bir derişimde (0,2 μg/mL) bulundu. Ayrıca 1 mL/dak. akış hızında α-T'nin alıkonma zamanı 8,5 dak. olup oldukça kısa bir sürede analiz gerçekleştirildi.

Farmasötik preparatlarda α-T'nin miktar tayini için uygulanan UV-Görünür Bölge (292 nm) ve 1D- (303 nm) ve 2D- (299 nm) Spektrofotometre ve HPLC-DAD yöntemlerinin birbiriyle karşılaştırılması amacıyla da *F*-testi yapıldı. Bu test sonucunda dört yöntemin istatiksel olarak aralarında herhangi bir farkın olmadığı görüldü. ($F_h$: 1,103, $p>0,05$) (Tablo 4.43). Geliştirilen ve geçerlilik testleri yapılan bu beş yöntemin ilaç endüstrisinde kalite kontrol çalışmalarında başarıyla uygulanabileceği sonucu çıkarıldı.

Yapılan literatür taramasında, UV-Görünür Bölge Spektrofotometre yöntemi ile Emmerie-Engel reaksiyonuna dayanan yöntemle kırmızı kan hücrelerinde[117] ve TPTZ (2,4,6 tripüridil-5-trazin)[116] ve α-α-dipiridil[154] kullanarak α-T'nin demir bağlama kapasitesi artırılarak yine Emmerie-Engel reaksiyonuna dayanan (E vitamininin $Fe^{+3}$'ü $Fe^{+2}$'e indirgenmesi) yöntemlerle insan serumunda α-T'nin belirlenmesine yönelik çalışmalara rastlandı. Plazmada UV-Görünür Bölge, 1D- ve 2D- Spektrofotometre yöntemleri ile α-T'nin miktar tayinine yönelik bir çalışmaya rastlanmadı. Bu sebeble α-T'nin plazmada miktar tayini için yeni yöntemler olan UV-Görünür Bölge, 1D- ve 2D-Spektrofotometre yöntemleri geliştirildi ve geçerlilik testleri yapıldı. Ayrıca Martinek,[116] E vitamininin direk UV-Görünür Bölge Spektrofotometre yöntemi ile

tayininin 295 nm'de belirlenebileceğini fakat interfere maddelerin olabileceğini ve hassasiyetinin düşük olabileceğini belirtmiştir. Çalışmamızda, plazmadan α-T sıvı-sıvı ekstaksiyon işlemi ile elde edildi ve yüksek geri kazanımlar ile interfere maddelerin olmadığı belirlendi. Ayrıca bir bileşik daha kolay ve daha kesin olarak tanımlanabilmesini sağlayan 1D- ve 2D- spektrumları incelenmesinde plazmadan ekstakte edilen α-T'i interfere edebilecek herhangi bir pike rastlanmadı. Optimum çalışma koşulları belirlenen spektrofotometrik yöntemler ile plazmadan Bölüm 3.4'de belirtildiği şekilde ekstrakte edilen α-T'nin spektrumları alındı. Geliştirilen ve geçerlilik testleri yapılan her üç yöntemin belirtilen dalga boylarında plazmada α-T'nin miktar tayini için uygulanabilir olduğu söylenebilir.

Plazmada α-T'nin miktar tayini için ayrıca HPLC-DAD yöntemi geliştirildi ve geçerlilik testleri yapıldı.

Literatürde, serum veya plazmada α-T'nin miktar tayini için birçok normal ve ters faz HPLC çalışamasına rastlanmıştır. Normal faz sistemlerinde E vitamininin izomer ayrımının gerçekleşebileceğini fakat β- ve γ-T'in ters faz sistemindeki kadar kolay bir şekilde ayrılamıyacağı belirtilmiştir. Ayrıca plazmada α-T'nin analizi için normal faz kromatografisinin başarılı bir şekilde kullanan çalışmalar olmasına[102] rağmen analiz süresinin uzun olması ve ters faz sistemleri kadar basit olmamasından dolayı dezavantajlı olduğu belirtilmiştir[207]. Ters faz sistemlerinde ise α-T'nin miktar tayini için genellikle $C_{18}$[99,108,109,139-143,146-152,155-157,161,163,173] kolonlar tercih edilmiştir. Bunun dışında $C_8$ kolon[145] ile ilgili sadece bir LC-MS/MS yöntemine rastlanmıştır. Bu yüzden α-T'nin plazmada belirlenmesine yönelik çalışmamız literatürde çok az yer alan $C_8$ kolon kullanılan HPLC-DAD sisteminde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca Suplex pKb-100 kolonunda ve metanol-metiltersiyer bütilklorür-su hareketli fazı ile plazmadan α-T'nin

de bulunduğu yağda çözünen vitaminlerin kromatografik ayırımı gerçekleştirilen bir çalışmaya rastlanmıştır. Plazmada α-T ve bunlar ile birlikte bazı yağda çözünen vitaminlerin, UV Dedektörlü[108,139,140,143,145,146,156,160,162], Diyode Array Dedektörlü, [108,138, 141,144,148-153,155,159,161,173], Floresans Dedektörlü[102,109,142,147,149,160,163], Elektrokimyasal Dedektörlü[107,110,149,158] ve Kütle Spektrometre Dedektörlü[100] HPLC yöntemiyle belirlenmesi gerçekleştirilmiştir.

Endojen α-T (4,37 μg/mL) içeren plazmadan Bölüm 3.4'de belirtildiği şekilde ekstrakte edilen α-T'nin miktar tayini için geliştirilen ve geçerlilik testleri yapılan HPLC-DAD yönteminde kromatografik ayırım, ters faz $C_8$ kolon, (5 μm, 150 x 4,6 mm) metanol-asetonitril-su hareketli fazı (84,5/10/5,5, h/h/h), 25°C kolon sıcaklığı, 1 mL/dak. kolon akış hızı ve 292 nm dalga boyunda gerçekleştirildi.

α-T'nin miktar tayininde genellikle $C_{18}$ kolon ve izokratik elüsyon tercih edilmiş ve hareketli faz olarak ise metanol[108,109,144,146], metanol ile birlikte küçük hacimlerde su[147,149], metanol ile birlikte diğer çözücüler (tetrahidrofuran,[99] n-hekzan,[143] izopropanol[150] ve asetonitril[155]) kullanılmıştır. Plazma veya serum analizlerinde α-T ile birlikte diğer yağda çözünen vitaminlerin miktar analizleri genellikle farklı çözücü karışımından oluşan hareketli faz ile gradient elüsyon yapılarak[161,163] veya daha farklı izokratik hareketli faz karışımları (asetonitril-metanol-amonyumasetat[138,156] ve bu sisteme eklenmiş amonyum asetat,[160] metanol-asetonitril-kloroform[139] ve bu sisteme eklenmiş BHT,[141] metanol-asetonitril-tetrahidrofuran[151] ve bu sisteme eklenmiş askorbik asit,[140] metanol-asetonitril-etilasetat,[165] metanol-bütanol-su,[148] su-asetonitril-etilasetat- 2 propanol[157] ve metanol-etanol-trietilamin[173]) kullanılarak kromatografik ayırım gerçekleştirilmiştir. Ayrıca elektrokimyasal dedektör kullanılmış ise hareketli faza genellikle perklorat gibi bir elektrolit eklenmiştir.[158] Çalışmamızda, literatürde çok

az yer alan $C_8$ kolon kullanılmış olup literatürden farklı bir hareketli faz karışımı olan metanol-asetonitril-su kullanarak α-T ve literatürden farklı yeni bir iç standardının ($K_2$ vitamini) kromatorafik ayırımı sağlayan basit ve oldukça hızlı bir HPLC-DAD yöntemi geliştirildi.

Plazma çalışmasında, geliştirilen ve geçerlilik testleri yapılan HPLC-DAD yönteminin uygulanabilir olduğunu görmek için tavşan ve insan çalışması yapıldı.

Yapılan literatür taramasında HPLC yöntemi ile oral ve intravenöz olarak verilen koyunlarda,[101] HPLC yöntemi ile oral olarak verilen danalarda,[103] intravenöz olarak verilen tavşanlarda[104] ve intravenöz ve intramusküler olarak verilen yeni doğan tavşanlarda[105] α-T'nin farmakokinetik belirlenmesine yönelik çalışmalara rastlandı. Fakat HPLC-DAD yöntemi ile oral olarak verilen tavşanlarda α-T'nin farmakokinetik belirlenmesine yönelik bir çalışmaya rastlanmadı.

Tavşan çalışmasında α-T içeren Evicap® (400 I.U./kapsül) ilacı 268,46 mg olacak şekilde şekilde 3 adet beyaz sağlıklı tavşana oral olarak verildi. Tavşan plazmasından elde edilen ekstraktlar HPLC-DAD sistemine enjekte edilerek kromatogramları alındı. Elde edilen değerlerden süreye karşılık plazma α-T derişim eğrileri çizildi. HPLC-DAD yöntemi ile elde edilen derişim-zaman eğrilerinden ilacın farmakokinetik parametreleri Tablo 4.45'de verildi. Elde edilen verilerin bir kanser koruyucusu olarak bilinen α-T'nin insan vücudundaki farmokinetiği ve metabolizması ile ilgili çalışmalara yardımcı olabileceği söylenebilir.

α-T'nin oral verildiği bu çalışmada, tavşanlarda başlangıç derişimi 0,210±0,096 μg/mL olarak elde edilirken Hıdıroğlu ve Karpınski[101] koyunlarda başlangıç derişimini oral verildiğinde 1,16 μg/mL olarak ve intravenöz verdiğinde 0,93 μg/mL belirlemiştir. Eicher ve ark.[103] 134,2 mg D-α-T danalara oral olarak vermiş ve verdikten sonra 12–20

saat sonra maksimum düzeye ulaştığını belirtirken, Hıdıroğlu ve Karpınski[101] maksimum zamana ulaşma zamanını koyunlarda 26 saat olarak belirlemiştir. Bu çalışmada maksimum düzeye ulaşma zamanı 24 saat ile 72 saat arasında değiştiği belirlendi. Ayrıca Pedraz ve ark.[104] ise α-T'nin ortalama biyoyararlanımının % 35 olduğunu göstermişlerdir.

