ATİPİK ANTİPSİKOTİK BİR İLAÇ OLAN OLANZAPİN'İN FARMASÖTİK PREPARATLARDA VE BİYOLOJİK ORTAMLARDA BİYOANALİTİK YÖNTEM VALİDASYONU

Mevlüt ALBAYRAK

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU

Doktora Tezi -2014

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ATİPİK ANTİPSİKOTİK BİR İLAÇ OLAN OLANZAPİN'İN FARMASÖTİK PREPARATLARDA VE BİYOLOJİK ORTAMLARDA BİYOANALİTİK YÖNTEM VALİDASYONU

Mevlüt ALBAYRAK

Analitik Kimya Anabilim Dalı
Doktora Tezi

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU

ERZURUM
2014

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

ATİPİK ANTİPSİKOTİK BİR İLAÇ OLAN OLANZAPİN'İN FARMASÖTİK PREPARATLARDA VE BİYOLOJİK ORTAMLARDA BİYOANALİTİK YÖNTEM VALİDASYONU

Mevlüt ALBAYRAK

Tez Savunma Tarihi: 05.12.2014

Tez Danışmanı	: Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU	(Atatürk Üniversitesi)
Jüri Üyesi	: Prof. Dr. Bekir SALİH	(Hacettepe Üniversitesi)
Jüri Üyesi	: Prof. Dr. Cemal GÜNDOĞDU	(Atatürk Üniversitesi)
Jüri Üyesi	: Prof. Dr. Zekai HALICI	(Atatürk Üniversitesi)
Jüri Üyesi	: Yard. Doç. Dr. Fatma D. MİLOĞLU	(Atatürk Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM

Enstitü Müdürü

Doktora Tezi
ERZURUM – 2014

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR VI
ÖZET VII
ABSTRACT VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ IX
ŞEKİLLER DİZİNİ XI
TABLOLAR DİZİNİ XIV
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Antipsikotik İlaçlar 3
2.1.1. Antipsikotik İlaçların Tanımı Ve Önemi 3
2.1.2. Antipsikotik İlaçların Sınıflandırılması 3
2.2. Tipik Antipsikotik İlaçlar 4
2.2.1. Tipik Antipsikotik İlaçların Etki Mekanizmaları ve Sınıflandırılması 5
2.3. Atipik Antipsikotik İlaçlar 5
2.3.1. Atipik Antipsikotik İlaçların Etki Mekanizmaları ve Sınıflandırılması 7
2.4. Olanzapin 8
2.4.1.Olanzapinin Kimyasal Yapısı ve Özellikler 8
2.4.2. Olanzapinin Farmakodinamik Özellikleri 9
2.4.3. Olanzapinin Farmakokinetik Özellikler 10
2.4.4. Olanzapinin Klinik Kullanım 10
2.4.4.1. Olanzapinin Şizofreni Tedavisinde Kullanımı 11
2.4.4.2. Olanzapinin Günlük Kullanım Dozu 15
2.4.4.3. Olanzapini Uygulama Yolları 16
2.4.4.4. Olanzapinin Diğer İlaçlarla Etkileşimi 17
2.4.4.5. Olanzapinin Hamilelikte Kullanımı 17
2.4.4.6. Olanzapinin Yan Etkileri 17
2.4.4.7. Olanzapin Tayinine Yönelik Yapılan Çalışmalar 18
2.5. Spektroskopik Yöntemler 38
2.5.1. Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi 39
2.5.2. Moleküler Absorpsiyon Spektroskopisi 40
2.5.3. Işının Absorplanması ve Lambert-Beer Yasası 41
2.5.4. Ultraviyole-Görünür Bölge Spektrofotometreleri 43

2.5.5. UV-Görünür Bölge Spektrofotometre Cihazının Kullanım Amaçları 44
2.5.5.1. Kalitatif Analiz 44
2.5.5.2. Kantitatif Analiz 45
2.6. Kromatografik Yöntemler 45
2.6.1. Kromatografik Yöntemlerinin Sınıflandırılması 46
2.6.2. Kromatografinin Dayandığı Temel Olaylar 47
2.6.2.1. Dağılma Kromatografisi 48
2.6.2.2. Adsorpsiyon Kromatografisi 48
2.6.2.3. İyon Değiştirme Kromatografisi 49
2.6.2.4. Boyut-Eleme Kromatografisi 49
2.7. Yüksek Performans Sıvı Kromatografi (HPLC) 50
2.7.1. Pompalar 50
2.7.2. Örnek Giriş Sistemi (Enjeksiyon Bloğu) 51
2.7.3. Kolonlar 52
2.7.4. Dedektörler 53
2.8. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisinin Uygulama Alanları 54
2.8.1. Kimyasal Ayırma 54
2.8.2. Saflaştırma 54
2.8.3. Kalitatif Analiz 54
2.8.4. Kantitatif Analiz 54
2.9. Sıvı Kromatografisi -Kütle Spektrometrisi (LC-MS) 55
2.10. Kütle Spektrometrisi (MS) 55
2.10.1. Numune Giriş Sistemi 56
2.10.2. İyon Kaynağı 56
2.10.3. Kütle Analizörü 57
2.10.4. Dedektör 58
2.10.5. Vakum Sistemleri 59
2.11. LC-MS'in Uygulama Alanları 59
2.12. Analitik Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon) 61
2.12.1. Doğruluk ve Kesinlik 61
2.12.2. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi 62
2.12.3. Duyarlılık 62
2.12.4. Stabilite 63
2.12.5. Sağlamlık 63

2.12.6. Geri Kazanım 63
2.12.7. Seçicilik-Belirleyicilik 64
3. MATERYAL VE METOT 65
3.1. Kimyasal Maddeler ve Cam Malzemeler 65
3.2. Cihazlar 65
3.3. Yöntemler 66
3.3.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri Yöntem Şartları 66
3.3.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC-UV) Yöntem Şartları 66
3.3.3. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (LC-MS) Yöntem Şartları 67
3.4. Olanzapinin Plazmadan Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon Prosesi 68
3.5. Tablet Çözeltilerinin Hazırlanması 68
4. BULGULAR 70
4.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri Yöntemi 70
4.1.1. Stok, Standart ve Kalite kontrol Çözeltilerin Hazırlanması 70
4.1.2. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon) 70
4.1.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi 70
4.1.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ) 72
4.1.2.3. Doğruluk ve Kesinlik 72
4.1.2.4. Analitik Geri Kazanım 73
4.1.2.5. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması 76
4.2. Plazma Çalışması 77
4.2.1. Plazma Çözeltilerinin Hazırlanması 77
4.2.2. Yöntem Geçerlillik Testleri (Validasyon) 78
4.2.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi 78
4.2.2.2. Gözelenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ) 79
4.2.2.3. Doğruluk ve Kesinlik 79
4.2.2.4. Geri Kazanım 80
4.3. Kromatografik Yöntemler 80
4.3.1. HPLC Yöntemi 80
4.3.1.1. Standart Çalışma ve Kalite Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması 80
4.3.1.2. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon) 81
4.3.1.3. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi 81
4.3.1.4. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ) 83
4.3.1.5. Doğruluk ve Kesinlik 83

4.3.1.6. Analitik Geri Kazanım 83
4.4. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması 88
4.5. HPLC Plazma Çalışması 89
4.5.1. Plazma Çözeltilerinin Hazırlanması 89
4.5.2. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon) 90
4.5.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi 90
4.5.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ) 91
4.5.2.3. Doğruluk ve Kesinlik 92
4.5.2.4. Geri Kazanım 93
4.5.2.5. Stabilite (Kararlılık) 93
4.6. İnterfere Etki 95
4.7. LC-MS Yöntemi 95
4.7.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması 95
4.7.2. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon) 97
4.7.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi 97
4.7.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ) 98
4.7.2.3. Doğruluk ve Kesinlik 99
4.7.2.4. Analitik Geri Kazanım 99
4.8. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması 103
4.9. LC-MS Plazma Çalışması 104
4.9.1. Plazma Çözeltilerinin Hazırlanması 104
4.9.2. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon) 105
4.9.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi 105
4.9.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ) 107
4.9.2.3. Doğruluk ve Kesinlik 107
4.9.2.4. Geri Kazanım 108
4.9.2.5. Stabilite (Kararlılık) 108
4.10. Matriks Etkisi 110
4.11. İnterfere Etki 111
4.12. Geliştirilen Yöntemin Gerçek Numunelere Uygulanması 112
5. TARTIŞMA 114
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 127
KAYNAKLAR 128
EKLER 141

EK 1. Özgeçmiş 141
EK 2. Etik Kurul Onay Formu 142

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, değerli bilgi ve katkıları ile yöneten tezimin her aşamasında fikirlerini, ilgisini ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU'na en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Doktora eğitim süresince yardımlarını, anlayışını ve desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Cemal GÜNDOĞDU'ya, analitik kimya laboratuvarında yaptığım çalışmalar esnasında yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Arş. Gör. M. Emrah YAMAN ve Arş. Gör. Onur ŞENOL'a, anlayışları ve fedakarlıklarından dolayı mesai arkadaşlarım Kim. Müh. Sayın Ufuk KUŞKUN ve Sağlık Teknikeri Sayın Esra ZEREN'e, bu çalışmayı 2013/273 BAP proje numarası ile destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne, eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi tüm imkanları sunan ve bu günlere getiren anneme, babama ve tüm aile fertlerine, çalışmalarım süresince birçok fedakarlıklar göstererek beni destekleyen ve her zaman yanımda olan eşim Sibel ŞAHİN ALBAYRAK'a ve varlığıyla mutluluk veren biricik kızım ELA'ya en derin duygularla teşekkür ederim.

Mevlüt ALBAYRAK

ÖZET

Atipik Antipsikotik Bir İlaç Olan Olanzapin'in Farmasötik Preparatlarda ve Biyolojik Ortamlarda Biyoanalitik Yöntem Validasyonu

Amaç: Atipik antipsikotik bir ilaç olan olanzapinin farmasötik preparatlarda ve plazmada miktar tayini için literatürdeki mevcut yöntemlere alternatif olarak basit, hassas ve yeni bir UV-Görünür Bölge Spektrofotometri, HPLC ve LC-MS yöntemleri geliştirilip geçerlilik testlerinin yapılması ve daha sonra şizofreni ve bipolar affektif bozukluk tanısı almış hastaların plazmalarında olanzapinin miktar tayinlerinin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminde, 272 nm dalga boyu kullanıldı. HPLC yönteminde, UV dedektör, su (%0.1 TFA)-metanol-asetonitrilden (30:40:30, h/h/h) oluşan hareketli faz, C_{18} kolon, 1 mL/dk akış hızı ve 10 µL enjeksiyon hacmi çalışma parametreleri kullanıldı. LC-MS yönteminde ise su (%0.1 formik asit)-asetonitril (20:80, h/h) hareketli fazı, C_{18} kolon, 1 mL/dk akış hızı, MS dedektör, pozitif iyonizasyon, internal standart olarak irbesartan kullanıldı. MS spektrumlarında olanzapin ve irbesartan için moleküler iyon değerleri sırasıyla 313.2 ve 429.2 olarak belirlendi.

Bulgular: UV-Görünür Bölge Spektrofotometri, HPLC ve LC-MS yöntemleri geliştirildikten sonra yöntem geçerlilik testleri yapıldı. Her üç yöntemin doğruluk (%BH) değerleri %5.0'den ve kesinlik (%BSS) değerleri %4.5'den küçük, farmasötik preparatlarda analitik geri kazanım değerlerinin ortalama %100.7, plazmadan geri kazanım değerlerinin ise ortalama %98.98 olarak tespit edildi. Plazma ve standart çözeltilerin LOQ ve LOD değerleri sırasıyla 0.7-0.33 µg/mL ve 2.0-1.0 µg/mL ve (UV-Görünür Bölge Spektrofotometri); 0.25-0.1 µg/mL ve 0.25-0.08 µg/mL (HPLC); 2.0-0.9 ng/mL ve 2.0-0.7 ng/mL (LC-MS) olarak belirlendi.

Sonuç: Geliştirilip geçerlilik testleri yapılan her üç yöntem ile beş farklı farmasötik preparatta ve plazmada olanzapin miktar tayinleri yapıldı. Şizofreni ve bipolar affektif bozukluk tanısı konulan altı hastanın plazmasında LC-MS yöntemiyle olanzapin miktar tayinleri gerçekleştirildi. Çalışma sonucunda, her üç yöntemin kalite kontrol ve klinik çalışmalarında başarıyla uygulanabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: HPLC, LC-MS, olanzapin, spektrofotometri

ABSTRACT

Bioanalytical Method Validation of Olanzapine, an atypical antipsychotic drug, in Pharmaceutical Preparations and Biological Media

Aim: It was aimed to develop and validate a simple, sensitive and novel UV-Visible Spectrophotometric, HPLC and LC-MS methods to determination of olanzapine in different pharmaceutical preparations and biological media as an alternative to present methods in the literature, and than apply this proposed methods on to the plasma samples collected from patients diagnosed with schizophrenia and bipolar affective disorder.