Yapılan literatür taramasında α-T'nin sağlıklı insan plazmasında derişimlerinin belirlenmesine yönelik birçok çalışmaya rastlanmasına rağmen mesane kanserli hastaların plazma derişimlerinin belirlenmesine yönelik bir çalışmaya rastlandı.[54] Bu çalışmada Lutein, zeaksantin, β-kriptoksantin, likopen, α-K, β-K, retinol, α-T ve γ-T'i HPLC yöntemi ile plazmada belirlemişler fakat α-T ile kanser riski arasındaki ilişkiyi belirtmemişlerdir. Anderson[56] yüksek miktarda α-T tüketiminin mesane kanserine yakalanma riskini azalttığını belirtirken Holland ve ark.[70] ve Michaud ve ark.[71] E vitamini tüketimi ile mesane kanser riski arasında bir ilişki bulamamışlardır. Mirvish[57] ise hayvanlar üzerinde yaptığı çalışmalar sonunda, bir antioksidan olarak E vitamininin mesane kanserinin oluşumunda yardımcı olan nitrozo bileşiklerini indirgediğini ve böylece E vitaminin mesane kanseri oluşma riskini azalttığını belirtmiştir.

Serum örnekleri alınıp dondurularak bekletilen kişilerin zamanla mesane kanserine yakalandıkları belirtilmiş ve bu kişilerin serum örnekleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında mesane kanserli kişilerin α-T derişimlerinin kontrol grubuna önemsiz derecede düşük olduğu[69] ve bazılarında ise önemli derecede düşük olduğu[74] gösterilmiştir. Bazı çalışmalarda ise serum derişimleri ile mesane kanserine yakalanma riski arasında olumlu bir ilişki kurulurken[74] bazı çalışmalarda hiç ilişki kurulamamıştır.[69]

Sağlıklı gönüllü kişilerde α-T'nin derişimlerini sırasıyla, Boonsiri va ark.[75] yaşları 19-62 arasında olan 294 kişide 26,64 ± 14,85 μmol/L olarak; Zaman ve ark.[138] yaşları 23-50 arasında olan genç kişilerde ortalama 23,22 μmol/L ve yaşları 77-89 arasında olan yaşlı kişilerde 30,02 μmol/L olarak; Talwar ve ark.[140] yaşları 19-62 arasında olan erkeklerde ortalama 29,6 μmol/L (45 kişi) ve bayanlarda 30,4 μmol/L (60kişi) olarak; Karppi ve ark.[141] 34 kişide yaptıkları çalışmada ortalama 28,8 μmol/L olarak; Silluk ve ark.[142], Balitmore aging çalışmasında yer alan 221 hastada α-T'nin derişimini 2,03 μg/ml ile 28,18 μg/mL arasında ve Karpinska ve ark.[143] yaşların 2-9 arasında rejim yapan ve sağlıklı çocukların α-T derişimlerini sırasıyla 29,44 μmol/L ve 21,95 μmol/L olarak; Quaseda ve ark.[150] farklı yaş gruplarında çalışmış olup α-T derişimini ortalama bayanlarda 4,7 ile 6,4 μg/mL arasında ve erkeklerde 4,0 ile 5,7 μg/mL arasında olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca, Zhao ve ark.[151] Çin'de bir sağlıklı gönüllüye antioksidan kapsülü içirmişler ve A ve C vitaminleri ile β-K derişimlerini 40 gün boyunca incelemişler ve ortalama α-T derişimini 6,86 μg/mL olarak bulmuşlardır. Literatürde mesane kanserli hastaların ve sağlıklı gönüllülere verilen tek doz α-T'nin kapsülünün verilmesinden sonra miktar tayinine yönelik bir çalışmaya rastlanmadı.

Evicap® (400 IU / kapsül) tek doz oral olarak sağlıklı gönüllülere ve mesane kanserli hastalara verildi ve plazma örnekleri Bölüm 3.4'de belirtildiği şekilde ekstraksiyonları yapıldı. Altı sağlıklı gönüllü ve altı mesane kanserli hastadan alınan plazma ekstraktları HPLC-DAD sistemine enjekte edilerek kromatogramları alındı ve plazma α-T derişimleri belirlendi. Sağlıklı gönülü ve mesane kanserli hastaların plazma α-T derişimleri (μg/mL) ilaç verilmeden hemen önce ve 12, 24 ve 48'inci saatlerde HPLC-DAD yöntemi ile sırasıyla 5,234 ± 1,970 ve 4,682 ± 2,092, 5,694 ± 1,616 ve

7,096 ± 2,049, 6,773 ± 1,373 ve 7,350 ± 1,785, 7,337 ± 1,706 ve 6,694 ± 1,599 olarak tespit edildi (Tablo 4.50).

Sağlıklı gönüllülerin ve mesane kanserli hastaların sürelere göre elde edilen plazma α-T derişimleri istatistiksel analiz sonuçları istatiksel olarak karşılaştırıldı (*t*-testi) ve aralarında anlamlı bir fark gözlenmedi (0 saat için; $t_{(0)}$=0,470; P>0.05, 12 saat için; $t_{(12)}$=1,316; P>0.05, 24 saat için; $t_{(24)}$=0,628; P>0.05, 48 saat için; $t_{(48)}$=0,674; P>0.05) (Tablo 4.51) Ayrıca altı sağlıklı gönüllünün üçünde 48 saat, ikisinde 24 saat birinde ise 12 saate kadar, mesane kanserli hastaların ise artışın 48 saate kadar uzamandığı ve üçünde 24 saat ve diğer üçünde 12 saate kadar α-T derişimindeki artışın devam ettiği ve daha sonraki saatlerde azaldığı belirlendi (Tablo 4.50).

**Menadion**

Huyghebaert ve ark.[179] uygun kalite, stabilite ve tatta geliştirilen $K_3$ vitamininin kapsül formülasyonlarının oda sıcaklığında ve +8°C'de iki ay stabil kaldığını belirtmişlerdir. Fakat standart MN'nin ve plazmadaki MN'nin stabilitesi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmadı. Çalışmamızda, MN ve MBS'nin stabilite koşulları belirlenmiş olup bu çalışmada, 60 saat boyunca çalışılan laboratuvar şartlarında, nem, sıcaklık, ışık, hava gibi etkilere karşı bu vitaminin standart ve plazma çözeltilerindeki stabilite koşulları araştırıldı. Stabilite çalışması, karanlık ortamlarda kalite kontrol çözeltileri ile yapıldı ve FDA rehberinde belirtilen kurallara göre (ortalamanın ± %10),[194] analitlerin stabilite şartları belirlendi. MN standart çözeltilerinin, oda sıcaklığında 24 saat, +4°C ve -20°C'de 60 saat stabil kaldığı; plazma çözeltilerinin ise oda sıcaklığında düşük derişimlerde 24 saat (endojen MN içeren plazma, 0,305 μg/mL ve 1,525 μg/mL) yüksek derişimlerde 6 saat (6,1 μg/mL) , -20°C, -70°C ve -70°C'de yapılan donma-erime turlarından sonra 60 saat ve otoörnekleyici üzerinde ekstraksiyonu

yapılmış plazma örneklerin 24 saat stabil kaldığı; MBS standart çözeltilerinin, oda sıcaklığında 24 saat, +4°C ve -20°C'de 60 saat stabil kaldığı; plazma çözeltilerinin ise oda sıcaklığında 6 saat, -20°C, -70°C ve -70°C'de yapılan donma-erime turlarından sonra 60 saat ve otoörnekleyici üzerinde ekstraksiyonu yapılmış plazma örneklerin 24 saat stabil kaldığı belirlendi (Tablo 4.1, 4.2 ve 4.3).

MN lipofilik bir bileşik iken MBS hidrofolik bir bileşiktir. Biyolojik sıvılardan MBS'nin ekstraksiyonu ile ilgili herhangi bir literatüre rastlanılmazken MN'nin ekstraksiyonuna ait birkaç çalışmaya rastlandı. Hu ve ark.[124] MN'i plazmadan n-hekzan ile ekstrakte etmiş fakat güçlü azot gazı altında hekzan fazını uçururken MN'nin büyük bir kısmının kaybolduğunu fark etmiş ve bu yüzdende ekstrakte edilmiş hekzan fazına % 70'lik metanol çözeltisi eklemiştir. Bu şekilde geri kazanımının % 82,4 ± 7,69 olarak belirlemiştir. Huang ve ark.[121] serum ve idrarda MBS'yi belirlemek için alkali ortamda MN'ye çevrilmesi gerektiğini belirtmiş plazma proteinleri $Ba(OH)_2$ ve $ZnSO_4$ ile çöktürmüş ve santrifüjlemiştir ve üst tabakanın bir kısmını alıp $KH_2PO_4$-NaOH ekleyerek kemilüminisans yöntemle analiz etmişlerdir. Ayrıca, Akman ve ark.[125] plazmadan MN'yi eter ile ekstrakte etmiştir. MN ile birlikte diğer yağda çözünen vitaminlerin birlikte belirlenmesi için yapılan çalışmalardaki MN'nin serum ve plazmadan ektraksiyonunu, Capote ve ark.[180] metanol (proteinleri denatüre etmek için) ve n-hekzan karışımını, Man Po ve ark.[173] ise plazma örneklerine 1 M HCl eklemiş ve daha sonda metanol, etanol, hekzan, benzen, diklor metan, izooktan veya kloroform ekstraksiyon çözücülerinden birini ekleyerek sağladıklarını belirtmişler ve herbir vitamin için % 40 ve üzerinde geri kazanım değerleri elde etmişlerdir. Rizk,[120] MN'nin plazmada potansiyometrik belirlenmesinde herhangi bir ektraksiyon işlemi uygulamamıştır. Çalışmamızda MN'nin Bölüm 3.4.3'de, MBS'nin ise Bölüm 3.4.4'de

belirtildiği gibi ektraksiyonu yapıldı. MBS'nin ektraksiyonunda $Na_2CO_3$ hem proteinlerin denatüre edilmesinde hemde MBS, MN'ye dönüştürülmesi için kullanılırken MN'nin ekstraksiyonunda ise $Na_2CO_3$ sadece proteinleri çöktürmek için kullanıldı. Plazmadan MN'nin ekstraksiyonu ise n-hekzan ile sağlandı. n-hekzan fazı ayrılarak MN'nin azot gazı altında uçurulma sırasında kaybını önlemek amacı ile direk kromatografik ve spektrofotometrik yöntemlerle analiz edilerek plazma geri kazanım değerlerini literatürde belirtilen geri kazanım değerlerinden yüksek geri kazanım değerleri elde edildi (MN için geri kazanım değerleri, UV-görünür Bölge, 1D- ve 2D-spektrofotometre ve HPLC-DAD çalışmalarında sırasıyla % 86,3, % 91,6, % 90 ve % 86,9'den büyük ve MN'ye dönüştürülen MBS için geri kazanım değerleri, UV-görünür Bölge, 1D- ve 2D- spektrofotometre ve HPLC-DAD çalışmalarında sırasıyla % 86,8, % 92,3, % 84,4 ve % 88,1'den büyük olarak tespit edildi).

İç standart çalışmalarda hatayı minumuma indirmek için kullanılmaktadır Literatürde $K_3$ vitaminin kromatografik analizlerinde karbazol[29,124] ve ksantofil[174] iç standartları kullanılmıştır. Çalışmamızda MN ve MN'ye dönüştürülen MBS'nin analizlerinde yeni bir iç standart olarak yağda çözünen bir vitamin olan $K_2$ vitamini kullanıldı.

Yapılan literatür taramasında, farmasötik preparatlarda MN ve MBS'nin belirlenmesine yönelik, spektrofotometrik yöntemler,[126,130-132] kemilüninesans,[121,133,136] akış enjeksiyonlu florometri,[127,134] florometri[137] ve voltametri[123] yöntemleri geliştirilmiştir. Spektrofotometrik yöntemler ile farmasötik preparatlarda MN ve MBS'yi, Helaleh[126], MN'nin NaOH ile reaksiyonu sonucunda oluşan 450 nm'de güçlü bir absorbans veren renkli komplek oluşturarak; Nagaraja ve ark.[130] MN ve MBS'yi NaOH ortamında 3-metil-2-benzotiazolin hidrazon HCl (MBTH) ile 625 nm de

maksimum absorbans gösteren mavi renkli kompleks oluşturarak ve MN ve MBS'yi derişik $H_2SO_4$ ortamında resorkinol ile 520 nm de maksimum absorbans gösteren mavi renkli bir kompleks oluşturarak; Robert ve ark.[131] naftokinonları Ti(III) ile naftohidrokinonlara indirgeyerek naftohidrokinon kompleksi oluşturarak; Sastry ve ark.[132] MN'yi demir klorit varlığında 3-metil-2-benzotiazolin hidrozon (MBTH) ile 650-670 nm dalga boyunda maksimum absorbans gösteren koyu mavi renkli bir kompleks oluşturarak MN ve MBS'yi belirlemişlerdir. MN ve MBS ile ilgili yapılan literatür taramasında MBS içeren farmasötik preparatlarda UV-Görünür Bölge, 1D- ve 2D- Spektrofotometre yöntemleriyle türevlendirmeksizin (direk) ve MN'ye dönüştürülerek miktar tayininin yapılmasına yönelik bir çalışmaya rastlanmadı. Bu sebeple çalışmada, MBS'nin farmasötik preparatlarda miktar tayininin hem direk hemde MN'ye dönüştürülerek yapılabilmesi için MN ve MBS için ayrı ayrı UV-Görünür Bölge, 1D- ve 2D- Spektrofotometre yöntemleri geliştirildi ve geçerlilik testleri yapıldı.

Farmasötik preparatlarda MN ve MBS'nin miktar tayini için ayrıca HPLC-DAD yöntemi geliştirildi ve geçerlilik testleri yapıldı. Yapılan literatür taramasında hayvansal besinlerde $K_3$ vitaminin belirlenmesine için normal faz sıvı kromatografi yöntemine,[128] farmasötik preparatlarda post kolonda hidrokinon formuna indirgeme temeline dayanan floresans dedektörlü HPLC yöntemine,[129] amperometrik dedektör ile belirlenmesi için çift cam karbon elektrot serileri ile birleştirilmiş bir ters faz HPLC yöntemine[135] ve GC yöntemine[119] rastlandı. Fakat $C_8$ kolon ile HPLC-DAD yöntemleriyle türevlendirmeksizin (direk) ve MN'ye dönüştürülerek miktar tayininin yapılmasına yönelik bir çalışmaya rastlanmadı. Bu sebeple çalışmada, MBS'nin farmasötik preparatlarda miktar tayininin hem direk hemde MN'ye dönüştürülerek yapılabilmesi için MN ve MBS için HPLC-DAD yöntemi geliştirildi ve geçerlilik testleri yapıldı.

MN'nin belirlenmesi için geliştirilen HPLC-DAD yönteminde kromatografik ayırım, ters faz $C_8$ kolon, (5 µm, 150 x 4,6 mm) metanol-su hareketli fazının gradient elüsyonu, 30°C kolon sıcaklığı, 1 mL/dak. kolon akış hızı ve 330 nm dalga boyu kullanarak gerçekleştirildi.

MBS'nin belirlenmesi için geliştirilen HPLC-DAD yönteminde ise kromatografik ayırım, ters faz $C_8$ kolon, (5 µm, 150 x 4,6 mm) metanol-su hareketli fazının (50/40, h/h) gradient elüsyonu, 30°C kolon sıcaklığı, 1 mL/dak. kolon akış hızı ve 230 nm dalga boyunda gerçekleştirildi. Farmasötik preparatlarda MBS'nin direk ve MN'ye döüştürülerek yapılan miktar analizleri için uygulanan UV-Görünür Bölge ve 1D- ve 2D- Spektrofotometre ve HPLC yöntemlerinin birbiriyle karşılaştırılması amacıyla da *F*-testi yapıldı. Bu test sonucunda her iki şekilde geliştirilen yöntemlerin istatiksel olarak aralarında herhangi bir farkın olmadığı görüldü. (sırasıyla, $F_h$: 1,960 ve 2,150, $p>0,05$) (Tablo 4.43). Sonuç olarak, geliştirilen bu dört yöntemin ilaç endüstrisinde kalite kontrol çalışmalarında başarıyla uygulanabilir olduğu söylenebilir.

Literatürlerdeki farmasötik preparatlarda MBS'nin belirlenmesi için, Liu ve ark.[135] $C_{18}$ kolon ve 0.2 mol/L asetat tamponu (pH: 5,50)-metanol hareketli fazı (6/4, h/h) kromatografik çalışma şartlarında elektrokimyasal dedektörlü HPLC yöntemi,[135] Laffi ve ark.[128] MBS'yi MN'ye dönüştürerek direk normal fazlı HPLC yöntemi[128] ve $C_{18}$ kolon ve metanol hareketli fazından oluşan kromatografik çalışma şartlarında fotokimyasal indirgenne-florosans dedektörlü HPLC yöntemi[129] kullanmış olup Çalışmamızda, geliştirilen yöntemlerden çok daha basit bir sistem olan $C_8$ kolon ve metanol su hareketli faz karışımı kullanıldı. Ayrıca çalışma esnasında hataları minimize etmek için iç standart kullanıldı. Literatürde çalışma aralıkları 0,1–10 µg/mL[129] ve 0,035-15 µg/mL[135] olarak, dedeksiyon limitleri 0,8 ng/mL[129], 15 ng[135] ve 2,5 µg/mL[128]

olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda ise bu çalışmalardan daha geniş derişim aralığı belirlendi. (0,5–20 μg/mL) (Tablo 4.28) arasında belirlendi ve gözlenebilme sınırları MBS için 5 ng/mL ve MN için ise 10 ng/mL (Tablo 4.32) olup literatürde belirtilen yöntemler kadar hassastır.

Yapılan literatür taramasında, plazmada MN ve MBS'nin belirlenmesine yönelik, potansiyometrik,[120] kemilüninesans[121] ve polarimetrik[125] yöntemlere rastlanmasına rağmen plazmadan MN ve MN'ye dönüştürülerek analiz edilen MBS'nin UV-Görünür Bölge, 1D- ve 2D- Spektrofotometre yöntemleriyle miktar tayininin yapılmasına yönelik bir çalışmaya rastlanmadı. Bu sebeple çalışmada, MN ve MN'ye dönüştürülerek analiz edilen MBS'nin plazmada miktar tayininin hem MN hemde MN'ye dönüştürülerek MBS için ayrı ayrı UV-Görünür Bölge, 1D- ve 2D- Spektrofotometre yöntemleri geliştirildi ve geçerlilik testleri yapıldı.

MN ve MBS'nin plazmada belirlenmesinde, optimum çalışma koşulları belirlenen spektrofotometrik yöntemler ile plazmadan Bölüm 3.4'de belirtildiği şekilde ekstrakte edilen MN ve MN'ye dönüştürülen MBS'nin spektrumları alındı. MN ve MN'ye dönüştürülen MBS'nin plazmada belirlenmesine yönelik geliştirilen ve geçerlilik testleri yapılan her üç yöntemin belirtilen dalga boylarında plazmada MN miktar tayini için uygulanabilir olduğu söylenebilir.

Plazmada MN ve MBS'nin miktar tayini için ayrıca HPLC-DAD yöntemi geliştirildi ve geçerlilik testleri yapıldı.

Literatürde, serum veya plazmada MN'nin belirlenemesine yönelik üç çalışmaya rastlanılmış olup bu çalışmaların hepsinde ters faz $C_{18}$ kolon ve UV esaslı dedektörler kullanılmıştır. Hu ve ark.[124] $K_3$ vitamininin plazmada belirlenmesi için geliştirdiği HPLC yönteminde metanol-su hareketli fazı, Man Po ve ark.[173] plazmada $K_3$

vitamininin retinoik asit, retinol, retinal, $D_2$, $D_3$, $K_1$, $K_2$ vitaminleri ile birlikte belirlenmesi için geliştirdiği HPLC yönteminde metanol-etanol-trietilamin (% 0,1) hareketli fazı ile ve Chatzimichalakis ve ark.[174] idrar ve serumda $K_3$ vitamini, retinol, menakinon, α-T, kolekalsiferol, α-T asetat ve filokinonu içeren sekiz yağda çözünen vitamini ile birlikte belirlenmesi için geliştirdiği HPLC yönteminde asetonitril-metanol hareketli fazı kullanmışlardır. MN ve MN'ye dönüştürülen MBS'nin plazmada belirlenmesine yönelik çalışmamız, literatürde yer almayan $C_8$ kolon kullanılan HPLC-DAD sisteminde gerçekleştirilmiştir.

Endojen MN (18 ng/mL) içeren plazmadan Bölüm 3.4'de belirtildiği şekilde ekstrakte edilen MN ve MN'ye dönüştürülen MBS'nin miktar tayini için geliştirilen ve geçerlilik testleri yapılan HPLC-DAD yönteminde kromatografik ayırım, ters faz $C_8$ kolon, (5 μm, 150 x 4,6 mm) metanol-su hareketli fazının gradient elüsyon, 30°C kolon sıcaklığı, 1 mL/dak. kolon akış hızı ve 330 nm dalga boyunda gerçekleştirildi. Bu çalışmada literatürde çok az yer alan $C_8$ kolon kullanılmış olup literatürde belirtilen metanol-su hareketli fazı gradient elüsyon ile farklı oranlarda kullanılan basit ve oldukça hızlı bir HPLC-DAD yöntemi geliştirildi.