Material and Method: 272 nm wavelength was used in UV-Vis Spectrophotometry. In HPLC method, UV detector, water (%0.1 TFA)-methanol-acetonitrile (30:40:30, v/v/v) as mobile phase, C_{18} column, 1 mL/min flow rate and 10 µL injection volume parameters were selected. In LC-MS method, water (%0.1 formic acid)-acetonitrile (20:80, v/v) as mobile phase, C_{18} column, 1 mL/min flow rate, MS detector, positive ionization and irbesartan (IS) parameters were prefered. Molecular ion for olanzapine and irbesartan were 313.2 and 429.2, respectively.

Results: UV-Vis Spectrophotometry, HPLC and LC-MS methods were developed and method validation tests were performed. For all of them, accuracy (%RE) were lower than %5.0, precision (%RSD) were lower than %4.5, mean analytical recovery for pharmaceutical preparation was %100.7 and mean recovery of plasma samples were %98.98. LOQ and LOD values of plasma and standard solutions were 0.7-0.33 µg/mL and 2.0-1.0 µg/mL (UV-Vis Spectrophotometry; 0.25-0.1 µg/mL and 0.25-0.08 µg/mL (HPLC); 2.0-0.9 ng/mL and 2.0-0.7 ng/mL (LC-MS), respectively.

Conclusion: Determination of olanzapine were performed by developed and validated methods in five different pharmaceutical preparations and plasma samples. Quantitative analysis were achieved in six patients by LC-MS method. These proposed methods can be succesfully applied in control and clinic studies.

Key Words: HPLC, LC-MS, olanzapine, spectrophotometry

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A : Absorbans
AUC : Eğri Altında Kalan Alan
BH : Bağıl Hata
BOS : Beyin Omurilik Sıvısı
BPRS : Kısa Psikiyatrik Değerlendirme Ölçeği
BSS : Bağıl Standart Sapma
CGI-S : Klinik Genel İzlenim-Şiddet Ölçeği
CI : Kimyasal İyonizasyon
C_{max} : Maksimum Plazma Derişimi
cm : Santimetre
ÇA : Çalışma Aralığı
DAD : Diyod Array Dedektör
dk : Dakika
λ : Dalga Boyu
DSM : Mental Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı
D2 : Dopamin Reseptörü Tip 2
ED : Elektrokimyasal Dedektör
EPS : Ekstrapiramidal Sendrom
ESI : Elektro Sprey İyonizasyon
eV : Elektro Volt
FDA : Gıda ve İlaç İdaresi
g : Gram
GC : Gaz Kromatografisi
GC-MS : Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi
GC-MS/MS : Gaz Kromatografisi-Ardışık Kütle Spektrometrisi
GK : Geri Kazanım
h : Hacim
HPLC : Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
HPTLC : Yüksek Performans İnce Tabaka Kromatografisi
HPLC-MS : Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi
ICH : Uluslararası Harmonizasyon Konferansı
IM : İntramüsküler
IR : İnfrared
IS : İnternal Standart
L : Litre
LC : Sıvı Kromatografisi
LC-MS : Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi
LC-MS/MS : Sıvı Kromatografisi-Ardışık Kütle Spektrometrisi
LOD : Gözlenebilme Sınırı

LOQ : Miktar Tayin Alt Sınırı
LR : Lineer Regresyon
µa : Mikroamper
µg : Mikrogram
µl : Mikrolitre
mg : Miligram
ml : Mililitre
mm : Milimetre
mM : Milimolar
mmol : Milimol
M : Molarite
ng : Nanogram
nm : Nanometre
NMR : Nükleer Manyetik Rezonans
PANSS : Pozitif ve Negatif Sendrom Ölçeği
R : Korelasyon Katsayısı
rpm : Dakikadaki Devir Sayısı
°C : Santigrat Derece
S_a : Regrasyon eğrisindeki kaymanın standart sapması
SANS : Negatif Belirtileri Değerlendirme Ölçeği
S_b : Regrasyon eğrisindeki eğimin standart sapması
SS : Standart Sapma
S/G : Sinyal/Gürültü Oranı
T : Geçirgenlik
TFA : Trifloro Asetik Asit
$t_{1/2}$:Yarılanma Ömrü
T_{max} : Doruk Plazma Derişiminine Ulaştığı Süre
TLC : İnce Tabaka Kromatografisi
UV : Ultra Viyole
V : Volt

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No **Sayfa No**

Şekil 2.1. Olanzapinin kimyasal yapısı 9
Şekil 2.2. İrbesartanın kimyasal yapısı 9
Şekil 2.3. Elektromanyetik ışınların sistematik olarak tanımlanması 39
Şekil 2.4. Bir molekül için elektronik, titreşim ve dönme enerji seviyelerini gösteren enerji diyagramı 40
Şekil 2.5. Absorblayan bir çözeltiye giren P_o şiddetindeki ışın demetinin P şiddetine düşmüş olarak çıkması 42
Şekil 2.6. Spektrofotometre cihazının basit bir şematik gösterimi 43
Şekil 2.7. Kromatografinin hareketli ve sabit faza göre sınıflandırılması 47
Şekil 2.8. Tek bileşenli bir bileşik için tipik bir kromatogram 47
Şekil 2.9. HPLC cihazının şematik gösterimi 50
Şekil 2.10. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi cihazının şematik gösterimi . 61
Şekil 4.1. 1, 2, 5, 8, 10, 20, 25 ve 30 µg/mL derişimdeki standart olanzapin çözeltilerinin UV-Görünür Bölge Spektrofotometri absorbsiyon spektrumları 70
Şekil 4.2. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminde standart çözeltilerin kalibrasyon eğrisi 71
Şekil 4.3. Olaxinn tablet çözeltisinin (2+13 µg/mL) UV spektrumu 74
Şekil 4.4. Ollafax tablet çözeltisinin (2+13 µg/mL) UV spektrumu 75
Şekil 4.5. Ozaprin tablet çözeltisinin (2+13 µg/mL) UV spektrumu 75
Şekil 4.6. Rexapin tablet çözeltisinin (2+13 µg/mL) UV spektrumu 76
Şekil 4.7. Zyprexa tablet çözeltisinin (2+13 µg/mL) UV spektrumu 76
Şekil 4.8. 2, 5, 8, 10, 20, 25 ve 30 µg/mL derişimdeki olanzapin plazma çözeltilerinin UV spektrumları 78
Şekil 4.9. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminde plazma çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi 78
Şekil 4.10. 5 µg/mL derişimde IS içeren 0.25, 0.5, 2.5, 5, 15, 20, 30 ve 40 µg/mL derişimlerdeki olanzapin standart çalışma çözeltilerinin HPLC kromatogramları 81

Şekil 4.11. HPLC yöntemi ile elde edilen olanzapin standart çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi 82
Şekil 4.12. 5 µg/mL IS içeren rexapin tabletin 5+1, 5+10 ve 5+25 µg/mL (ilaç+standart olanzapin çözeltisi) derişimdeki çözeltilerin HPLC kromatogramı 85
Şekil 4.13. 5 µg/mL IS içeren olaxinn tabletin 5+1, 5+10 ve 5+25 µg/mL (ilaç+standart olanzapin çözeltisi) derişimindeki çözeltilerin HPLC kromatogramı 86
Şekil 4.14. 5 µg/mL IS içeren ozaprin tabletin 5+1, 5+10 ve 5+25 µg/mL (ilaç+standart olanzapin çözeltisi) derişimindeki çözeltilerin HPLC kromatogramı 86
Şekil 4.15. 5 µg/mL IS içeren ollafax tabletin 5+1, 5+10 ve 5+25 µg/mL (ilaç+standart olanzapin çözeltisi) derişimindeki çözeltilerin HPLC kromatogramı 87
Şekil 4.16. 5 µg/mL IS içeren zyprexa tabletin 5+1, 5+10 ve 5+25 µg/mL (ilaç+standart olanzapin çözeltisi) derişimindeki çözeltilerin HPLC kromatogramı 87
Şekil 4.17. 5 µg/mL IS ve 5 µg/mL derişimde olanzapin içeren rexapin, olaxinn, ollafax, ozaprin, zyprexa tablet çözeltilerinin HPLC kromatogramları .. 88
Şekil 4.18. 5 µg/mL derişimde IS içeren 0.25, 0.5, 2.5, 5, 15, 20, 30 ve 40 µg/mL derişimdeki olanzapinin plazma çözeltilerinin HPLC kromatogramları 90
Şekil 4.19. Boş plazmanın HPLC kromatogramı 90
Şekil 4.20. Olanzapin plazma çözeltilerinin HPLC yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisi 91
Şekil 4.21. LC-MS sisteminde, 50 ng/mL derişiminde IS içeren 2, 10, 25, 75, 100, 150, 250 ve 300 ng/mL derişimlerdeki olanzapin çözeltilerinin kromatogramları 96
Şekil 4.22. Olanzapine ait MS spektrumu 96
Şekil 4.23. İrbesartana ait MS spektrumu 97
Şekil 4.24. Olanzapin standart çalışma çözeltilerinin LC-MS yöntemiyle elde edilen kalibrasyon eğrisi 98
Şekil 4.25. 50 ng/mL IS içeren üç farklı derişimdeki (25+5, 25+50 ve 25+200 ng/mL) olaxinn tablet çözeltilerinin LC-MS kromatogramları 101

Şekil 4.26. 50 ng/mL IS içeren üç farklı derişimdeki (25+5, 25+50 ve 25+200 ng/mL) ollafax tablet çözeltilerinin LC-MS kromatogramları 101
Şekil 4.27. 50 ng/mL IS içeren üç farklı derişimdeki (25+5, 25+50 ve 25+200 ng/mL) ozaprin tablet çözeltilerinin LC-MS kromatogramları 102
Şekil 4.28. 50 ng/mL IS içeren üç farklı derişimdeki (25+5, 25+50 ve 25+200 ng/mL) rexapin tablet çözeltilerinin LC-MS kromatogramları 102
Şekil 4.29. 50 ng/mL IS içeren üç farklı derişimdeki (25+5, 25+50 ve 25+200 ng/mL) zyprexa tablet çözeltilerinin LC-MS kromatogramları 103
Şekil 4.30. 50 ng/mL IS ve 25 ng/mL olanzapin içeren rexapin, olaxinn, ollafax, ozaprin ve zyprexa tablet çözeltilerinin LC-MS kromatogramları 103
Şekil 4.31. 50 ng/mL derişimde IS içeren 2, 10, 25, 75, 100, 150, 250 ve 300 ng/mL derişimlerdeki olanzapin plazma çözeltilerinin LC-MS kromatogramları 105
Şekil 4.32. Boş insan plazmasına ait kromatogram 105
Şekil 4.33. Plazma çalışmasında, LC-MS yöntemiyle elde edilen plazma çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi 106
Şekil 4.34. Hasta kanlarındaki olanzapin derişimleri 113
Şekil 4.35. LC-MS yöntemi ile ölçülen L.D. isimli hastanın 2. gününde alınan 4. kan örneğinin LC-MS kromatogramı 113

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No **Sayfa No**

Tablo 2.1. Ayırabildikleri maksimum madde miktarına göre kolonlar 52

Tablo 3.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yöntem şartları 66

Tablo 3.2. HPLC yöntem şartları 67

Tablo 3.3. LC-MS yöntem şartları 67

Tablo 4.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz sonuçları 71

Tablo 4.2. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminin doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)..... 72

Tablo 4.3. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminin analitik geri kazanım değerleri..... 74

Tablo 4.4. Olanzapin içeren rexapin, olaxinn, ozaprin, ollafax ve zyprexa tabletlerinin miktar analizi (n=6) 77

Tablo 4.5. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yöntemi, plazma çözeltilerinin kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz sonuçları 79

Tablo 4.6. Plazma çalışmasında UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminin doğruluk, kesinlik ve geri kazanım değerleri (n=6) 80

Tablo 4.7. HPLC yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz sonuçları 82

Tablo 4.8. HPLC yönteminin doğruluk ve kesinlik değerleri 83

Tablo 4.9. HPLC yönteminin farmasötik preparatlarda analitik geri kazanım değerleri..... 85

Tablo 4.10. Tablet başına 10 mg olanzapin içeren rexapin, olaxinn, ozaprin, ollafax ve zyprexa tablet çözeltilerinin HPLC yöntemi ile miktar tayini (n=6).. 89

Tablo 4.11. Plazma çalışmasında, HPLC yönteminde kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz sonuçları..... 91

Tablo 4.12. Plazma çalışmasında, HPLC yönteminin doğruluk ve kesinlik değerleri92