Plazma çalışmasında, MN ve MN'ye dönüştürülen MBS'nin belirlenemesi için geliştirilen ve geçerlilik testleri yapılan HPLC-DAD yönteminin uygulanabilir olduğunu görmek amacıyla tavşan ve insan çalışması yapıldı.

Yapılan literatür taramasında HPLC yöntemi ile tavşanlara intravenöz olarak verilen[29,124] menadiol sodyum difosfat farmakokinetik belirlenmesine yönelik çalışmalara rastlandı. Bu çalışmalarda menadiol sodyum difosfatın major metabolitinin MN olduğu belirtilmiş ve MN derişiminin değişimi incelenmiştir. Fakat oral olarak

verilen MBS'nin in vitro ortamda MN'ye dönüştürerek tavşanlarda MN'nin farmakokinetik belirlenmesine yönelik bir çalışmaya rastlanmadı.

Çalışmada MBS içeren Libavit K® (20 mg / 2 mL) ilacı 100 mg olacak şekilde şekilde 3 adet beyaz sağlıklı tavşana intravenöz olarak verildi. Ayrıca Libavit K® (20 mg / 2mL) iki doz oral olarak sağlıklı gönüllülere ve mesane kanserli hastalara verildi. Plazma örnekleri Bölüm 3.4'de belirtildiği şekilde ekstrakte edildi. Tavşan plazmasından elde edilen ekstraktlarının MN'ye dönüştürülen MBS için geliştirilen HPLC-DAD yöntemi ile analiz edilerek kromatogramları alındı. Elde edilen değerlerden süreye karşılık plazma MN derişim eğrileri çizildi. HPLC-DAD yöntemi ile elde edilen derişim-zaman eğrilerinden ilacın farmakokinetik parametreleri Tablo 4.46'da verildi.

Litaratürde, MBS'nin oral verildiği çalışmaların birinde[29] $C_{max}$, $t_{max}$, yarılanma ömrü ($t_{1/2}$), klirensi, bozulma hacmi ve AUC'si sırasıyla, 4,29 dak., 2,102 dak., 27,17±10,49 dak., 0,822 ± 0,254 L/dak., 30,833 ± 12,835 L, 32,453 ± 9,785 µg dak./mL olarak verilirken diğerinde[124] ortalama yarılama ömrünü, eliminasyon yarı ömrünü, bozulma hacmini ve plazma klirensini sırasıyla 26,3 ± 2,97 dak., 2,60 ± 0,12 dak., 25,7 ± 0,78 L ve 0,68 ± 0,10 L/dak. olarak verilmiştir. Çalışmamızda elde edilen farmakokinetik değerler Tablo 4.46'da verilmiş olup maksimum plazma derişimi daha yüksek ve maksimum plazma derişimine ulaşma zamanı daha kısa olarak belirlendi. Literatürde[124], menadiolün kanda hızlı bir sekilde MN'ye dönüştüğünü ve MN'nin degişmez formasyon oranı (kf) plazmada 0,589 ± 0,246 1/dak. iken kırmızı kan hücrelerinde 1,520 ± 1,345 1/dak. olduğunu belirtilmiştir. Çalışmamızda MBS ekstraksiyon sırasında tamamen MN'ye dönüştürüldüğü için hem MBS'nin metabolite olduğu MN hemde MBS'nin invitro dönüştürüldüğü MN incelenmiş olup MN'nin

belirlenmesindeki analitiksel zorluk ortadan kaldırılmış oldu. Ayrıca tavşan ekstraktlarında sadece MBS'nin in-vivo koşullarda dönüştüğü metaboliti olan MN belirlendi ve maksimum derişimler arasında 10 kata varan fark bulundu.

Yapılan literatür taramasında MN'nin sağlıklı gönüllü ve mesane kanserli kişilerin plazmasında derişimlerinin belirlenmesine ve doz sonrası sürelere göre derişiminin belirlenmesine yönelik bir çalışmaya rastlanmadı. Bunun sebebinin MN'nin plazma derişiminin çok düşük olmasından kaynaklandığı belirtilmektedir. Çalışmamızda MBS in-vitro koşullarda tamamen MN'ye dönüştürüldüğü için insan plazmasında miktar tayini yapılabildi. Tek doz menadiol sodyum difosfat verilen bir çalışmada ise iki hastanın 0,5 ve 1 saat sonra plazma örneklerinde MN'nin polarografik yöntemle belirlenmesine yönelik bir çalışmaya rastlandı. Bu çalışmada plazma derişimlerinin 0,5 saat sonra 0,08 μg/mL ve 10 saat sonra ise 0,3 μg/mL ulaştığı gösterilmiştir. Literatürde mesane kanserli hastaların ve sağlıklı gönüllülere verilen tek doz MBS'nin verilmesinden sonra sürelere göre miktar tayinine yönelik bir çalışmaya rastlanmadı.

Altı sağlıklı gönüllü ve altı mesane kanserli hastadan alınan plazma ekstraktlarının MN'a dönüştürülen MBS için geliştirilen HPLC-DAD yöntemi ile analiz edilerek kromatogramları alındı ve plazma MN derişimleri belirlendi. Sağlıklı gönülü ve mesane kanserli hastaların plazma MN derişimleri (μg/mL) ilaç verilmeden hemen önce ve 3, 5, 10'uncu dak.'larda sırasıyla 0,305 ± 0,012 ve 0,010 ± 0,007, 0,046 ± 0,021 ve 0,026 ± 0,013, 0,088 ± 0,051 ve 0,041 ± 0,032, 0,078 ± 0,063 ve 0,018 ± 0,018 olarak ( Tablo 4.52); sağlıklı gönüllülerin ve mesane kanserli hastaların sürelere göre elde edilen plazma MN derişimleri istatistiksel analiz sonuçları istatiksel olarak karşılaştırıldı (*t*-testi) ve MN derişimleri arasında ilaç uygulanmadan önce ve ilaç uygulandıktan 10 dak. sonra istatiksel olarak anlamlı bir fark gözlenirken 3 ve 5 dak.'larda anlamlı bir fark

gözlenmedi (0 dak. için; $t_{(0)}$=3,399; P<0.05, 3 dak. için; $t_{(3)}$=1,993; P>0.05, 5 dak. için; $t_{(5)}$=1,934; P>0.05, 10 dak. için; $t_{(10)}$=2,236; P>0.05) (Tablo 4.53).

Vitaminlerin, günümüzün ölümcül hastalıkları arasında önemli bir yere sahip olan kanser ile olan ilişkisinin belirlenebilmesi ve literatürde belirtilen sistemik dolaşımdaki anlaşılmaz davranışlarının aydınlığa kavuşabilmesi için yeni hayvansal modeller ve analitiksel yöntemler geliştirmeye ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışma, A, E ve K vitaminlerinin farmasötik preparatlarda ve plazmada miktar tayini için farklı analitik yöntemler geliştirilmesi, geçerlilik testlerinin yapılması ve geliştirilip geçerlilik testleri yapılan yöntemlerin uygulanabilir olduklarını göstermek amacıyla yapılmıştır. Çalışma sonucunda bu vitaminlerin analizinde geliştirilen yöntemlerin hızlı ve basit olduğu, farmasötik preparatların kalite kontrol ve klinik çalışmalarında uygulanabilir olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, elde edilen verilerin mesane kanserinin önlenmesi, tedavisi ve gelişimine dayalı ileriki çalışmalara ve vitaminlerin sistemik dolaşımındaki davranışlarının belirlenmesine yönelik yapılacak incelemeler yol göstereceği düşüncesindeyiz.

## KAYNAKLAR

**1-** Vitaminler (çevrimiçi). "http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-1-10.pdf". 2008

**2-** Champe PC, Harvey RA. Biyokimya, 2.Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri, 1997: 319.

**3-** Schneider C. Chemistry and biology of vitamin E. Mol Nutr Food Res 2005; 49: 7-30.

**4-** Çakmakçı S, Çelik İ. Tokoferoller, Gıda katkı maddeleri, Erzurum, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Ofset Baskı, 2004: 60.

**5-** Nelis HJ, D'Haese E, Vermis K. De Leheer AP. Modern chromatographic analysis of vitamins, Third edition, New York, USA, Marcel Dekker Incorporated, 2000: 143-228.

**6-** Kamal-Eldin A, Appelqvist LA. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. Lipids 1996; 31: 671-701.

**7-** Kayaalp SO. Vitaminler ile ilgili genel bilgiler. rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji, Ankara, Feryal Matbaası, 1992: 2934-2967.

**8-** European Pharmacopoeıa-Supplement, 3 rd edition, 2001: 1516-1518.

**9-** Traber MG, Packer L. Vitamin E: beyond antioxidant function. Am J Clin Nutr 1995; 62: 1501-1509.

**10-** Packer L, Weber SU, Rimbach G. Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signalling. J Nutr 2001; 131: 369-373.

**11-** Barua AB, Olson JA, Furr HC, Van Bremen RB, De Leheer AP. Modern chromatographic analysis of vitamins, Third edition, New York, USA, Marcel Dekker Incorporated, 2000: 1-73.

**12-** Odabaşoğlu F. Antioksidan vitaminler, Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Konferansı, 1999:1-27.

**13-** Isler O, Gutnann US, Carotenoids. Basel: Birkhauser Verlag. 1971:1-932.

**14-** Vikipedi Özgür Ansiklopedi, Karoten (Çevrimiçi). "http://tr.wikipedia.org/wiki/Karoten", 21 Ekim 2008.

**15-** Slater TF, Block G. Antioxidant vitamins and beta-carotene in disease prevention. Am J Clin Nutr 1991; 53(1): 189-396.

**16-** Parker RS. Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. Clin Chem 1990; 38(11):452-544.

**17-** Correa P. Human gastric carcinogenesis a multiple and multifactorial process american cancer society award lecture on cancer epidemiology and prevention. Cancer Res 1992; 52: 6735-6740.

**18-** Burton GW, Ingold KU. β-carotene: an unusual type of lipid antioksidant. Science 1984; 224: 569-573.

**19-** Krinsky NI. Mechanism of action of biological antioxidant. By Soc Exp Biol Med 1992; 200: 248-254.

**20-** Pereira SP, Rawbothom D, Fitt S, Sheaver MS, Wendon J, Williams R. Pharmacokinetics and efficacy of oral versus intravenous mixed-micellar phylloquinone (vitamin K1) in severe acute liver disease. J Hepatol 2005; 42: 365-370.

**21-** Bolton-Smith C, Pirice RJG, Fenton ST, Harrington DJ, Shearer MJ. Compilation of a provisional UK database for the phylloquinone (vitamin K1) content of foods. Br J Nutr 2000; 83 (4):389-399.

**22-** Knapen MH, Hamulyak K, Vermeer C. The effect of vitamin K supplementation of circulating orteacalcin (bone Gla protein) and urinary calcium excretion. Ann Intern Med 1989; 111:1001-1003.

**23-** Kamao M, Suhara Y, Tsuqawa N, Okano T. Determination of plasma vitamin K by high liquid chromotography with fluoresrance detection using vitamin K analogs as internal standart. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2005; 816: 41-48.

**24-** Sigma information, Menadione, (Çevrimiçi), "www.sigma-aldrich.com", 2007.

**25-** Fauler G, Muntean W, Leis HJ, Modern chromatographic analysis of vitamins, Third Edition, New York, USA, Marcel Dekker Incorporated, 2000: 229-270.

**26-** Shearer MJ. Role of vitamin K and Gla proteins in the path-ophysiology of osteoporosis and vascular calcification. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2000; 3(6): 433-438.

**27-** Sato Y, Honda Y, Kuno H, Oizumi K. Menatetrenone ameliorates osteopenia in disuse-affected limbs of vitamin D-and K-deficient stroke patients. Bone 1998; 23(3): 91-96.

**28-** Akiyama Y, Hara K, Ohkawa I, Tajima T. Effects of menatetrenone on bone loss induced by ovariectomy in rats, Japanese Pharmacol 1993; 62(2): 145-153.

**29-** Hu OY, Wu CY, Chan WK, Wu FY, Whang-Peng J. A pharmacokinetic study with the high-dose anticancer agent menadione in rabbits. Biopharm Drug Dispos 1996; 17(6): 493-499.

**30-** Hillard TC, Whitcroft SJ, Marsh MS. Long-term effects of transdermal and oral hormone replacement therapy on postmenopausal bone loss. Osteoporos Int 1994; 4(6): 341-348.

**31-** Bauckaert JH, Said AH. Fracture healing by vitamin K. Nature 1960; 185: 849-852.

**32-** Venugonal M, Jamison JM, Gilloteaux J, Koch JA. Synergistic antitumor activity of vitamins C and K3 on human ürologic tumor cell lines. Life Sci 1996; 59(17): 1299-1400.

**33-** Taper HS, Jamison JM, Gilloteaux J, Summers JL, Calderon PB. Inhibition of the development of metastases by dietary vitamin C: K3 combination. Life Sci 2004; 75: 955-967.

**34-** Öztopçu P, Kabadere S, Uyar R. K3 vitamininin sıçan glıoma (C6) ve insan glioblastomamultiforme hücre çoğalmasına invitro etkileri. ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi, 2005; 6(1): 21-25.

**35-** Lamson DW, Plaza SM. The anticancer effects of vitamin K. Altern Med Rev 2003; 8(3): 303-318.

**36-** Robbins KC. Neoplazi. Basic Pathology, 2000: 132-175.

**37-** Bozkırlı İ. Üregenital sistemin klinik anatomi ve fizyolojisi. Yeni Üroloji, Ankara Üniversitesi Basımevi, 1987: 3-43.

**38-** Anafarta K. Ürogenital organların anatomik ve histolojik yapısı. Üroloji, Güneş Kitabevi Yayınları, 1990:1-21.

**39-** Catolona WJ, Ürothelial tumors of the urinary tract. In Walsh P.C. Retik T.A., Stamey T.A.,Vaughan E.D., eds, Campbell's Urolog. W.B. Saunders Company sixht edit., Philadelphia, 1992; 2: 1094-1144.

**40-** Bozkırlı İ, Ürogenital sistem tümörleri. Yeni Üroloji, Ankara Üniversitesi Basımevi, 1987: 51-124.

**41-** Lamm DL, Riggs DR, Shriver JS, Vangilder PF, Rach JF, Dehaven JI. Megadose vitamins in bladder cancer: a double-blind clinical trial. J Urol 1994; 151(1):21-26.

**42-** Johnson DE, Swanson DA, Eschenbach AC. Tumors of the genitourinary tract. In Tanagho EA, Mcannich JW, eds., General Urology, Twelwe th edit., California, 1988: 330-434.

**43-** Müftüoğlu YZ. Ürogenital sistem tümörleri. Anafarta K. Ed., Güneş Kitabevi Yayınları, 1990: 331-494.

**44-** Metlin C, Graham S. Dietary risk factors in human bladder cancer. Am J Epidemiol 1979; 110: 255-263.

**45-** La Vecchia C, Negri E, Decarli A, D'Avanzo B, Liberati C Franceschi S. Dietary factors in the risk of bladder cancer. Nutr Cancer 1989; 12: 93-101.

**46-** Paganini-Hill A, Chao A, Ross RK, Henderson BE. Vitamin A, beta-carotene and risk of cancer: a prospective study. J Natl Cancer Inst 1987; 79: 443-448.

**47-** Kolonel LN, Hinds MW, Nomura AMY, Hankin JH, Lee J. Relationship of dietary vitamin A and ascorbik acid intake to the risk for cancers of the lung, bladder and prostate in Hawaii. Natl Cancer Inst Monogr 1985; 69: 137-142.

**48-** Steineck G, Hagman U, Gerhardsson M and Norell SE. Vitamin A supplements fried foods fat and urohelial cancer. Int J Cancer 1990; 45: 1006-1011.

**49-** Nomura AM, Kolonel LN, Hankin JH, Yoshizawa CN. Dietary factors in cancer of the lower urinary tract. Int J Cancer 1991; 10-48(2):199-205.

**50-** Wald NJ, Thompson SG, Densem JW, Boreham J, Bailey A. Serum beta-carotene and subsequent risk of cancer: results from the BUPA study. Br J Cancer 1988; 57(4): 428-33.

**51-** Knekt P, Aromaa A, Maatela J, Aaran RK, Nikkari T, Hakama M, Hakulinen T, Peto R, Teppo L. Serum vitamin A and subsequent risk of cancer: cancer incidence follow-up of the finnish mobil clinic health examination survey. Am J Epidemiol 1990; 132(5): 857-870.

**52-** Stähelin HB, Gey KF, Eichholzer M, Lüdin E, Bernasconi F, Thurneysen J, Brubacher G. Plasma antioxidant vitamins and subsequent cancer mortality in the 12-year follow-up of the prospective basel study. Am J Epidemiol 1991;133(8): 766-775.

**53-** Comstock GW, Helzlsouer KJ, Bush TL. Prediagnostic serum levels of carotenoids and vitamin E as related to subsequent cancer in Washington county, Maryland. Am J Clin Nutr 1991; 53(1): 260-264.

**54-** Hung RJ, Zhang ZF, Rao JY, Pantuck A, Reuter VE, Heber D, Lu QY. Protective effects of plasma carotenoids on the risk of bladder cancer. J Urol 2006; 176(3): 1192-1197.

**55-** Prasad KN, Edwards-Prasad J. Effects of tocopherol (vitamin E) acid succinate on morphological alterations and growth inhibition in melanoma cells in culture. Cancer Res 1982; 42: 550-555.

**56-** Vitamin E protects Against Bladder Cancer, (Çevrimiçi), (http://www. alternativemedicine. com/ digest/tissue20 /i20-a88.shtml).

**57-** Mirvish SS. Effects of vitamin C and E on N-Nitroso compound formation, carcinogenesis and cancer. Cancer 1986; 59: 1842-1850.

**58-** Gysin G, Azzi R, Visarius AT. Gamma-Tocopherol inhibits human cancer cell cycle progression and cell proliferation by downregulation of cyclins. FASEB J 2002; 16: 1952 -1954.

**59-** Gali F, Stabile AM, Betti M, Conte C. The effect of alpha and gamma-tocopherol and their carboxyethyl hydroxychroman metabolites on prostate cancer cell proliferation. Arch Biochem Biophys 2004; 423: 97-102.

**60-** Mitchell JS. Clinical trials of tetra-sodium 2-methyl-1: 4-naphthohydroquinone diphosphate, in conjunction with x-ray therapy. Br J Can 1948; 2: 351-359.

**61-** Akman SA, Doroshow JH, Dietrich MF, et al. Synergistic cytotoxicity between menadione and dicumarol vs. murine leukemia L1210. J Pharmacol Exp Ther 1987; 240: 486-491.

**62-** Akman SA, Dietrich M, Chlebowski R, et al. Modulation of cytotoxicity of menadionesodium bisulfite versus leukemia L1210 by the acid-soluble thiol pool. Cancer Res 1985; 45: 5257-5262.

**63-** Waxman S, Bruckner H. The enhancement of 5-fluorouracil anti-metabolic activity by leucovorin, menadione and alpha-tocopherol. Eur J Cancer Clin Oncol 1982; 18: 685-692.

**64-** Nutter LM, Cheng AL, Hung HL, et al. Menadione: spectrum of anticancer activity and effects on nucleotide metabolism in human neoplastic cell lines. Biochem Pharmacol 1991; 41: 1283-1292.

**65-** Su YZ, Duarte TE, Dill PL, Weisenthal LM. Selective enhancement by menadiol of in vitro drug activity in human lymphatic neoplasms. Cancer Treat Rep 1987; 71: 619-625.

**66-** Juan CC, Wu FY. Vitamin K3 inhibits growth of human hepatoma HepG2 cells by decreasing activities of both p34CDC2 kinase and phosphatase. Biochem Biophys Res Commun 1993; 190: 907-913.

**67-** Venugopal M, Jamison JM, Gilloteaux J. Synergistic antitumour activity of vitamins C and K3 against human prostate carcinoma cell lines. Cell Biol Int 1996; 20: 787-797.

**68-** Ervin E, Jamison JM, Gilloteaux J. Characterization of the early events in vitamin C and K3-induced death of human bladder tumor cells. Scanning 1998; 20: 210-211.

**69-** Helzlsouer KJ, Comstock GW, Morris JS. Selenium, lycopene, alpha-tocopherol, beta-carotene, retinol, and subsequent bladder cancer. Cancer Res 1989; 49(21): 6144-6148.

**70-** Holland JF, Frei E, Bast RC, Kufe DW, Morton DL, Clinton SK, Giovannucci EL. Nutrition in the Etiology and Prevention of Cancer. Cancer medicine Weichselbaum R(eds) Williams and Wilkins, Baltimore, 1997:465-494.

**71-** Michaud DS, Pietien P, Taylor PR, Virtanen M, Virtamo J, Albanes D. Intakes of fruits and vegetables, carotenoids and vitamin A, E, C in relation to the risf of bladder cancer in the ATBC cohort study. Br J Cancer 2002; 87: 960-965.