Tablo 4.13. HPLC yönteminin plazmadan geri kazanım değerleri..... 93

Tablo 4.14. Olanzapinin plazma içerisindeki stabilitesi 94

Tablo 4.15. LC-MS yönteminin kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz

sonuçları 98
Tablo 4.16. LC-MS yönteminin doğruluk ve kesinlik değerleri 99
Tablo 4.17. LC-MS yönteminin farmasötik preparatlarda analitik geri kazanım değerleri 100
Tablo 4.18. LC-MS yöntemi ile tablet başına 10 mg olanzapin içeren rexapin, olaxinn, ozaprin, ollafax ve zyprexa tabletlerinin miktar analizi (n=3). 104
Tablo 4.19. Plazma çalışmasında**,** LC-MS yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz sonuçları 106
Tablo 4.20. Plazma çalışmasında LC-MS yönteminin doğruluk ve kesinlik değerleri (n=3) 107
Tablo 4.21. LC-MS yönteminin plazmadan geri kazanım değerleri 108
Tablo 4.22. Olanzapinin LC-MS yöntemi ile belirlenen stabilite değerleri 110
Tablo 4.23. LC-MS yöntemi ile matriks etkisi 111
Tablo 4.24. Şizofreni ve bipolar affektif bozukluk tanısı alan hastaların özellikleri ile bu hastaların kan örneklerindeki olanzapin derişimleri 112

1. GİRİŞ

Fizyolojik sistemleri veya patolojik durumları insan yararı için değiştirmek amacıyla kullanılan kimyasal maddelere ilaç denir. Daha kısa bir tanımla ilaç, hastalıkların önlenmesi, tanısı ve tedavisi için kullanılan kimyasal maddelerdir.[1] Belirli ruhsal hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçlara antipsikotik ilaçlar denir ve iki sınıfta incelenirler. 1950 'li yıllarda klorpromazinin keşfiyle başlayan antipsikotik ilaçlara eski nesil veya tipik antipsikotikler, 1960 yılında klozapinin keşfiyle başlayan antipiskotik ilaçlara ise yeni nesil veya atipik antipsikotik ilaçlar denilmiştir. Atipik antipsikotik bir ilaç olan olanzapin; başta şizofreni olmak üzere şizoaffektif bozukluğun akut alevlenmesinde ve sürdürüm sağaltımında, bipolar bozukluğun manik atağında, akut sürdürüm sağaltımında ve demansta görülen psikotik belirtilerde, Tourette sendromunda ve seçici seratonin geri alım inhibitörleri ile birlikte travma sonrası stres bozukluğunda, otizmde ve anoreksiya nevroza hastalarında kilo artışı sağlamada etkili bir ilaçtır.[2] Kaba formülü $C_{17}H_{20}N_4S$ olan olanzapinin kimyasal adı 2-metil-4-(4-metil-1-piperazinil)-10H-tieno(2.3-b)(1.5) benzodiazepin olup molekül ağırlığı 312.4 g/mol dür.[3] Olanzapinin piyasada tablet ve son zamanlarda çıkan enjeksiyon formu bulunmaktadır. Ağızdan alımını takiben iyi emilir ancak alınan dozun yaklaşık %40'ı sistemik dolaşıma ulaşmadan önce metabolize edilir. Ağızdan alımdan yaklaşık 6 saat sonra en yüksek plazma derişiminine ulaşır ve yarılanma ömrü 20 ile 54 saat arasında değişir.[4] Olanzapinin başlıca metabolitleri 10'N-glukoronit, 4'N-glukoronit, 4'N-desmetilolanzapin ve olanzapin-N-oksit olup hepside inaktiftir.[5] Psikiyatrik hastalıklarda kullanılan olanzapinin günlük dozu 10 ile 30 mg arasında olup yarılanma süresinin uzun olmasından dolayı günlük tek doz verilmesi etkili olmaktadır.[2] Şizofreninin hem pozitif hemde negatif belirtilerinin üzerine etkili olması ve ekstrapiramidal sistem yan etkisinin düşük olması nedenlerinden dolayı şizofreni ve

diğer psikozların tedavisinde önem kazanmaktadır.[6] Olanzapinin tedavisinde kullanıldığı şizofreni; kişinin alışılagelmiş algılama ve yorumlama biçimlerine yabancılaşarak, kendine özgü bir içe-kapanım dünyasına çekildiği bir ruhsal bozukluktur. Çok geniş bir yelpaze içerisinde yer alan ruhsal belirtileri içermesi nedeniyle, psikiyatrinin en ilgi çekici konularından biri olarak önemini korumaktadır.[2]

Çalışmamızda psikiyatride büyük bir öneme sahip şizofreninin tedavisinde kullanılan atipik antipsikotik bir ilaç olan olanzapinin farklı farmasötik preparatlardan ve plazmadan miktar tayini için literatürdeki mevcut yöntemlere alternatif olarak basit, hassas ve yeni bir UV-Görünür Bölge Spektrofotometre, HPLC ve LC-MS yöntemleri geliştirilip geçerlilik testlerinin yapılması ve daha sonra şizofreni tanısı almış hastaların plazmalarından olanzapinin miktar tayinlerinin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Antipsikotik İlaçlar

2.1.1. Antipsikotik İlaçların Tanımı ve Önemi

Psikiyatri; ruhsal kaynaklı sorunlarımızla başetmede tıbbi bir kurum ve bilim disiplinidir.[2] Psikiyatride büyük bir öneme sahip olan antipsikotikler başta şizofreni olmak üzere psikozların tedavisinde kullanılan ilaçlardır. Psikoz, düşünme yetisini, duygusal yanıtları, anımsama, işletişim kurma, gerçeği değerlendirme, yorumlama ve uygun davranmayı önemli ölçüde bozan, normal yaşamın gereklerini yerine getirmeyi engelleyen klinik durumları tanımlar. Aktif dönemde psikotik olgular, evde, okulda ve işte kendilerinden beklenen sorumlulukları yerine getiremezler, verimlilikleri azalır.[1] Psikotik hastalıklar, şizofreni, bipolar (manik-depresif) hastalığın manik fazı, akut idiopatik psikotik hastalıklar ve şiddetli ajitasyon ile giden diğer durumlardır. Antipsikotik ilaçların özellikle etkin oldukları hedef semptomlar ajitasyon, saldırganlık, düşmanlık, varsanılar, akut sanrılar, uykusuzluk, anoreksi, öz bakımın kötü olması, negativizm, bazen geri çekilme ve yanlızlığı içermektedir.[4] 1950'li yıllarda klorpromazinin keşfedilmesiyle ortaya çıkan antipsikotik ilaçlar psikotik hastalıkların tedavisinde devrim yaratmıştır.

2.1.2. Antipsikotik İlaçların Sınıflandırılması

Antipsikotik ilaçlara aynı zamanda nöroleptik ilaçlarda denilir. Nöroleptik sözcüğü, neuron ve lepsis kelimelerinin birleşiminden türemiş[6] ve nörolojik yan etkilere neden olduklarından dolayı nöroleptik sözcüğü kullanılmıştır.[1] Fakat 1990'lı yılların son yarısından itibaren giderek daha fazla kullanılmaya başlanmasıyla, bu ilaçları kullanan hastalarda nöroleptiklere özgü belirtiler gözlenmeyince nöroleptik terimi terk edilerek, yerine antipsikotik terimi kullanılmıştır.[6] 1950'li yıllarda klorpromazinin keşfiyle başlayan antipsikotik ilaçlara eski nesil, konvansiyonel, birinci kuşak veya tipik

antipsikotikler, 1960 yılında klozapinin keşfiyle başlayan antipsikotik ilaçlara ise yeni nesil, ikinci kuşak veya atipik antipsikotik ilaçlar denilmiştir.

2.2. Tipik Antipsikotik İlaçlar

Tipik antipsikotik ilaçların ilki 1950 yılında bir antihistaminik olarak sentezlenen klorpromazindir. İlk kez bir antipsikotik olarak 1952 yılında Delay ve Deniker tarafından kullanılmıştır. Klorpromazinin olumlu etkilerinin görülmesi üzerine klinik kullanımının hızla artması araştırmacıların akıl hastalıklarına bakış açısını değiştirmiş ve yeni araştırmaları hızlandırmıştır.[1] Jassen'in 1959 yılında haloperidolü bulmasıyla yeni bir aşamaya gelinmiş ve ardından birçok antipsikotik ilaç sentezlenmiştir.[7] Tipik antipsikotik ilaçlar pek çok psikiyatrik bozukluğun tedavisinde (sağaltımında) kullanılırlar. Bu psikiyatrik bozukluklar; şizofreni ve şizoaffektif bozukluğun akut psikotik atağında ve sürdürüm tedavisinde, şizofreniform bozuklukta, kısa psikotik bozuklukta, manik atak tedavisinde, psikotik özellikli majör depresyonda, sanrılı bozuklukta, Borderline kişilik bozukluğunda, madde kullanımına bağlı psikotik bozuklukta, deliryum ve demans tedavisinde, dürtü denetimi bozukluğunda, tik bozukluğu ve Tourette sendromu olarak sıralanırlar.[2] Tipik antipsikotik ilaçların bir kaç dezavantajı vardır. Bunlardan en önemlisi ekstrapiramidal sendrom (EPS) dur. EPS; özellikle tipik antipsikotik ilaçların neden olduğu kaslarda kasılmalar (distoniler), titreme, sallanma, hareketlerde yavaşlamalar (parkinsonizm), yerinde duramama (akatizi) gibi motor bozukluklara genel olarak verilen isimdir. Özellikle bu yan etkisinden dolayı tipik antipsikotik ilaçlar atipik antipsikotik ilaçlara kıyasla daha az tercih edilirler. Diğer dezavantajı ise negatif ve affektif belirtilerin kontrol altına alınmasında yalnızca sınırlı bir etkinliğe sahip olması ve uygulandığı hastaların yaklaşık %30'unun tedaviye cevap vermemesi ya da kısmi bir cevap vermesidir.[6]

2.2.1. Tipik Antipsikotik İlaçların Etki Mekanizmaları ve Sınıflandırılması

Tipik antipsikotik ilaçlar dopamin reseptörü Tip 2 (D2) antagonizmleri ile ilgili olduğu düşünüldüğünden dolayı bu grup ilaçlara dopamin reseptör antagonistleride denmektedir. Tipik antipsikotik ilaçların terapötik etkileri D2 reseptör blokajı yapıcı özelliklerine bağlı olarak ortaya çıkar.[2] D2 reseptörlerini limbik sistemde A10 nöronlarını bloke etmeleri prolaktin salgısını arttırmakta ve striatumda A9 nöronlarını bloke etmeleri ise EPS ye yol açmaktadır.[6] Tipik antipsikotiklerin bir diğer etkiside muskarinik kolinerjik reseptörleri bloke etmeleridir. Bu etki mekanizması sonucu bazı yan etkiler çıkabilmektedir. Bunlar arasında ağız kuruması, görme bulanıklığı, kabızlık, idrar retansiyonu ve bilişşel küntleşme sayılabilir.[2]

Tipik antipsikotik ilaçlar yapılarına göre 6 grupta sınıflandırılırlar.[1,2]

1-Fenotiyazinler: Klorpromazin, promazin, trifluopromazin, tioridazin, mezoridazin, piperasetazin, flufenazin, trifluoperazin, asetofenazin, perfenazin, proklorperazin.

2-Tiyoksantenler: Klorprotiksen, zuklopentiksol, flupentiksol, tiyotiksen.

3-Butirofenonlar: Haloperidol.

4-Dibenzoksapinler: Loksapin.

5-Dihidroindolonlar: Molindon.

6-Difenilbutilpiperidinler: Pimozid, penfluridol.