**72-** Albanes D, Heinomen OP, Huttumen JK, Taylor PR, Virtamo J. Effects of α-tocoherol and β-carotene supplement on cancer incidence in the α-tocopherol and β-carotene cancer prevention study. Am J Clin Nutr 1995; 62:1427S-1430S.

**73-** Ross MA, Crosley LK, Brown KM, Duthie SJ, Collins AC, Arthur JR, Duthie GG. Plasma concentrations of carotenoids and antioxidant vitamins in Scottish males: influences of smoking. Eur J Clin Nutr 1995; 49(11): 861-815.

**74-** Liang D, Lin J, Grossman HB, Ma J, Wei B, Dinney CP, Wu X. Plasma vitamins E and A and risk of bladder cancer: a case-control analysis. Cancer Causes Control 2008; 19(9): 981-992.

**75-** Boonsiri P, Pooart J, Tangrassameeprasert R, Hongsprabhas P. Serum beta-carotene, lycopene and alpha-tocopherol levels of healthy people in northeast Thailand. Asia Pac J Clin Nutr 2007;16(1): 47-51.

**76-** Kelm MA, Flanagan VP, Pawlosky RJ, Novotny JA, Clevidence BA, Britz SJ. Quantitative determination of $^{13}$C-labeled and endogenous β-carotene, lutein, and vitamin A in human plasma. Lipids 2001; 36 (11): 1277-1282.

**77-** Xiong Y, Xiong Y, Zhou O, Yingjun F. β-Carotene determined in serum by HPLC and its relative bioavailability. Clin Pharm J 1998; 33: 39-42.

**78-** Rajendran V, Pu YS, Chen BH. An improved HPLC method for determination of carotenoids in human plasma. J Chrom B Analyt Technol Biomed Life Sci 2005; 25; 824(1-2): 99-106.

**79-** Rushin WG, Catignani GL, Schwartz SJ. Determination of β-carotene and its cis izomers in serum. Clin Chem 1990; 36(11): 1986-1989.

**80-** Van Bremen RB. Electrospray liquid chromatography-mass spectrometry of carotenoids. Anal Chem 1995; 67: 2004-2009.

**81-** Van Breemen RB. Experimental design and application of LC-MS-MS and stable isotope labeling for determination of carotenoid bioavailability. J Am Soc Mass Spectrom 2002; 2-6: 77-78.

**82-** Franko M, Bovenkam PV, Bicanic D. Determination of trans-b-carotene and other carotenoids in blood plasma using high-performance liquid chromatography and thermal. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 1998; 718: 47-54.

**83-** Khachik F, Beecher GR, Goli MB. Separation and identification of carotenoids and their oxidation products in the extracts of human plasma. Anal Chem 1992; 64: 2111-2122.

**84-** Hosotani K, Kitagawa M, Improved simultaneous determination method of β-carotene and retinol with saponification in human serum and rat liver. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2003; 791: 305-313.

**85-** Van Breemen RB, Schmitz HH, Schwartz SJ. Continuous-flow fast atom bombardment liquid chromatography/mass spectrometry of carotenoids. Anal Chem 1993; 65, 965-969.

**86-** Nelis HJ, De Roose J, Vandenbavière H, De Leenheer AP. Nonaqueous reversed-phase liquid chromatography and fluorimetry compared for determination of retinol in serum. Clin Chem 1983; 29(7): 1431-1434.

**87-** Krinsky NI, Russett MD, Handelman GJ, Snodderly DM. Structural and geometrical isomers of carotenoids in human plasma. J Nutr 1990; 120(12): 1654-1662.

**88-** Stahl W, Sundquist AR, Hanusch M, Schwarz W, Sies H. Separation of beta-carotene and lycopene geometrical isomers in biological samples. Clin Chem 1993; 39(5): 810-814.

**89-** Yamanushi T, Igarashi O. The mobilization and tissue distribution of beta-carotene in the rat by the venous injection method. J Nutr Sci Vitaminol 1995; 41(2): 169-77.

**90-** Yasuda K, Bioavailabilites of all-tans beta-carotene izomers, Antioksidant vitamins and beta-carotene in disease prevention. International Congress Center, Berlin, 1994; 79:10-12.

**91-** Parvin SG, Bhaskaram P, Sivakumar B. A Novel Pharmacokinetic Approach to Determine the Relative Efficiency of Conversion of B-Carotene to Vıtamın A in Rats and Children. Nutr Res 2000; 20(5): 6334-6345.

**92-** Hagiwara T, Yasuno T, Funayama K, Suzuki S. Determination of lycopene, a-carotene and b-carotene in serum by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry with selected-ion monitoring. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 1998; 708: 67-73

**93-** Lunetta JM, Zulim RA, Dueker SR, Lin Y, Flaig V, Schneider PD. Wolfe BM, Clifford AJ. Method for the Simultaneous Determination of Retinol and β-Carotene Concentrations in Human Tissues and Plasma. Anal Biochem 2002; 304: 100-109.

**94-** Qin J, Yeum K, Johnson EJ, Krinsky NI, Russell RM, Tang G. Determination of 9-cis β-carotene and ζ-carotene in biological samples. J Nutr Biochem 2008; 19(9): 612-618.

**95-** Clarke PA, Barnes KA, Startin JR, Ibe FI, Shepherd MJ. High performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry for determination of carotenoids. Rapid Commun Mass Spectrom 1996; 10: 1781-1785.

**96-** Lacker T, Strohschein S, Albert K. Separation and identification of various carotenoids by $C_{30}$ reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to UV and atmaspheric pressure chemical ionization mass spectrometric dedection. J Chromatogr A 1999; 854: 37-44.

**97-** Oswald AR, Marian TA. Method for the determination of carotene and vitamin A in human blood serum. Am J Clin Nutr 1959; 7:197-202.

**98-** Souri E, Jalalizadeh H, Farsam H, Rezwani H, Amanlou M. Simultaneus determination of anthocyanoside and beta-carotene by third-derivative ultraviolet spectrophotomerty. DARU 2000; 13(1): 1-15.

**99-** Julianto T, Yuen KH, Noor AM. Simple high-performance liquid chromatographic method for determination of α-tocopherol in human plasma. Journal Chromatogr B Biomed Sci Appl 1999; 732(1): 227-231.

**100-** Mottier P, Gremaud E, Guy PA, Turesky RJ. Comparison of gas chromatograpy-mass spectrometry and liquid chromatograpy-tandem mass spectrometry methods to quantify α-tocopherol and α-tocopheroquinone levels in human plasma. Anal Biochem 2002; 301: 128-135.

**101-** Hıdıroğlu M, Karpinski K, Pharmacokinetic disposition in sheepof various vitamin E preparations given orally or intravenously. Br J Nutr 1988; 59: 509-518.

**102-** Melchert HU, Pabel E. Quantitative determination of α, β, γ and δ tocopherols in human serum by by high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry as trimethylsilyl derivatives with a two-step sample preparation. J Chromatogr A 2000; 896: 209-215.

**103-** Eicher SD, Morrill JL, Velazco J. Bioavailability of α-tocopherol fed with retinol and relative bioavailability of D-α-tocopherol or DL-α-tocopherol acetate. J Dairly Sci 1997; 80: 393-399.

**104-** Pedraz JL, Calvo B, Bortolotti A, Celardo A, Bonati M. Bioavailability of intramuscular vitamin E acetate in rabbits. J Pharm 1989; 41(6): 415-417.

**105-** Knight AE, Roberts RJ. Disposition of intravenous administered pharmacological doses of vitamin E in newborn rabbits. J Pediatr 1986; 108: 145-147.

**106-** Vatassery GT, Smith WE and Quach HTA. Liquid chromatographic method for the simultaneous determination of α-tocopherol and tocopherolquinone in human red blood cells and other biological samples where tocopherol is easily oxidized during sample treatment. Anal Biochem 1993; 214(2): 426-430.

**107-** Corrado S, Edoardo M, Marco Vincenti MN and Flavio G. Determination of plasma tocopherols by high-performance liquid chromatography with coulometric detection. J Chromatogr Biomed Appl 1993; 620(2): 268-272.

**108-** Gonzalez-Corbella MJ, Lloberas-Blanch N, Castellote-Bargallo AI, Lopez-Sabater MC, Rivero-Urgell M. Determination of α-tocopherol in plasma and erythrocytes by

high-performance liquid chromatography. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1994; 660(2): 395-400.

**109-** Teissier E, Walters-Laporte E, Duhem C, Luc G, Fruchart JC, Duriez P. Rapid quantification of alpha-tocopherol in plasma and low- and high-density lipoproteins. Clin Chem 1996; 42(3):430-435.

**110-** Takeda H, Shibuya T, Yanagawa K, Kanoh H, Takasaki M. Simultaneous determination of α-tocopherol and α-tocopherolquinone by high-performance liquid chromatography and coulometric detection in the redox mode. J Chromatogr A 1996; 722(1-2): 287-294.

**111-** Lodge JK. Vitamin E bioavailability in humans. J Plant Physiol 2005;162(7): 790-796.

**112-** Cheeseman KH, Holley AE, Kelly FJ, Wasil M, Hughes L, Burton G. Biokinetics in humans of RRR-alpha-tocopherol: the free phenol, acetate ester, and succinate ester forms of vitamin E. Free Radic Biol Med 1995; 19(5): 591-598.

**113-** Pyka A, Sliwiok J. Chromatographic separation of tocopherols. J Chromatogr A 2001; 935 (1-2): 71-6.

**114-** Melchert HU, Pollok D, Pabel E, Rubach K, Stan HJ, Determination of tocopherols, tocopherolquinones and tocopherolhydroquinones by gas chromatograpy-mass spectrometry and presepration with lipophilic gel chromatograpy. J Chromatogr A 2002; 976: 215-220.

**115-** Colleen K, Pelt V, Haggarty P, Brenna T. Quantative subfemtomole analysis of α-tocopherol and deuterated isotopomers in plasma using tabletop GC/MS/MS. Anal Chem 1998; 70: 4369-4375.

**116-** Martinek RG. Method for determination of vitamin E (total tocopherols) in serum. Clin Chem 1964; 10(12): 1078-1086.

**117-** Karyen HJ, Chow CK, Bjorson LK. Spectophotometric method for determination of tocopherol in red blood cells. J Lipid Res 1973; 14: 533-540.

**118-** Stanley MB. Fluorimetric determination of vitamin K3 (menadion sodyum bi sülfit) in synthetic animal feed by high-performance liquid chromatography using a post-column zinc reducer. J Chromatogr A 1989; 472: 371-379.