2.3. Atipik Antipsikotik İlaçlar

1960'da klozapinin tedaviye girmesinden sonra atipik antipsikotik kavramı gelişmeye başlamıştır. Ancak 1974'de Finlandiya da klozapinin en korkulan yan etkisi olan agranülositoz (kandaki akyuvar sayısının azalması) sonucu 8 hastanın ölmesi, bir anda bu ilaçları ikinci plana itmiş ve bir süre daha tipik antipsikotikler tahtlarını korumuşlardır. Tedaviye dirençli olgularda yaşanan çaresizliğe, tipik antipsikotik

ilaçların oluşturduğu çok sayıda yan etki eklendiğinde seksenli yılların ortasından itibaren klozapin tekrar kullanılmaya başlanmıştır. Yeni antipsikotikler üzerinde yine seksenli yılların ortasından itibaren araştırmalar yapılmaya ve doksanlı yıllarda da klinik ortamda giderek daha fazla kullanılmaya başlanmış ve bu ilaçları kullanan hastalarda nöroleptiklere özgü belirtiler gözlenmediğinden nöroleptik terimi yavaş yavaş terk edilerek yerini antipsikotik terimi almaya başlamıştır.[2] Klasik antipsikotik ilaçlarla sağaltılan hastaların bir bölümünde belirtiler tamamen ortadan kalkmaz ya da psikotik tabloda belirgin bir düzelme sağlanmaz. Bu ilaçlar öncelikle pozitif psikotik belirtileri baskılamakta ancak, negatif belirtileri iyileştirmede yetersiz kalabilmektedirler. Hastaların yaşam kalitelerini ya da sağaltıma uyumlarını olumsuz etkileyen EPS'ye yol açmaları ve ilaç kullanımına karşın mesleki ve sosyal işlevsellikteki bozulmanın sürmesi de kullanımlarını sınırlandırmaktadır. Bu nedenlerden dolayı yeni ilaçlar geliştirilirken artmış antipsikotik etkinlik, düşük EPS sıklığı, geç (tardif) diskinezi (değişik kas gruplarında görülen istemsiz kompleks hareketler) riskinin düşük olması, negatif belirtilere yönelik etki, işlevsellik ve yaşam kalitesinde artma hedeflenmektedir. Çalışmalar atipik antipsikotiklerin klasik antipsikotikler ile karşılaştırıldığında yan etkilerinin daha düşük olduğunu ve hastalarda yaşam kalitesinin daha yüksek olduğunu göstermektedir.[8]

Atipik antipsikotik ilaçlar aşağıda belirtilen özellikleri gösterirler[1];

1- Tipik antipsikotik ilaçlar kadar etkilidirler.
2- Hayvan deneylerinde apomorfin gibi dopamin agonistlerince oluşturulan stereotipiyi bloke ederler.
3- Katalepsi (iradenin yitirilmesi durumu) oluşturmazlar.
4- Prolaktin salgısını arttırmazlar. Bu özellik ilaçlar arasında farlılık gösterir.
5- Mezolimbik seçicilik gösterirler.

6- D2 reseptörlerinde sayı ve duyarlılık artışına neden olmazlar. Geç diskinezi yapmazlar veya bu etki minimal düzeydedir.

7- Süregen tedavide dopamin dönüşümünde artma ve dopamin A9 nöronlarındaki depolarizasyon bloku etkisine karşı tolerans gelişmez.

8- Ekstrapiramidal belirti yapmaz veya bu tür yan etkileri çok azdır. Bu özellikleri büyük ölçüde 2a antagonizmine bağlıdır.

Atipik antipsikotik ilaçlar, şizofrenide pozitif ve negatif semptomların ilk seçenek tedavisinde, relapsların tedavisinde, tipik antipsikotik ilaçlarla yan etki görülen hastaların yeniden stabilizasyonunda, relapsların önlenmesi için uzun dönem idame tedavisinde tercih edilir.[7]

2.3.1. Atipik Antipsikotik İlaçların Etki Mekanizmaları ve Sınıflandırılması

Tipik antipsikotik ilaçlar yani birinci kuşak antipsikotik ilaçlar beyinde stratial A9 nöronların ve limbik A10 nöronların her ikisini de bloke etmekteyken, atipik antipsikotik ilaçların yani ikinci kuşak antipsikotik ilaçların çoğunun ortak özelliği ise seçici olarak sadece limbik bölgelerdeki A10 nöronlarındaki D2'yi bloke etmeleridir. Ayrıca bu ilaçlar serotonin (5-hidroksitriptamin veya 5-HT) 2A reseptörlerini de bloke etmektedirler, bu yüzden bu ilaçlara serotonin-dopamin antagonistleri olarakta adlandırılmıştır.[2] Atipik antipsikotiklerin terapötik etki ile reseptör etkisi ilişkileri şu şekilde açıklanabilir; mezolimbik yolakta D2 reseptör blokajı ile pozitif semptomları azaltırlar, mezokardial yolakta dopamin salınımının artışı ve 5HT-2A reseptör blokajı ile negatif semptomları azaltırlar. Diğer reseptörlere bağlanma özellikleri, şizofrenideki kognitif, agresif ve depresif semptomları tedavi etmedeki etkinliklerine katkıda bulunuyor olabilir. Atipik antipsikotik ilaçların yan etkilerinin az olması ise şöyle açıklanabilir; nigrostriatal yolaktaki 5HT-2A antagonizması EPS'yi ve geç diskineziyi

azaltır. Tubuloinfundibuler yolaktaki 5HT-2A antagonizması hiperprolaktinemiyi (prolaktin salgısındaki yükselme) azaltır.[7]

Atipik antipsikotik ilaçlar kimyasal yapı olarak çok sayıda reseptörlerle etkileşime girenler; klozapine benzeyen ilaçlar (olanzapin, zetopin, ketiapin) ile kimyasal yapı olarak 5HT2 reseptörleri için baskın bir seçiciliğe sahip olanlar; klozapine benzemeyen ilaçlar (risperidon, ziprasidon, sertindol, amisulpirid vb.) olarak iki sınıfa ayrılabilmektedirler.[2,6] Atipik antipsikotik ilaçları; klozapin, sülpirid, amisülpirid, olanzapin, melperon, risperidon, ketiyapin, ziprasidon, zotepin, loksapin, remoksiprid, ritanserin, rakloprid, sertindol, amperozid, savoksepin[1] ve aripiprazol[2] olarak sıralayabiliriz.

2.4. Olanzapin

2.4.1. Olanzapinin Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

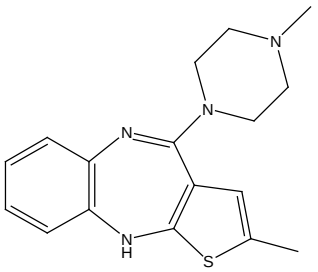
*Kaba formülü $C_{17}H_{20}N_4S$ şeklindedir.

*Molekül ağırlığı 312.4 g/mol, diğer bir adı ise 2-metil-4-(4-metil-1-piperazinil)-10H-tieno(2.3-b)(1.5) benzodiazepin'dir.

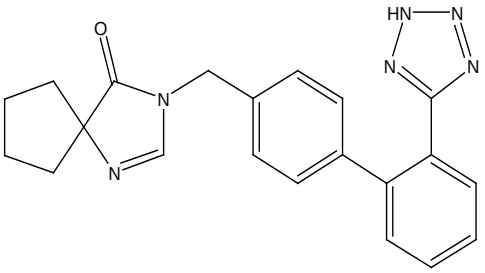
*Suda çözünmez, metanol ve etanol de çözünür.

*Erime noktası 195 ºC dir.[3]

Serotonin-dopamin antagonisti olan olanzapinin ve çalışmada internal standart olarak kullanılan irbesartanın kimyasal yapısı sırası ile Şekil 2.1'de ve Şekil 2.2'de verildi.



Şekil 2.1. Olanzapinin kimyasal yapısı



Şekil 2.2. İrbesartanın kimyasal yapısı

2.4.2. Olanzapinin Farmakodinamik Özellikleri

Olanzapin; dopamin (D_1, D_2, D_3, D_4), serotonin (5HT-2A, 5HT-2C, 5HT3, 5HT6), muskarinik (M1, M5), histamin H1 ve alfa-1-adrenerjik (α1) reseptörlere bağlanma ilgisi olan bir antipsikotiktir. Hem serotonin (5HT-2A) hemde dopamin (D2) reseptörlerine güçlü bağlanmakla beraber, 5HT-2A reseptörüne yaklaşık 3 kat daha fazla bağlanır. Pozitron emisyon tomografi çalışmasında tek doz oral 10 mg olanzapin verilen sağlıklı gönüllülerde, olanzapinin dopamin D2 reseptörüne göre yüksek 5HT-2A reseptör tutulumu oluşturduğu gösterilmiştir.[6] 5HT-2A reseptörlerini 5 mg/gün dozunda bile doygunluk düzeyinde bloke eder. Olanzapinin D2 reseptörlerine göre D4 reseptörlerine daha fazla afinitesi vardır. D2 bağlanması dozla artar. 5 mg/gün dozlarında %43-80 iken 30-40 mg/gün dozunda bu oran %83-88'dir.[1]

2.4.3. Olanzapinin Farmakokinetik Özellikleri

Olanzapinin oral emilimi oldukça iyidir. Biyoyararlanımı %80 ile %100 arasındadır. Emilimi besinlerden etkilenmez.[7] Ağızdan alınan olanzapinin %85'i gastroentestinal sistemden emilir. Başta albumin olmak üzere plazma proteinlerine %93 oranında bağlanır. Olanzapinin plazma seviyesi günlük oral alımla doğrusal bir şekilde artmaktadır. Doruk plazma seviyesine 6 saat içinde ulaşır. Yarılanma ömrü ortalama 31 saat olan olanzapin büyük oranda ilk geçiş metabolizmasına maruz kalır ve sistemik dolaşıma girmeden önce dozun yaklaşık %40'ı metabolize edilir. Olanzapinin metabolize olmasındaki en önemli yol 10-N-glukronidasyondur.[6] İdrar ve dışkı ile atılan olanzapinin başlıca metabolitleri 10-N-glukoronit, 4-N-glukoronit, 4-N-desmetil olanzapin ve olanzapin-N-oksit olup hepside inaktiftir.[5]

2.4.4. Olanzapinin Klinik Kullanımı

1982 yılında bir klozapin türevi olarak üretilen olanzapin, Amerika Birleşik Devletleri'nde onaylanan üçüncü atipik antipsikotik ilaçtır. Lilly İlaç tarafından Ekim 1996'da Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) Gıda ve İlaç İdaresi'nden (FDA-Food and Drug Administration) psikotik bozuklukların tedavisinde kullanılmak üzere onay almıştır. Ülkemizde Eylül 1998 başlarında Zyprexa adlı isimle Lilly İlaç tarafından pazarlanmaya başlanmıştır.[6] Bugün piyasada olanzapin etken maddesi içeren Zyprexa dışında birçok ilaç (Ollafax, Rexapin, Olaxinn, Ozaprin vb.) vardır. Olanzapin; başta şizofreni olmak üzere şizoaffektif bozukluğun akut alevlenmesinde, sürdürüm sağaltımında, bipolar bozukluğun manik atağında, akut sürdürüm sağaltımında, demansta görülen psikotik belirtilerde, Tourette sendromunda ve seçici seratonin geri alım inhibitörleri ile birlikte travma sonrası stres bozukluğunda, otizmde ve anoreksiya nevroza hastalarında kilo artışı sağlamada etkili olduğu belirtilen atipik antipiskotik bir ilaçtır.[2]

2.4.4.1. Olanzapinin Şizofreni Tedavisinde Kullanımı

Yunanca ayrık veya bölünmüş anlamına gelen "şizo" ve "akıl" anlamına gelen "frenos" sözcüklerinin birleşiminden meydana gelen şizofreni; düşünüş, duyuş ve davranışlarda önemli bozuklukların görüldüğü, hastanın kişiler arası ilişkilerden ve gerçeklerden uzaklaşarak kendi dünyasında yaşadığı, genellikle gençlik çağında başlayan bir ruhsal hastalıktır.[1] Başka bir tanımla şizofreni; kişinin alışılagelmiş algılama ve yorumlama biçimlerine yabancılaşarak, kendine özgü bir içe-kapanım dünyasına çekildiği bir ruhsal bozukluktur. İnsanı, çevresiyle önemli uyumsuzluk ve çatışmalar yaşamasına yol açan bu bozukluk, çok geniş bir yelpaze içerisinde yer alan ruhsal belirtileri içermesi nedeniyle psikiyatrinin en ilgi çekici konularından biri olarak önemini korumaktadır[2]. Şizofreni her toplum ve coğrafi bölgede görülen bir ruhsal bozukluktur. Şizofrenide görülen belirtileri pozitif ve negatif şeklinde iki alt gruba ayıran yaklaşım giderek yaygın bir kabul görmektedir. Söz konusu belirti gruplarını tanımlayan çok sayıda değerlendirme ölçeği geliştirilmiştir. Andreasen tarafından geliştirilen ve en yaygın kullanılan ölçekler SANS (Scale for the Assessment of Negatif Symptoms-Negatif Belirtileri Değerlendirme Ölçeği) ve SAPS (Scale for the Assessment of Positive Symptoms-Pozitif Belirtileri Değerlendirme Ölçeği)'dir. Şizofreni tanısı koymak için çok sayıda farklı tanımlama ve tanı ölçütü geliştirilmiştir. Bunların bir bölümü araştırma amacıyla kullanılmaktadır. Klinik uygulamada günümüzde yaygın biçimde kullanılan ICD (International Classification of Diseases-Uluslararası Hastalık Sınıflandırması) ve DSM (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-Mental Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı) şizofreni için önerilen tanı ölçütleridir. DSM IV'e göre şizofreni beş alt gruba ayrılmıştır.[2]

- Paranoid Tip
- Desorganize Tip (Hebefrenik Tip)