**119-** Castello G. Gas chromatographic determination of the purity of vitamin $K_3$ (menadione). J Chromatogr A 1977; 139(1): 195-202.

**120-** Rizk NMH. Potentiometric determination of Menadione (Vitamin K3). Microchim 2002; 138: 53-58.

**121-** Huang Y, Zhang C, Zhang X, Zhang Z. Chemiluminescence analysis of menadione sodium bi sülfite and analgin in pharmaceutical preparations and biological fluids. J Pharm Biomed Anal 1999; 21: 817-825.

**122-** Poulsen JR, Birks JW. Photoreduction fluorescence dedection of quinones in high-performance liquid chromatography. Anal Chem 1989; 61: 2267-2278.

**123-** Vire JC, El Mali NA, Patriarche GJ, Square-wave adsorptive stripping valtammerty of menadione (vitamin K3). Talanta 1988; 35(12): 997-1000.

**124-** Hu OYP, Yuan Wu C, Chan WK, Wu FYH. Determination of anticancer drug vitamin K3 in plasma by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1995; 666(2): 299-305.

**125-** Akman SA, Kusu F, Takamura K, Chlebowski R, Block C. Differential pulse polarographic determination of plasma menadione. Anal Biochem 1984; 141(2): 488-493.

**126-** Helaleh MIH. Simple kinetic method for assay of menadione in pharmaceuticals. J AOAC Int 1997; 80(4): 756-761.

**127-** Ruiz TP, Lozano CM, Tomas V, Martin J. Flow-injection fluorimetric determination of menadione using on-line photo-reduction in micellar media. Anal Chem Acta 2004; 514: 259-264.

**128-** Laffi R, Marchetti S, Marchetti M. Normal-phase liquid chromatographic determination of menadione in animal feeds. J Assoc Off Anal Chem 1988; 71(4): 826-828.

**129-** Pérez-Ruiz T, Martínez-Lozano C, García MA, Martín J. High-performance liquid chromatography: photochemical reduction in aerobic conditions for determination of K vitamins using fluorescence detection. J Chromatogr A 2007; 1141(1): 67-72.

**130-** Nagaraja P, Vasantha RA, Yathirajan HS. Spectrophotometric methods for the rapid determination of menadione and menadione sodium bisulphite and their application in pharmaceutical preparations. J Pharm Biomed Anal 2002; 28(1): 161-168.

**131-** Robert J, Nowak and Harry B. Mark, JR. Spectrophotometric Determination of vitamin K compounds. Anal Chem 1977; 49(9): 1343-1346.

**132-** Sastry CSP, Rajendraprasad Singh N, Narayana Reddy M, and Sankar DG. Spectrophotometric determination of menadione and menadione sodium bisulfite in pharmaceutical preparations. Int J Pharm 1987; 39(1-2): 137-140.

**133-** Pérez-Ruíz T, Martínez-Lozano C, Tomás V, Martín J. Flow injection determination of vitamin K3 by a photoinduced chemiluminescent reaction. Analyst 1999; 124(2):197-201.

**134-** Gil Torró I, García Mateo JV, Martínez Calatayud J. Spectrofluorimetric determination of vitamin K3 by a solid-phase zinc reactor immobilized in a flow injection. Analyst 1997; 122: 139-142.

**135-** Liu Z, Li T, Li J, Wang E. Detection of menadione sodium bisulfite (vitamin $K_3$) by reversed-phase high performance liquid chromatography with series dual-electrode amperometric detector. Anal Chim Acta, 1997; 338(1): 57-62(6).

**136-** Li B, Zhang X, Zhang C. The second chemiluminescence emission of luminol–periodate–menadione sodium bisulfite system and its analytical application. Anal Chim Acta, 2006; 575: 212-216.

**137-** Berzas Nevado JJ, Murillo Pulgarin JA, Gomez Laguna MA. Spectrofluorimetric study of the b-cyclodextrin: vitamin K3 complex and determination of vitamin K3. Talanta 2000; 53: 951-959.

**138-** Zaman Z, Fielden P, Frost PG. Simultaneous determination of Vitamins A and E and Carotenoids in Plasma by reversed-phase HPLC in elderly and younger subjects. Clin Chem 1993; 39(10): 2229-2234.

**139-** Thumham DI, Smfth E, Flora PS. Concurrent liquid-chromatographic assay of retinol, alpha-tocopherol, beta-carotene, alpha-carotene, lycopene, and beta-cryptoxanthin in plasma, with tocopherol acetate as iç standard. Clin Chem 1988; 34(2): 377-381.

**140-** Talwar D, Tom KKH, Cooney J, Brownlee C, St JO'Reilly D. A routine method for the simultaneous measurement of retinol, a-tocopherol and five carotenoids in human plasma by reverse phase HPLC. Clin Chim Acta 1998; 270: 85-100.

**141-** Karppi J, Nurmi T, Olmedilla-Alonso B, Granado-Lorencio F, Nyyssonen K. Simultaneous measurement of retinol, α-tocopherol and six carotenoids in human plasma by using an isocratic reversed-phase HPLC method. J Chromatogr B 2008; 867: 226-232.

**142-** Siluk D, Oliveira RV, Rosas MER, Ling S, Bos A, Ferrucci L, Wainer IW, A validated liquid chromatography method for the simultaneous determination of vitamins A and E in human plasma. J Pharm Biomed Anal 2007; 44: 1001-1007.

**143-** Karpinska J, Mikołu B, Motkowski R, Piotrowska-Jastrzebska J. HPLC method for simultaneous determination of retinol, α-tocopherol and coenzyme Q10 in human plasma. J Pharm Biomed Anal 2006; 42: 232-236.

**144-** Rodriguez-Delgado MA, Dıaz-Flores Estevez JF, Dıaz-Flores Estevez F, Hernandez Calzadilla C, Dıaz Romero C. Fast determination of retinol and α-tocopherol in plasma by LC. J Pharm Biomed Anal 2002; 28: 991-997.

**145-** Andreoli R, Manini P, Poli D, Bergamaschi E, Mutti A, Niessen WM. Development of a simplified method for the simultaneous determination of retinol, alpha-tocopherol, and beta-carotene in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. Anal Bioanal Chem 2004; 378(4): 987-94.

**146-** Paulo MG, Cabral Marques HM, Morais JAG, Almedia AJ. An isocratic LC method for the simultaneous determination of vitamin A, C, E and β-carotene. J Pharm Biomed Anal 1999; 21:399-406.

**147-** Barbas C, Castro M, Bonet B, Viana M, Herrea E. Simultaneus determination of vitamin A and E in rat tissue by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr A 1997; 778: 415-420.

**148-** Gimeno E, Castellote AI, Lamuela-Raventos RM, De la Torre Boranat MC, Lopez-Sabater MC. Rapid high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of retinol, α- tocopherol and β-carotene in human plasma and low-density lipoproteins. J Chromatogr B 2001; 758: 315-322.

**149-** Ruperez FJ, Mach M, Barbas C. Direct liquid chromatography method for retinol, α- and γ- tocopherols in rat plasma. J Chromatogr A 2004; 800: 225-230.

**150-** Quesada JM, Mata-Granados JM, Luque de Castro MD. Automated method fort the determination of fat-soluble vitamins in serum. J Steroid Biochem Mol Biol 2004; 89-90(1-5):473-7.

**151-** Zhao B, Tham SY, Lu J, Lai MH, Lee LKH, Moochhala SM. Simultaneous determination of vitamins C, E and β-carotene in human plasma by high-performance

liquid chromatography with photodiode-array detection. J Pharm Sci 2004; 7(2): 200-204.

**152-** Mata-Granados JM, Castro MD, Quessada JM. Fully automated method for the determination of 24,25$(OH)_2$ and 25(OH) D3 hydroxyvitamins and vitamins A and E in human serum by HPLC, J Pharm Biomed Anal 2004; 35: 575-582.

**153-** Alvarez JC, Mazancourt PD. Rapid and sensetive high-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of retinol, α-tocopherol, 25-hydroxyvitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D2 in human plasma with photodiode-array ultraviolet dedection. J Chromatogr B 2001; 755: 129-135.

**154-** Unalacak M, Atmaca H, Gürel A, Armutcu F, Demircan N, Aktunç E. Hiperglisemik glukoz metabolizma bozukluğu olan hastalarda serum malondialdehit α-tokoferol ve β-karoten düzeyleri, Fırat Tıp Dergisi 2005; 10(3): 113-116.

**155-** Lee BL, New AL, Ong CN. Simultaneous determination of tocotrienols, tocopherol, retinol and major carotenoids in human plasma. Clin Chem 2003; 49(12): 2056-2066.

**156-** Nierenberg DW, Nann SL. A method for determining concentrations of retinol, tocopherol, and five carotenoids in human plasma and tissue samples. Am J Clin Nutr 1992; 56(2): 417-26.

**157-** Bortolotti A, Lucchini G, Barzago MM, Stellari F, Bonati M. Simultaneous determination of retinol, α-tocopherol and retinyl palmitate in plasma of premature newborns by reversed-phase high-performance liquid chromatography. J Chromatogr Biomed Appl 1993; 617(2): 313-317.

**158-** Finckh B, Kontush A, Commentz J, Hübner C, Burdelski M, Kohlschütter A. Monitoring of ubiquinol-10, ubiquinone-10, carotenoids, and tocopherols in neonatal plasma microsamples using high-performance liquid chromatography coulometric electrochemical detection. Anal Biochem 1995; 232(2): 210-216.

**159-** Lane JR, Webb LW, Acuff RV. Concurrent liquid chromatographic separation and photodiode array detection of retinol, tocopherols, all-trans-α-carotene, all-trans-ß-carotene and the mono-cis isomers of ß-carotene in extracts of human plasma. J Chromatogr A 1997; 787(1-2): 111-118.

**160-** Göbel Y, Schaffer C, Koletzko B. Simultaneous determination of low plasma concentrations of retinol and tocopherols in preterm infants by a high-performance

liquid chromatographic micro method. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1997; 688(1): 57-62.

**161-** Steghens JP, van Kappel AL, Riboli E, Collombel C. Simultaneous measurement of seven carotenoids, retinol and α-tocopherol in serum by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1997; 694(1): 71-81.

**162-** Weinmann ARM, Oliveira MS, Jorge SM, Martins AR. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of retinol by fluorometry and of tocopherol by ultraviolet absorbance in the serum of newborns. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1999; 729(1): 231-236.

**163-** Sobczak A, Skop B, Kula B. Simultaneous determination of serum retinol and α- and γ-tocopherol levels in type II diabetic patients using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. J Chromatogr B 1999; 730: 265–271.

**164-** Erhardt JG, Heinrich F, Biesalski HK. Determination of retinol, antioxidant vitamins and homocysteine in skin puncture blood. Int J Vitam Nutr Res 1999; 69(5): 309-314.

**165-** Epler KS, Ziegler RG, Craft NE. Liquid chromatographic method for the determination of carotenoids, retinoids and tocopherols in human serum and in food. J Chromatogr 1993; 619(1): 37-48.

**166-** Heudi O, Trisconi MJ, Blake CJ, Simultaneous quantification of vitamins A, D3 and E in fortified infant formulae by liquid chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr A 2004; 1022: 115-123.

**167-** Sun J. Liquid chromatographic determination of carotenoids and vitamins A and E in multivitamin tablets. J AOAC Int 1999; 82: 68-72.

**168-** Scalia S, Ruberto G, Bonina F. Determination of vitamin A, vitamin E, and their esters in tablet preparations using supercritical fluid extraction and HPLC. J Pharm Sci 1995; 84: 433-436.

**169-** Sha-Er H, Yi-Er T. Chromatographic behavior of fat-soluble vitamin in reversed phase liquid chromatography with water-isopropanol phase. Spectroscopy and Spectral Analysis 2002; 22(4): 628-695.

**170-** Moreno P, Salvadó V. Determination of eight water- and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr A 2000; 870(1-2): 207-215

**171-** Wang LH, Huand SH. Determination of vitamin A, D, E and K in human plasma and bovine serum and β-carotene and vitamin A palmitat in cosmatic and pharmaceutical products by isocratic HPLC. J Chromatogr 2002; 55: 289-298.

**172-** Vliet TV, Van Schaik F, Van Schoonhoven J, Schrijver J. Determination of several retinoids, carotenoids and E vitamers by high-performance liquid chromatography Application to plasma and tissues of rats fed a diet rich in either β-carotene or canthaxanthin. J Chromatogr 1991; 553: 179-186.

**173-** Man Po ES, Ho JW, Gong BY. Simultaneous chromatographic analysis of eight fat-soluble vitamins in plasma. J. Biochem Biophys Methods 1997; 34: 99-106.

**174-** Chatzimichalakis PF, Victoria FS, Ioannis NP. Development of a validated liquid chromatography method fort he simultaneous determination of eight fat-soluble vitamins in biological fluids after solid-phase extraction. J Chromatogr B 2004; 805: 289-296.

**175-** Piccione G, Assenza A, Grasso F, Caola G. Dairly rhythm of circulating fat soluble vitamin concentration ( A, D, E and K) in the horse. J Circadian Rhythms 2004; 2(3):1-4.

**176-** Motchnik PA, Frei B, Ames BN. Measurement of antioxidants in human blood plasma. Methods Enzymol 1994; 234: 269-279.

**177-** Rizzolo A, Polesello S. Chromatographic determination of vitamins in foods. J Chromatogr A 1992; 624(1-2): 103-152.

**178-** Wielinski S, Olszanowski A. Development and validation of HPLC method for simultaneous determination of fat-soluble vitamins in capsules. J Liq Chromatogr Relat Technol 2001; 24(2): 201-213.

**179-** Huyghebaert N, De Beer J, Vervaet C, Remon JP. Compounding of vitamin A, D3, E and K3 supplements for cystic fibrosis patients: formulation and stability study. J Clin Pharm Ther 2007; 32(5): 489-496.

**180-** Capote FP, Jime´nez JR, Granados JMM, Luque de Castro MD. Identification and determination of fat-soluble vitamins and metabolites in human serum by liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry with multiple reaction monitoring. Rapid Commun Mass Spectrom 2007; 21: 1745–1754.

**181-** Skoog DA, Leary JJ. Principles of Instrumental Analysis, 4th Edition. Harcourt Brace College Publishers, New York, 1992.

**182-** Gündüz T. İnstrümental Analiz, Altıncı Baskı. Gazi Kitapevi, Ankara, 2002.

**183-** Wiberg K. Multivariate spectroscopic methods for the analysis of solutions. Department of Analytical Chemistry, Stockholm University, Sweden, 2004.

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

**185-** Sigurds S, Varian AG. Applications Of UV-Visible Derivative Spectrophotometry, UV Instruments at Work; Varian, Steinhauserstrasse, CH-6300 Zug, Switzerland UV-31, 1986.

**186-** Odabaşı S. Genel Kromatografi Bilgiler, Laboratuvar Eğitim Notları, 1997: 1-17

**187-** Analitik kimya laboratuvar föyü. Kantitatif analiz. Ankara Üniv. Eczacılık Fakültesi 1999: 80.

**188-** Kır S, Temizer A, Tamer A. Analitik kimya II laboratuvar aletli analiz deneyleri Hacettepe Üniv Eczacılık Fakültesi. Analitik Kimya A.B.D. Ankara, 1999.

**189-** Frederic Douglas. "GC/MS Analysis'' Scientific Testimony An online journal, (http://sites.netscape.net/dougfrm), 2008

**190-** 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.

**191-** Simith RM. Gas and Liquid Chromatography in Analytical Chemistry. John Wiley and Sons Ltd., New York, 1988: 37-51.

**192-** Özden T. Yöntem Validasyunu, Gazi Üniv Eczacılık Fakültesi. Farmasötik Kimya A.B.D. Ankara, 2006.

**193-** 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) .

**194-** Validation of Analytical Procedures. Proceedings of the International Conference on Harmonisation (ICH). Commision of the European Communities, 1996.

**195-** Craft NE, Brown ED, Jr Smith JC. Effects of storage and handling conditions on concentration of individual carotenoids, retinol and tocopherol in plasma. Clin Chem 1988; 34: 44-48.

**196-** Comstock GW, Norkus EP, Hoffman SC, Xu MW, Helzlsouer KJ. Stability of ascorbic acid, carotenoids, retinol, and tocopherol in plasma stored -70 degrees C for 4 years. Cancer Epidemol Biomarkers Prev 1995; 4: 505-507.

**197-** Ito Y, Ochiai J, Sasaki R, Suziki S, Kusuhara Y, Morimitsu Y, Otani M, Aoki K. Serum concentrations of carotenoids, retinol, and alpha-tocopherol in healthy persons determined by high performance liquid chromatography. Clin Chim Acta 1990; 194: 131-144.

**198-** Gross MD, Prouty CB, Jacobs JrDR. Stability of carotenoids and alpha-tocopherol during blood collection and processing procedures. Clin Chim 1995; 41: 943-944.

**199-** Driskell WJ, Lackey AD, Hewet JS, Bashor MM. Stability of vitamin A in frozen sera. Clin Chem 1985; 31: 871-872.

**200-** Stewart I. High performance liquid chromatographic determination of provitamin A in orange juice. J Assoc Off Anal Chem 1977; 60: 132-136.

**201-** Siddiqui FQ, Malik F, Fazli FR. Determination of serum retinol by reversed-phase high performance liquid chromatography. J Chromatogr B Biomed Appl 1995; 666: 342-346.

**202-** Barua AB, Kostik D, Olson JA. New, simplified procedures for the extraction and simultaneous high performance liquid chromatographic analysis af retinol, tocopherols and carotenoids in human serum. J Chromatogr 1993; 617: 257-264.

**203-** Dueker SR, Lunetta JM, Jones AD, Clifford AJ. Solid-phase extraction prptocol for isolating retinol-d4 and retinol from plasma for paralel processing for epidemiolagical studies. Clin Chem 1993; 39: 2318-2322.

**204-** Johnson EJ, Russell RM. Distribution of orally administered f3-carotene among lipoproteins in healthy men. Am Soc Clin Nutr 1992; 56:128-35.

**205-** Xu MJ, Plezia PM, Alberts DS, Emerson SS, Peng YM, Sayers SM, Liu Y, Ritenbaugh C, Gensler HL. Reduction in plasma or skin alpha-tocopherol concentration with long-term oral administration of beta-carotene in humans and mice. J Natl Cancer Inst 1992; 84: 1559-1565.

**206-** Su Q, Rowley KG, O'Dea K. Stability of individual carotenoids, retinol and tocopherols in human plasma during exposure to light and after extraction. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1999; 729(1-2): 191-198.

**"2006. 2.1/ 9 "SAĞLIK BİLİMLERİ ETİK KURUL KARARI 04.04.2006**

1-9- Enstitümüz Analatik kimya Anabilim Dalı doktora öğrencisi Fatma DEMİRKAYA'nın "A,E ve K Vitaminlerinin Farmasötik Preparatlarda İnsan ve Tavşan Plazmalarında Farklı Analitik Yöntemler ile Miktar Analizi " adlı tez konusu görüşüldü.
İlgilinin tez konusunun etik değerlere uygun olduğuna mevcudun oy birliği ile

Başkan
Prof.Dr.Recep ORBAK

Başkan Yardımcısı
ProfDr. Türkan PASİNLİOĞLU

Üye (Katılmadı)
Prof.Dr.Asuman GÜRÜKSIN

Üye
Prof.Dr.Semih DİYARBAKIRLI

Üye
Prof.Dr.Armağan ÇOLAK

Üye
Prof.Dr.Nuran YANIKOĞLU

Üye (Katılmadı)
Doç.Dr.Adnan TEZEL

Üye
Doç.Dr.Sebahat GÖZÜM

Üye
Yrd.Doç.Dr.Recep GÜRSOY
Raportör

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
**Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi**
**Etık Kurulu Başkanlığı**

**Toplantı Tarihi:** 25.05.2005
**Toplantı Sayısı:** 4

Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu 25.05.2005 tarih ve saat 15:00'de Rektörlük toplantı salonunda ATADEM Müdürü Doç. Dr. Zafer OKUMUŞ başkanlığında ve Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU, Doç. Dr. Fikret ÇELEBİ, Doç. Dr. Metin GÜNGÖRMÜŞ, Yrd. Doç. Dr. Yücel YILMAZ, Yrd. Doç. Dr. Ahmet YILDIZ, Yrd. Doç. Dr. Fehmi ODABAŞOĞLU' nun katılımı ile toplanarak aşağıdaki kararlar alınmıştır.

**KARAR NO 4:** Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya ABD Öğretim Üyesi **Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU** tarafından hazırlanan **"UV-Vis Spektrofotometrik, Spektroflorometrik, HPLC ve HPLC-MS Yöntemleri İle Tavşan Plazmalarında A, E ve K Vitamin Miktar Düzeylerinin Belirlenmesi"** başlıklı çalışmanın Etik kurallara uygun olduğunun, Etik Kurul Yönergesinin 6. maddesi madde gereğince Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU dışında, mevcudun oy birliğiyle kabulüne,