- Katatonik Tip
- Ayrışmamış Tip
- Residüel Tip

Şizofreninin nedenine bakmaksızın her hasta için bireysel, ailevi ve psikososyal profil dikkatle araştırılmalıdır. Hastaneye yatırma, tanı, stabilizasyonu sağlamak, cinayet ve intihara karşı hastayı korumak, desorganize tip gibi yetersizlik içinde olanların basit ihtiyaçlarını (beslemek, giydirmek gibi) karşılamak amacıyla yapılmalıdır. Hastaneye yatırma hastalık stresini azaltır. Günlük aktivitelerine dönmesine yardım eder.[9]

1950'li yılların başında tedaviye giren antipsikotik ilaçlar şizofreni tedavisini tamamen değiştirmiştir. Dopamin reseptör antagonisti klasik antipsikotikler, özellikle pozitif semptomların olduğu şizofreni tedavisinde etkilidirler. Ancak iyileştirme oranları düşüktür, tedavide ciddi yan etkileri vardır. Genel olarak akatizi, tremor rijidite gibi parkinsoniyen yan etkilerle, daha nadir olarak da tardif diskinezi, nöroleptik malign sendrom gibi ciddi yan etkilere yol açarlar. Atipik antipsikotikler olarak isimlendirilen seratonin–dopamin anagonistleri şizofrenide dopamin reseptör antagonistlerine göre daha etkili görünmektedirler. Şizofreninin pozitif semptomlarında en az haloperidol kadar etkili olurken, negatif semptomlar üzerinde etkileri daha iyidir. Ekstrapramidal semptomlara yol açmazlar. Şizofreni tedavisinde ilk seçenek ilaçlar olarak yerini almaya başlamışlardır. Şizofrenide antipsikotik tedavi esastır. Ancak araştırmacılar, psikofarmakolojik tedavilerle diğer tedavilerin birlikte daha yararlı olduğunu ileri sürmektedirler.[9] Bu tedaviler;

- Davranış Tedavisi
- Aile Tedavisi
- Grup Tedavisi

- Sosyal Beceri Kazandırma Tedavileri
- Bireysel Psikoterapi

Olanzapinin en çok kullanım alanı şizofreni tedavisidir. Şizofreninin hem pozitif hemde negatif belirtileri üzerine etkili olması, olanzapini şizofreni tedavisinde diğer antipsikotiklere göre öne çıkarmıştır. Olanzapinin 5 ile 20 mg/gün doz aralığında, şizofreninin hem pozitif hemde negatif semptomlarına karşı belirgin antipsikotik aktivitesi olduğu, EPS'nin minimal düzeyde gözlendiği ve prolaktin derişimini hiçbir hastada önceki seviyenin üstüne çıkarmadığı birçok çalışma sonucunda ortaya konulmuştur.[6,10,11] Bardwin ve arkadaşları[12] bir açık çalışmalarında, 10 şizofreni hastasında 5 ve 10 mg/gün olanzapin uygulamasından 4 hafta sonra EPS için Simpson-Angus Skalası, Barnes Akatizi Skalası ve Anormal İstemsiz Hareket Skalası değerlerinde düşme olduğunu bulmuşlardır. Olanzapinin FDA onayı almasını gerektiren, klinik etkisini ve yan etkilerini değerlendiren 4 önemli çalışma vardır.[6]

Beasley ve ark.[13,14] hastanede yatan 152 şizofrenik hastayı kapsayan randomize çift-kör plasebo-kontrollü çalışmalarını gerçekleştirmişler ve 1 mg/gün ile 10 mg/gün olanzapin dozlarını plasebo sonuçlarıyla karşılaştırmışlardır. 1 mg/gün olanzapin alan grupta ölçümlerin herhangi birinde plaseboya göre anlamlı düzelme gözlenmezken, 10 mg/gün olanzapin alan grubun toplam BPRS (Brief Psychiatric Rating Scale-Kısa Psikiyatrik Değerlendirme Ölçeği), PANSS (Pozitive and Negative Syndrome Scale-Pozitif ve Negatif Sendrom Ölçeği) toplam, pozitif ve negatif değerlerinde düzelmenin, plaseboya göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur.

Beasley ve ark.[11] randomize ve plasebo kontrollü, akut alevlenmedeki 335 şizofrenik hastayı kapsayan çalışmalarında, düşük (5 mg/gün), orta (10 mg/gün), yüksek (15 mg/gün) olanzapin dozlarını tipik antipsikotik bir ilaç olan haloperidol (15 mg/gün) ve plaseboyla karşılaştırmışlardır. Akut faz sonuçları, orta ve yüksek doz aralığındaki

olanzapinin, genel psikopatolojiye ve çekirdek pozitif psikotik psikopatolojiye etkili bir antipsikotik ilaç olduğunu göstermiştir. Orta ve yüksek doz olanzapin alan gruptaki toplam BPRS değerlerinde ve CGI-S (Klinik Genel İzlenim-Şiddet Ölçeği-Clinical Global Impression-Severity Scale) ve BPRS pozitif değerlerindeki azalma, plaseboya göre istatiksel olarak anlamlı derecede daha fazla olduğu bulunmuştur. Yüksek doz aralığındaki olanzapinin haloperidole göre negatif semptomlara karşı daha etkili olduğu, BPRS negatif değerleri ve SANS'de azalma ile belirlenmiştir.

Beasley ve ark.[15] hastanede yatan akut alevlenmedeki 431 şizofreni hastasını kapsayan, randomize, çift-kör, aktif kontrollü çalışmalarında, olanzapinin 3 doz aralığı (düşük, orta ve yüksek), haloperidol ve çok düşük (1 mg/gün) olanzapin dozuyla karşılaştırmışlardır. 3 olanzapin doz aralığı ve çok düşük olanzapin dozu arasında toplam BPRS değerinde değişiklik, üç olanzapin doz aralığı ve haloperidol arasında etkinlik açısından, istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Yüksek doz olanzapin alan grup, BPRS pozitif değerinde, PANSS pozitif değerinde ve CGI-S değerinde çok düşük olanzapin dozuna göre istatiksel olarak anlamlı derecede düzelme göstermiştir.

Tollefson ve ark.[16] şizofreni (%83.1), şizofreniform (%1.9) ve şizoaffektif bozukluk (%15) tanısı almış, Avrupa'da ve Kuzey Amerika'da 174 merkezde toplam 1996 yatan ve ayaktan hastayı kapsayan, randomize, çift-kör, aktif kontrollü çalışmalarında 5 ile 20 mg/gün olanzapin dozunu 5 ile 20 mg/gün haloperidol dozu ile karşılaştırmışlardır. Hastaların 2/3'üne olanzapin, 1/3'üne haloperidol verilmiştir. Tedavinin akut fazında olanzapin grubu toplam BPRS değerinde haloperidol grubu ile kıyaslandığında istatiksel olarak anlamlı derecede daha fazla düzelme göstermiştir. Olanzapin grubu haloperidol grubuyla kıyaslandığında, PANSS negatif, BPRS negatif, CGI-S ve toplam MADRS (Montgomery-Asberg Depression Rating Scale-

Montgomery-Asberg Depresyon Değerlendirme Ölçeği) değerlerinde istatiksel olarak anlamlı derecede daha fazla düzelme göstermiştir.

Bu dört çalışma, toplam BPRS değerlerinde azalma ile belirlenen, akut şizofrenideki genel psikopatolojinin tedevisinde olanzapinin etkin olduğunu göstermektedir. Genel psikopatoloji göz önüne alındığında olanzapin plasebo ve haloperidolle kıyaslandığında istatiksel olarak anlamlı veya sayısal olarak üstün sonuçlar göstermiştir.[6] Olanzapin PANSS ve SANS ile belirlenen negatif semptomları tedavide haloperidolle kıyaslandığında istatiksel olarak anlamlı derecede daha etkin bulunmuştur.[13-16] Bu veriler, olanzapinin negatif semptomların düzelmesinde belirgin bir tedavi edici etkisinin olduğunu öne süren path analizi ile desteklenmektedir.[6] Olanzapinin uzun süreli sürdürüm (idame) tedavisine cevap kıyaslandığında, olanzapinle tedavi olan hastaların plaseboya, 1mg/gün olanzapine ve haloperidole göre istatiksel olarak anlamlı derecede fark gözlenmiştir.[13-16] Olanzapinin 24 ile 28 haftalık çalışmalarında diğer atipik antipsikotik ilaçlarla tedavileri karşılaştırıldığında yanıtı sürdürmede ketiapin, risperidon ve ziprasidon'a göre daha başarılı olduğu gözlenmiştir.[17]

Hem serotonin hem de dopamin reseptörleri üzerinde antagonistik etki gösteren olanzapin, hematolojik yan etkilerinin olmaması ve negatif belirtiler üzerinde klasik antipsikotiklere göre daha etkili olması, EPS yan etkilerinin klasik antipsikotiklere göre az olması nedenlerinden dolayı şizofreni ve diğer psikozların tedavisinde önem kazanmaktadır.[6]

2.4.4.2. Olanzapinin Günlük Kullanım Dozu

Olanzapinin günlük kullanım dozu 10-30 mg'dır. Ampül, tablet ve ağızda hızlı bir şekilde eriyen tablet (velotab) formlarında bulunmaktadır.[2] Olanzapin yemekten önce ya da sonra alınmasına bakılmaksızın günde 1 kez alınabilmesi nedeniyle kullanım

rahatlığı sağlamaktadır[18]. Olanzapinin optimal dozu, doz cevap ilişkisini değerlendiren, bir kısımda sabit doz, bir kısımda doz titrasyonu sağlamış 4 çift-kör randomize çalışmadan kaynağını almaktadır.[13-16] Genel olarak klinik çalışmalar 10-20 mg/gün olanzapinin tedavi edici doz olduğunu ve çoğu hasta için doz ayarlanmasına gerek olmadığını göstermiştir. 15 mg/gün olanzapin dozunun şizofreninin negatif semptomlarında 10 mg/gün doza göre daha etkili olduğu şeklinde eğilim vardır.[10,18]

Olanzapinin eliminasyon ve yarı ömrünün uzadığı yaşlılar, bayanlar ve sigara içmeyen kişilerde başlangıç dozu düşük (5-10 mg/gün) tutulmalıdır. Karaciğer hastalığı olanlarda dikkatli olunmalı ve uyuklamaya neden olabileceği kullanıcılara anlatılmalıdır[18]. Olanzapinin 300 mg'a varan aşırı dozlarında herhangi bir tıbbi problem oluşturmadığı bildirilmiştir.[19,20]

Olanzapinin klirensi (bir maddeyi kandan uzaklaştırma yeteneği) sigara içenlerde %40 oranında artar. Bu değişim doz ayarlamasını gerektirir. Ayrıca bunun terside geçerlidir. Olanzapinle stabilize olan ve sigara içen biri sigarayı bırakınca olanzapin toksisitesi ortaya çıkabilir. Alkol ile kullanımda ortostatik hipotansiyon etkisi ve merkezi sinir sistemi depresyonu olasılığı artar.[1]

2.4.4.3. Olanzapinin Uygulama Yolları

Olanzapin, şizofreni tanısı almış hastaya ağızdan (tablet ve velotab) ve intramüsküler (IM) yoldan uygulanabilir. IM formu akut psikotik hastalarda ajitasyonun tedavisi için geliştirilmiştir. IM olanzapinle tedavi edilen hastalarda BPRS pozitif alt ölçek puanında başlangıca göre belirgin azalma görülmüştür. IM olanzapinin şizofrenili akut ajite hastalarda pozitif belirtileri tedavi etmede IM plaseboya göre, enjeksiyondan sonra 2. saatten itibaren üstün olduğu ve bu farkın 24 saat boyunca korunduğu belirlenmiştir. Ayrıca tüm çalışmalarda IM olanzapinden oral olanzapine başarılı bir geçiş yapıldığı, geçişten sonra en az 2 gün ve en fazla 4 gün boyunca pozitif

semptomlarda gelişmenin devam ettiği gözlenmiştir. Pozitif semptomlarda bu tutarlı ve ilerleyici düzelme, tedavinin erken evrelerinde pozitif belirtilerin düzeltilmesinde güvenilirliği doğrulamaktadır. Dolayısıyla pozitif semptomlar sergileyen, akut ajite şizofrenili hastalar IM olanzapinle etkili bir şekilde tedavi edilebilir ve başarıyla olanzapin sürdürüm tedavisine geçilebilir.[6]

2.4.4.4. Olanzapinin Diğer İlaçlarla Etkileşimi

Olanzapinin; karbamazepin ve fluvoksamin ile birlikte kullanımında klirensi azalır, aktif kömür ile biyoyararlanım azalır, klomipramin ile kullanımında nöbet bildirilmiştir, haloperidol ile kullanımında haloperidol düzeyi artar, lityum ile birlikte kullanımında ise herhangi bir etkileşme gösterilmiş olmamasına rağmen antipsikotik ilaçlarla olası etkileşmeler olanzapin içinde geçerlidir ve nörotoksisite açısından dikkatli olunmalıdır.[1]

2.4.4.5. Olanzapinin Hamilelikte Kullanımı

Olanzapinin gebelik kullanım risk kategorisi C'dir. Kullanım kararı risk yarar hesabına göre olmalıdır. İnsanlar üzerinde deneyim sınırlı olduğundan dolayı, hamilelik sırasında yalnızca, potansiyel yararı fetüs üzerindeki potansiyel riskinden fazla ise kullanılmalıdır. Gebeliğin son 3 ayında olanzapin kullanmış olan annelerin bebeklerinde çok nadiren tremor, hipertoni, letarji ve uyku hali bildirilmiştir. Hayvanlarda süte geçtiği bilinmektedir, insanlarda da geçmesi güçlü bir olasılıktır. Olanzapin kullanan annelerin emzirmesi önerilmemektedir.[1]

2.4.4.6. Olanzapinin Yan Etkileri

Olanzapinin sık görülen yan etkileri; geçici sedasyon, ortostatik hipotansiyon, kilo artışı, buna bağlı metabolik bozukluklar, kabızlık, ağız kuruluğu ve diyabettir. Ekstrapiramidal yan etkiler ve prolaktin artışı seyrek olarak yüksek dozlarda görülür. Malign nöroleptik sendrom nadir olarak gözlenmektedir. Olanzapin kullanımı sırasında

hastalarda özellikle ilk 1 yıl (ortalama 11.8 kg kadar) kilo artışı gözlenir.[1,2] Bir yıldan sonra hızlı kilo artışı gözlenmez. Kilo artışı hastaların yaklaşık %60 için en rahatsız edici yan etkidir ve tedavi uyumunu olumsuz etkiler. Diyet uygularak veya topiramat gibi (50-200 mg/gün) ilaçlarının kullanımıyla kilo artışı engellenmeye çalışılmalıdır. Aşırı kilo, hiperlipidemi, yüksek tansiyon, Tip 2 diyabet, koroner kalp hastalığı, inme, safra kesesi hastalıkları, osteoartrit, uyku apnesi, solunum bozuklukları ve bazı kanser türlerinin riskini artırır. Olanzapin kullanan hastalarda hiperglisemi riskinin 5 kat arttığı saptanmıştır. Bu nedenle diyabet öyküsü veya riski olan hastalarda tercih edilmemesi daha uygundur.[2]

2.4.4.7. Olanzapin Tayinine Yönelik Yapılan Çalışmalar

Manickam ve ark.[21] şizofreni hastalarının plazmalarında olanzapin miktar tayini için elektrokimyasal dedektörlü (ED) HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Metilen klorit-pentan (15:85, h/h) kullanarak sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi ile %94 geri kazanım sağlamışlardır. İnsan plazmasında yöntemin 0.25-50 ng/mL derişim aralığında doğrusal olduğunu, gün içi ve günler arası kesinlik değerlerinin ise %10'dan küçük olduğunu, LOD değerini ise 0.25 ng/mL olarak belirlemişlerdir.

Olesen ve ark.[22] insan serumunda olanzapin miktar tayini için HPLC-UV yöntemini geliştirmişlerdir. Serum örneklerindeki olanzapini korumak için 1 mL seruma 10 µL %25 askorbik asit eklemişlerdir. Mobil faz olarak pH: 9.9'a 50 mM amonyum asetatla ayarlanmış su ve metanol (15:85, h/h) kullanmışlardır. 1 mL seruma 0.5 mL 0.5 M NaOH ekleyerek heptan-izoamilalkol (97.5:3.5, h/h) karışımı ile yapılan ekstraksiyon sonucunda olanzapinin ortalama geri kazanım değerini %81 olarak bulunmuştur. 270 nm de gerçekleştirdikleri analizlerinde olanzapinin alıkonma zamanının 3.58 dakika, akış hızının 1.1 mL/dk ve gün içi-günler arası kesinlik değerlerinin %8'den küçük, miktar tayin alt sınırı (LOQ) değerini ise 1.56 ng/mL olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca

günlük 5-22.5 mg olanzapin alan hastaların plazma olanzapin derişimlerinin 4-55 ng/mL arasında olduğunu belirtmişlerdir.

Catlow ve ark.[23] ters faz HPLC-ED yöntemini insan plazmasında olanzapin miktar tayini için geliştirmişlerdir. Plazmadan katı faz ekstraksiyon yöntemi kullanarak olanzapini belirlemede mobil faz olarak 5 mM pH:7 sodyum fosfat-metanol-asetonitril (48:26:26, h/h/h) kullanarak, akış hızının 1.2 mL/dk olduğu çalışmalarının 0.25-100 ng/mL aralığında doğrusal olduğunu, LOQ değerinin 0.25 ng/mL, ortalama gün içi doğruluk değerinin %96.6 olduğunu belirtmişlerdir. Olanzapinin alıkonma zamanının 7 dakika olduğu çalışmalarında ortalama geri kazanım değerini %78 olarak bulmuşlardır.

Raggi ve ark.[24] ters-faz C_8 kolon ve ED dedektör kullanarak şizofrenik hastaların plazmalarında olanzapin miktar tayini için HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Enjeksiyon hacmi 20 µL, akış hızı 1 mL/dk ve kolon sıcaklığı 50 °C olan 13.5 mM pH:2 fosfat tamponu-asetonitril (30:70, h/h) hareketli faz kullanılarak gerçekleştirilen analiz sonucunda 2-100 ng/mL aralığında çalışmanın doğrusal olduğunu, alıkonma zamanının 5.7 dakika, ortalama geri kazanım değerinin %91, LOQ değerinin 1.4 ng/mL, LOD değerini ise 1 ng/mL olarak belirlemişlerdir. Çalışmalarında ayrıca UV dedektörle miktar analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Her iki dedektörle elde ettikleri sonuçları istatiksel olarak karşılaştırmışlar ve ED dedektörün daha hassas olduğunu belirtmişlerdir.

Raggi ve ark.[25] farmasötik preparatlarda olanzapini tayin etmek için HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. 260 nm dalga boyunda UV dedektör ile ters faz C_8 kolon ve asetonitril-tetraetilamonyum perklorat (45:55, h/h) hareketli faz kullanarak gerçekleştirdikleri analizde LOQ ve LOD değerlerini sırasıyla 10 ng/mL ve 6 ng/mL, etil asetat kullanarak sıvı-sıvı ekstraksiyon sonucunda geri kazanım değerini ise %100.5

olarak belirlemişlerdir. İnternal standart (IS) olarak karbamazepin kullanmışlar ve çalışmanın 10 ile 150 ng/mL arasında doğrusal olduğunu belirtmişlerdir.

Weigmann ve ark.[26] şizofreni hastalarının serumlarında olanzapin, clozapin ve metabolitlerini tayin etmede HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. UV dedektör kullanılarak 254 nm dalga boyunda gerçekleştirilen analizde, kolon olarak C_{18}, hareketli faz olarak asetonitril-su-tetrametiletilendiamin (37:62.6:0.4, h/h/h) kullanmışlar ve olanzapinin alıkonma zamanını 4.46 dakika, geri kazanım değerini ise %73 ile %90 arasında olduğunu belirlemişlerdir.

Dusci ve ark.[27] plazmadan olanzapini tayin etmek için 270 nm dalga boyunda HPLC-UV yöntemini geliştirmişler. Hekzan-diklorometan (85:15, h/h) ile yapılan ekstraksiyon çalışmasında geri kazanım değerinin %97 ile %102 arasında olduğunu ve olanzapinin alıkonma zamanının 5.4 dakika olduğu çalışmalarının 2 ile 150 ng/mL aralığında doğrusal olduğunu, yöntemin gerçek numunelere uygulama aşamasında günlük 5-40 mg olanzapin alan hastaların plazmalarında ölçülen olanzapin derişimlerinin 3-122 ng/mL arasında olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca çalışmada plazmadaki olanzapin stabilitesini arttırmak için askorbik asit eklemenin çok fazla etki etmediğini göstermişlerdir.

Torre ve ark.[28] kanda katı faz ekstraksiyonu kullanarak olanzapin ve bazı psikotik ilaçları belirlemek için gaz kromatografi (GC) yöntemini geliştirmişlerdir. İki farklı katı faz ekstraksiyon prosedürünü karşılaştırmışlar ve olanzapinin alıkonma zamanının 9.90 dakika olduğu analizlerinde LOQ ve LOD değerlerini sırasıyla birinci işlem için; 123 ng/mL ve 66 ng/mL ikinci işlem için; 205 ng/mL ve 122 ng/mL olarak, ayrıca olanzapin geri kazanım değerlerini ise %38 ile %97 arasında olduğunu belirlemişlerdir.

Raggi ve ark.[29] şizofreni hastalarının plazmalarında olanzapin ve metaboliti desmetilolanzapini tayin etmek için HPLC-ED yöntemini geliştirmişlerdir. C_8 ters faz kolon kullanarak gerçekleştirdikleri analizde, hareketli faz olarak metanol-asetonitril-7.8 mmol/L trietilamin içeren 8.9 mmol/L fosfat tamponu (11:9.7:79.3, h/h/h) kullanmışlardır. Plazmadan katı faz ekstraksiyon yöntemi kullanarak ayırt edilen olanzapinin, alıkonma zamanını 6.8 dakika, yöntemin 0.5-75 ng/mL aralığında doğrusal olduğu ve geri kazanım değerini de %97.9 olarak belirlemişlerdir.

Kollroser ve ark.[30] insan plazmasında olanzapin, clozapin ve desmetilclozapini tayin etmek için Sıvı Kromatografisi-Ardışık Kütle Spektrometrisi (LC-MS/MS) yöntemini geliştirmişlerdir. IS olarak dibenzepin kullandıkları analizlerinde 0.5 mL/dk akış hızında asetonitril-%0.1 formik asitli su (20:80, h/h) hareketli fazını kullanmışlar ve olanzapinin 10-800 ng/mL çalışma aralığında doğrusal olduğunu belirtmişlerdir. Toplam analiz süresinin 6 dakika olduğu çalışmalarında, olanzapinin LOD ve LOQ değerlerini sırasıyla 2 ng/mL ve 5 ng/mL olarak, analiz yapılan tüm bileşenlerin geri kazanım değerlerinin ise %90'dan daha büyük olduğunu belirlemişlerdir.

Mauri ve ark.[31] çalışmalarında 54 akut şizofreni hastasının plazma olanzapin derişim seviyeleri ile klinik sonuç arasındaki ilişkiyi araştırmışlar, 5 ile 20 mg günlük olanzapin alan hastaların plazma olanzapin seviyeleri HPLC yöntemiyle belirlemişlerdir. Hasta plazmalarına esanoasetilat kullanarak sıvı-sıvı ekstraksiyon yapmışlar ve olanzapin plazma seviyelerini 5 ile 120 ng/mL arasında belirlemişlerdir. Plazma seviyelerinin hastanın yaşına, cinsiyetine ve hastalık durumuna bağlı değil, alınan olanzapin miktarına bağlı olduğunu belirtmişlerdir.

Zhu ve ark.[32] gönüllü kişilerde olanzapin plazma derişimlerini belirlemek için HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Gönüllü kişilere tek doz ağızdan 20 mg olanzapin verdikten sonra plazmalarındaki ortalama olanzapin derişimini 113.7±33.1 ng/mL

olarak belirlemişlerdir. Olanzapinin doruk plazma derişiminine ulaştığı süreyi (T_{max}) 5.07±0.65 saat, yarılanma ömrünü ($t_{1/2}$) ise 35.44±4.21 saat olarak belirlemişlerdir.

Boulton ve ark.[33] insan plazmasında ve idrarda olanzapin tayin etmek için HPLC-UV yöntemini geliştirmişlerdir. Hareketli faz olarak; metanol-asetonitril-50 mM pH:6'da fosfat tamponu (10:65:25, h/h) kullanmışlardır. Heptan-izoamil alkol (97.5:2.5; h/h) kullanarak gerçekleştirdikleri sıvı-sıvı ekstraksiyonda ortalama geri kazanım değerini plazma için %83±6, idrar için %79±7 olarak belirlemişlerdir. 25 yaşında, 72 kg ağırlığındaki sağlıklı gönüllüye ağızdan verilen tek doz 5 mg olanzapin verilen insanların plazma derişiminini 6.8 ng/mL, 24 saat sonra değişmeden atılan idrar olanzapin derişimini ise 63 µg/mL olarak belirlemişlerdir. Analiz süresinin yaklaşık 11 dakika ve 214 nm dalga boyunda gerçekleştirdikleri analizlerinin 1-5000 ng/mL arasında doğrusal olduğunu belirtmişlerdir.

Zhoua ve ark.[34] insan plazmasında şizofrenide yaygın olarak kullanılan clozapin, olanzapin, risperidon ve quetiapini tayin etmede HPLC-MS/ESI (Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi/Elektro Sprey İyonizasyon) yöntemini geliştirmişlerdir. Kolon olarak C_{18}, hareketli faz olarak da su (10 mmol/l amonyum asetat, 2.7 mmol/l formik asit)-asetonitril (53:47, h/h) kullanmışlardır. 2 kere eter ile yapılan sıvı-sıvı ekstraksiyon sonucunda 4 analit içinde ortalama geri kazanım değerinin %80'in üzerinde olduğunu, gün içi ve günler arası bağıl standart sapma değerinin ise %15'den az olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmada 2 şizofreni hastasına 10 mg ağızdan verilen olanzapinin 5 saat sonraki plazma derişimlerini 22 ve 18.3 ng/mL olarak, 24 saat sonraki olanzapin plazma derişimlerini ise 8.2 ve 4.8 ng/mL olarak bulmuşlardır. 0.99, 14.8 ve 49.5 ng/mL derişimdeki olanzapin çözeltileri ile yapılan stabilite çalışmalarında -20 °C'de 1 ay, +20 °C'de ise 24 saat stabil olduğunu, plazma numunelerine 3 kere

donma-çözme işlemi yapılabileceğini ve ayrıca C vitaminin olanzapinin stabilitesini arttırdığını belirtmişlerdir.

Kirchherr ve ark.[35] insan serumunda olanzapin ile beraber 48 antipsikotik ve antidepresan ilacı tayin etmek için LC-MS/MS yöntemini geliştirmişlerdir. Hareketli faz olarak metanol-pH:3.9'da 5 mM asetat tamponu (20:80, h/h) kullanarak gerçekleştirdikleri analizde olanzapin için ortalama geri kazanım değerini %101 oarak, olanzapinin ve IS olarak kullanılan metilrisperidonun alıkonma zamanları sırasıyla 2.1 ve 3.2 dakika olarak belirlemişlerdir. Çalışmalarında LOQ değeri 1.83 ng/mL olan olanzapinin, 10-1000 ng/mL arasında doğrusal olduğunu belirtmişlerdir.

Raggi ve ark.[36] şizofreni hastalarının plazmalarında olanzapini tayin etmek için HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. ED dedektör kullanarak gerçekleştirdikleri analizde katı faz ekstraksiyon yöntemi ile olanzapini plazmadan ekstrakte etmişlerdir. Kolon olarak ters faz C_8 kolon, hareketli faz olarak da asetonitril-pH:3.8'de fosfat tamponu (20:80, h/h) kullanmışlardır. Olanzapinin ve IS olarak kullanılan 2-metil olanzapinin alıkonma zamanları sırasıyla 6.1 ve 12.6 dakika olarak belirlemişlerdir. Yöntemin 2-150 ng/mL arasında doğrusal olduğunu ve olanzapinin geri kazanım değerinin ise %99.3 olduğunu belirtmişlerdir.

Bergemann ve ark.[37] 71 şizofreni hastasının plazmalarındaki olanzapin derişiminini tayin etmek için HPLC-ED yöntemini kullanmışlardır. Katı faz ekstraksiyon yöntemi ile olanzapini plazmadan ekstrakte etmişler ve hareketli faz da olarak su-metanol-asetonitril-trietilamin (40:50:10:0.02, h/h/h/h) kullanmışlardır. Günlük ortalama 17.5 mg oral olanzapin alan hastaların plazma olanzapin derişimi 54.2 ng/mL olduğunu belirtmişlerdir. Günlük 5 ile 40 mg arasında olanzapin alan hastaların plazma olanzapin derişiminini 1.2 ile 208 ng/mL arasında bulmuşlar ve alınan olanzapin dozu ile plazma derişiminin doğru orantılı olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca

çalışmalarında olanzapinin plazma derişiminin 7 gün sonra sabit hale geldiğini ifade etmişlerdir.

Gervasini ve ark.[38] plazmadan olanzapini tayin etmek için HPLC-MS yöntemini geliştirmişlerdir. Plazmadan sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi ile etil asetat kullanarak yaptıkları analizlerinde, hareketli faz olarak da %1 formik asit içeren su-asetonitril (78:22, h/h) kullanmışlardır. Çalışmalarının 0.1-200 ng/mL derişim aralığında doğrusal olduğunu, LOQ ve LOD değerlerinin sırasıyla 1 ng/mL ve 0.05 ng/mL olarak, plazmadan geri kazanım değerini ise %94 olarak bulmuşlardır. Çalışmalarında günlük 5 mg ve 10 mg oral olanzapin alan 17 şizofreni hastasının plazmalarındaki olanzapin derişiminini 0.8-71 ng/mL arasında, ortalama olanzapin plazma derişimini ise 34 ng/mL olarak bulmuşlardır.

D'Arrigo ve ark.[39] yaptıkları çalışmada insan plazmasında olanzapini tayin etmek için ters-faz HPLC-UV yöntemi geliştirmişlerdir. IS olarak clozapin kullanmışlar ve sıvı-sıvı ekstraksiyon yönteminini kullanarak olanzapini plazmadan hekzan-izoamil alkol (90:10, h/h) karışımı ile ekstrakte etmişlerdir. Kolon olarak C_8, hareketli faz olarak 0.009 M eptansülfonik asit sodyum tuzu ve 0.06 M potasyum fosfat monobazik (pH:2.7) içeren su-asetonitril (55:45, h/h) kullanmışlardır. 254 nm dalga boyunda gerçekleştirdikleri analizlerinde olanzapinin alıkonma zamanını 3.6 dakika, LOQ ve LOD değerlerini sırasıyla 5 ng/mL ve 2 ng/mL, olanzapinin plazmadan ortalama geri kazanım değerini ise %89.4±3.3 olarak belirlemişlerdir. 10 mg olanzapin kullanan 86 hastanın plazmalarında ölçülen olanzapin derişimleri 5 ile 51 ng/mL arasında olup ortalama olanzapin derişiminini 21 ng/mL olarak tespit etmişlerdir.

Saracino ve ark.[40] eşzamanlı olarak bipolar hastaların plazmalarında olanzapini ve lamotrigini belirlemek için HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Dedektör olarak hem kolumetrik hemde diyod array dedektör (DAD), kolon olarak ters-faz C_8, hareketli faz

olarak metanol-pH:3.5'de 50 mM fosfat tamponu (27:73, h/h) ve IS olarak da melatonin kullanmışlardır. Plazmadan olanzapini katı faz ekstraksiyon yöntemi kullanarak eksrakte etmişlerdir. Olanzapinin 0.1-50 ng/mL derişim aralığında doğrusal olduğunu, LOQ ile LOD değerlerinin sırasıyla 0.1 ng/mL ve 0.03 ng/mL, plazmadan ortalama geri kazanım değerinin ise %91 den büyük olduğunu belirtmişlerdir. Olanzapinin alıkonma zamanını DAD dedektör için 5.9 dakika, kolumetrik dedektör için 6.3 dakika olarak belirlemişlerdir. Ancak DAD dedektörün olanzapini tayin etmede yeteri kadar hassas olmadığını belirtmişlerdir. Günlük 20 mg olanzapin ve 250 mg lamotrigin alan hasta plazması olanzapin derişimi 26.8 ng/mL, lamotrigin derişimi ise 2.5 µg/mL olarak tespit etmişlerdir. Yaptıkları stabilite çalışmalarında plazmadaki olanzapinin kalite kontrol çözeltilerinin (0.1, 25, 50 ng/mL) 5 saat oda sıcaklığında, 12 ay boyunca -80 °C'de stabil olduğunu ve 3 kez donma-çözme yapılabileceğini belirtmişlerdir.

Shah ve ark.[41] yaptıkları çalışmada tabletlerde olanzapini ve fluoksetini tayin etmek için HPLC ve ince tabaka kromatografisi (TLC) yöntemini geliştirmişlerdir. Çalışmalarında hareketli faz olarak fosforik asit ile pH: 5.6'ya ayarlanmış 0.05 M fosfat tamponu ve asetonitril (50:50, h/h), kolon olarak C_{18}, dedektör olarak UV dedektör kullanmışlardır. 10-70 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu çalışmalarının LOQ ve LOD değerlerini sırasıyla 3.429 µg/mL ve 10.392 µg/mL olarak belirlemişlerdir. 233 nm dalga boyunda gerçekleştirdikleri analizlerinde olanzapinin alıkonma zamanını 2.27 dakika ve ortalama geri kazanım değerini ise %99.54 olarak tespit etmişlerdir.

Prameela ve ark.[42] üç farklı farmasötik preparatta olanzapin miktar tayin etmek için HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Ters-faz HPLC yönteminde C_{18} kolon ve akış hızının 1 mL/dk olduğu pH:2.5'de amonyum fosfat tamponu-metanol (70:30, h/h) hareketli fazını kullanmışlardır. 220 nm dalga boyunda UV dedektör kullanarak gerçekleştirdikleri analizlerinde olanzapinin alıkonma zamanını 3.45 dakika, yöntemin

2-10 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu, geri kazanım değerini ise %99.84-%100.15 olarak belirlemişlerdir.

Reddy ve ark.[43] eşzamanlı olarak olanzapin ve fluoksetini tabletlerde belirlemek için ters-faz HPLC-UV yöntemini geliştirmişlerdir. 225 nm dalga boyunda, C_{18} ters-faz kolon ve akış hızı 1.2 dakika olan pH:6.8'e trietilamin ile ayarlanmış 9.5 mM sodyum dihidrojen fosfat-asetonitril-metanol (40:30:30, h/h/h) hareketli faz kullanılarak gerçekleştirdikleri analizlerde, olanzapinin 25-75 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğunu, alıkonma zamanının 7.9 dakika, LOQ ve LOD değerlerinin sırasıyla 5 ng/mL ve 1 ng/mL, geri kazanım değerinin ise %98.2'den büyük olduğunu belirlemişlerdir.

Theisen ve ark.[44] yaptıkları çalışmada HPLC yöntemi ile olanzapin kullanan genç ve yetişkin psikiyatrik hastaların serum olanzapin derişimlerinin, aldığı doza, yaşa, cinsiyete ve sigara kullanımına göre nasıl değiştiğini belirlemişlerdir. Günlük ortalama 12.5 mg olanzapin kullanan şizofreni hastalarının serumlarındaki ortalama olanzapin derişimini 37.7 ng/mL, günlük ortalama 7.5 mg olanzapin kullanan anorexia nevroza hastalarının ortalama serum olanzapin derişimlerini ise 18.7 ng/mL olarak tespit etmişlerdir. Alınan olanzapin dozunun, serum olanzapin derişimi ile doğru orantılı olduğunu, serum olanzapin derişiminin yaşa ve cinsiyete çok fazla bağlı olmadığını fakat sigara kullanımının serum olanzapin derişimini düşürdüğünü belirtmişlerdir.

Bachmann ve ark.[45] çalışmalarında ortalama 16'lı yaşlardaki 54 erkek ve 31 bayan psikiyatrik hastanın günlük alınan oral olanzapin dozu ile serum olanzapin derişimi arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Günlük ortalama 15.8±7.4 mg (2.5-40 mg arasında) olanzapin kullanan hastaların serum olanzapin derişiminin ortalama 45.98±23.99 ng/mL (1.86-110.89 ng/mL arasında) olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca çalışmalarında günlük 6 adet veya daha az sigara içen hastaların serum olanzapin derişiminine sigaranın etki etmediğinide belirtmişlerdir.

Wu ve ark.[46] çalışmalarında şizofreni hastalarında sigara tüketiminin plazma olanzapin derişimi üzerine etkisini incelemişlerdir. 9 ağır sigara tüketen (günlük 5 adet sigara ve üstü), 9 hafif sigara tüketen (günlük 5 adet sigara altı) ve sigara kullanmayan toplam 27 Çin'li erkek şizofreni hastasının plazmalarında HPLC-ED yöntemini kullanarak olanzapin derişimlerini belirlemişlerdir. Sonuçta ağır sigara tüketen hastaların sigara tüketmeyen hastalara nazaran %65.2 oranında olanzapin derişiminde bir azalma olduğunu belirlemişlerdir. Tek doz 10 mg oral olanzapin kullanan ağır sigara tüketen, hafif sigara tüketen ve hiç sigara tüketmeyen hastalardan elde edilen maksimum olanzapin plazma derişimi (C_{max}) değerlerini sırasıyla 9.3±4.3 ng/mL, 19.7±7.4 ng/mL ve 26.7±13.7 ng/mL olarak tespit etmişler ve olanzapin tedavisinde sigara kullanımın göz önünde bulundurulması gereken önemli bir etken olduğu sonucuna varmışlardır.

Nirogi ve ark.[47] insan plazmasında ve farmasötik preparatlarda olanzapin miktar tayini için LC-MS/MS yöntemini geliştirmişlerdir. IS olarak loratadin, kolon olarak C_{18}, hareketli faz olarak 10 mM amonyum asetat tamponu-asetonitril (10:90, h/h) kullanmışlardır. Plazmadan olanzapini ekstrakte etmek için dietil eter-diklorometan (7:3, h/h) karışımını kullanmışlardır. Olanzapinin 0.1-30 ng/mL derişim aralığında doğrusal olduğunu, LOQ değerinin ise 0.1 ng/mL, alıkonma zamanını 1 dakika, plazma geri kazanım değerini ise yaklaşık %85.6 olarak belirlemişlerdir. Yapılan stabilite çalışmalarında ise olanzapinin stok çözeltisinin (1 mg/mL) 4 ay süre ile +4 °C'de stabil olduğunu, 0.3 ile 25 ng/mL derişimdeki olanzapin içeren plazma çözeltilerine 3 defa donma-çözme yapılabileceğine, oda sıcaklığında ve oto örnekleyicide 24 saat, -50 °C'de ise 21 gün stabil kaldığını belirtmişlerdir.

Eishafeey ve ark.[48] çalışmalarında 24 sağlıklı gönüllü erkeğe 10 mg olanzapin içeren 2 ayrı ticari preparat verildikten sonra LC-MS/MS yöntemini kullanarak

olanzapinin farmakokinetik parametrelerini belirlemişlerdir. IS olarak rosuvastatin, kolon olarak C_{18} ve harketli faz olarak %0.1 formik asit ile asitlendirilmiş 0.02 M amonyum asetat tamponu ve asetonitril (70:30, h/h) kulanmışlardır. Plazmalardan olanzapini metil tersiyer bütil eter kullanarak ekstrakte etmişlerdir. Olanzapinin 0.167-16.7 ng/mL arasında doğrusal olduğu çalışmalarında LOQ değerini 0.167 ng/mL olarak tespit etmişlerdir. Referans ve test tablerinden elde edilen sonuçlara göre sırasıyla C_{max} değerlerini; 11.60± 4.08 ng/mL, 13.07±4.47 ng/mL, AUC_{0-72} (eğri altında kalan alan) değerlerini; 367.26±119.22 ng s/mL, 363.38±129.68 ng s/mL, T_{max} değerlerini; 6.42±4.04 saat, 6.04±2.77 saat, $t_{1/2}$ değerlerini ise; 32.66±11.34 saat, 30.50±9.15 saat olarak belirlemişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre iki ticari preparat arasında farmakokinetik parametreler arasında istatistiksel olarak bir farkın bulunmadığını belirtmişlerdir.

Markowitz ve ark.[49] yaptıkları çalışmada 5 mg olanzapin içeren standart oral tablet, ağızda dağılan tablet ve dilaltı tablet arasında farmakokinetik parametreler açısından bir farkın olup olmadığını LC-MS yöntemini kullanarak belirlemişlerdir. 7 gönüllü erkek üzerinde yapılan çalışma sonucunda elde edilen standart oral tablet, ağızda dağılan tablet ve dilaltı tabletin sırasıyla C_{max} değerlerini; 7.09±2.15 ng/mL, 7.10±2.97 ng/mL, 6.82±1.54 ng/mL, T_{max} değerlerini; 4.37±1.57 saat 3.47± 1.93 saat 3.77±1.79 saat, AUC_{0-8} değerlerini ise; 38.08± 9.76 ng s/mL, 39.76±11.0 ng s/mL, 37.97±8.58 ng s/mL olarak belirlemişlerdir. Elde edilen değerlere göre ağızda dağılan tablet ve dilaltı tabletin, standart oral tablete göre daha hızlı absorbe olduğunu, ağızda dağılan tabletin ise dilaltı tablete göre C_{max} değerinin daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Pathak ve ark.[50] çalışmalarında farmasötik preparattan olanzapin ve fluoksetini tayin etmek için HPLC-UV yöntemini geliştirmişlerdir. Kolon olarak C_{18}, hareketli faz

olarak akış oranı 0.8 mL/dk olan, %0.5 ortofosforik asit ile pH:4'e ayarlanmış 75 mM potasyum dihidrojen fosfat tamponu-asetonitril-metanol (55:45:5, h/h/h) kullanmışlardır. 227 nm dalga boyunda gerçekleştirilen analizde olanzapinin alıkonma zamanını 7.7 dakika, fluoksetinin alıkonma zamanını ise 18.9 dakika olarak bulmuşlardır. Olanzapinin 5-80 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu analizlerinde LOD değerinin 0.0345 µg/mL, LOQ değerinin 0.1151 µg/mL, geri kazanım değerinin ise %97.31 olduğunu belirtmişlerdir.

Mitchell ve ark.[51] gerçekleştirdikleri çalışmada şizofreni hastalarında, şizoaffektif bozukluğu olan hastalarda ve bipolar 1 bozukluğu olan toplam 37 hastada 30 gün boyunca günlük 20 mg ve yüksek doz olarak da 30 ile 40 mg olanzapin verilen hastaların plazma olanzapin derişimlerini HPLC-ED yöntemi ile tespit etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre günlük 20 mg olanzapin alan hastaların plazmalarında olanzapini 10 gün sonra 55.3±39.2 ng/mL, 20 gün sonra 57.8±40.2 ng/mL, 30 gün sonra ise 54.9±34.3 ng/mL derişimde tespit etmişlerdir. Ayrıca çalışmalarında yüksek dozlarda (günlük 30 mg ve 40 mg) olanzapin alan hastaların sinirsel bir hastalık olan akatizi hastalığına yakalanabileceğini belirtmişlerdir.

Basavaiah ve ark.[52] HPLC-UV yönteminini kullanarak farmasötik preparatlarda olanzapin miktar tayinini gerçekleştirmişlerdir. Kolon olarak inertsil ODS (oktadesil silan) kolon, haraketli faz olarak akış hızı 0.5 mL/dk olan pH:4.5'e trifloro asetik asit ile ayarlanmış %0.25'lik amonyum asetat tamponu ve asetonitril (70:30, h/h) kullanmışlardır. 271 nm dalga boyunda gerçekleştirdikleri analizlerinde olanzapinin 10-200 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğunu, LOD değerinin 3 µg/mL, LOQ değerini ise 8 µg/mL, olanzapin alıkonma zamanını 7.48 dakika ve geri kazanım değerini %97.7-102.3 arasında tespit etmişlerdir.

Patel ve ark.[53] olanzapin ve fluoksetin HCl içeren farmasötik preparattan olanzapin ve fluoksetin HCl'i belirlemek için HPLC-UV ve HPTLC (Yüksek Performans İnce Tabaka Kromatografisi) yöntemlerini geliştirmişlerdir. HPLC yönteminde akış hızı 1.5 mL/dk olan 0.032 M amonyum asetat tamponu-asetonitril-metanol (50:45:5, h/h/h) hareketli fazını kullanmışlardır. 235 nm dalga boyunda gerçekleştirilen analizlerinde alıkonma zamanının 1.95 dakika olduğu olanzapinin, 0.1-2 μg/mL derişim aralığında doğrusal olduğunu ve geri kazanım değerinin ise %99.31 olarak tespit etmişlerdir.

Titier ve ark.[54] yaptıkları çalışmada insan plazma numunelerine aşırı doz olanzapine, risperidone, 9-hydroxyrisperidone, clozapine ve haloperidol ekledikten sonra HPLC-UV yöntemi ile analizlerini gerçekleştirmişlerdir. IS olarak metilrisperidon, kolon olarak C_8, hareketli faz olarak da gradient ayırım altında 50 mM fosfat tamponu ve asetonitril kullanmışlardır. Sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi olarak 7 mL hekzan-izoamil alkol (99:1, h/h) karışımını kullanmışlardır. Olanzapin alıkonma zamanını 4.01 dakika, yöntemin 10-1000 ng/mL derişim aralığında doğrusal olduğunu, LOQ değerinin bütün analitler için 5 ng/mL ve geri kazanım değerlerinin ise %93 ile %109 arasında olduğunu tespit etmişlerdir. Yapılan stabilite çalışmasında ise 5 farklı ilacın 30, 200 ve 600 ng/mL derişimde hazırlanan çözeltilerinin 24 saat oda sıcaklığında, +4 °C'de 72 saat, -20 °C'de 30 gün stabil olduğunu ve 3 defa donma-çözme işleminin yapılabileceğini belirtmişlerdir.

Choong ve ark.[55] çalışmalarında insan plazmasında olanzapini, 6 psikotik ilacı ve onların aktif metabolitlerini tayin etmek için LC-MS yöntemini geliştirmişlerdir. Analizlerinde kolon olarak C_{18}, hareketli faz olarak gradient ayırım altında %25 amonyum hidroksit ile pH: 8.1'e ayarlanmış 20 mM amonyum asetat tamponu ve asetonitril, IS olarak da remoksiprit kullanmışlardır. Plazmadan olanzapini katı-faz

ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte etmişler ve çalışma sonucunda alıkonma zamanının 8.1 dakika, yöntemin 2-200 ng/mL derişim aralığında doğrusal olduğunu, LOQ değerini 2 ng/mL ve plazmadan geri kazanım değerinin ise %111 olduğunu tespit etmişlerdir. Geliştirdikleri yönteminin gerçek numunelere uygulamasında ise 34 psikiyatrik hasta plazmasında olanzapin derişiminin 2-76 ng/mL arasında olduğunu ifade etmişlerdir. Stabilite çalışmalarında plazma olanzapin düşük derişiminin (6 ng/mL) oda sıcaklığında 24 saat stabil olduğunu fakat 72 saat sonra stabilitesini kaybettiğini, +4 °C'de yine 72 saat sonra stabilitesini kaybettiğini, 1 kez donma-çözme yapılabileceğini belirtmişlerdir. Yüksek derişimdeki (170 ng/mL) olanzapin plazma çözeltilerinin ise oda sıcaklığında ve + 4 °C'de 72 saat boyunca stabil olduğunu, 3 kez donma-çözme yapılabileceğini ve her iki çözeltinin -20 °C'de 2 ay stabil olduğunu belirtmişlerdir.

Sachse ve ark.[56] çalışmalarında olanzapin, quatiapin, clozapin, perazin ve metabolitlerini insan serumunda tayin etmek için HPLC-UV yöntemini geliştirmişlerdir. 254 nm dalga boyunda IS olarak fluperlapin, hareketli faz olarak %95'lik asetik asit ile pH: 6.5'e ayarlanmış su-asetonitril-tetrametil etilendiamin (62.1:37:0.4, h/h/h), kolon olarak da C_{18} kolondan önce C_8 kolon kullanarak gerçekleştirdikleri analizlerinde, alıkonma zamanının 9.1 dakika, yöntemin 10-170 ng/mL derişim aralığında doğrusal olduğunu, LOQ değerinin 5 ng/mL, olanzapinin serumdan geri kazanım değerinin ise %91 ile %111 arasında olduğunu tespit etmişlerdir. Yöntemin gerçek numunelere uygulanmasında ise 7 gün boyunca günlük 20 mg olanzapin alan 120 şizofreni hastasının serumlarında ortalama olanzapin derişimi 48±27 ng/mL olarak belirlemişlerdir.

Josefsson ve ark.[57] olanzapin ve ana metaboliti olan N-desmetilolanzapini insan plazmasında ve beyin omurilik sıvısından (BOS) tayin etmek için LC-MS/MS yöntemini geliştirmişlerdir. IS olarak olanzapin-D3 kullandıkları analizlerinde

olanzapinin alıkonma zamanı 2.1 dakika olarak belirlemişlerdir. Plazmadan ve BOS dan olanzapini tersiyer bütil metil eter kullanarak ekstrakte etmişler ve olanzapinin plazmadaki LOQ değerini 0.3 ng/mL, BOS daki LOQ değerini ise 0.1 ng/mL, olanzapin geri kazanım değerini plazmada %85-%107 arasında, BOS da ise %75-%81 arasında olduğunu tespit etmişlerdir. Yöntemin gerçek numunelere uygulama aşamasında ise 10 mg olanzapin alan şizofren hastası plazmasın ve BOS da olanzapin derişimleri sırasıyla 22 ng/mL ve 3.6 ng/mL olarak belirlemişlerdir.

Fisher ve ark.[58] insan plazmasında olanzapin ve bazı atipik antipsikotik ilaçları tayin etmek için LC-MS/MS yöntemini geliştirmişlerdir. Hareketli faz olarak metanol ve amonyum asetatın kullanıldığı, akış hızının dakikada 0.5 mL ve enjeksiyon hacminin 20 µL olduğu çalışmada, yöntemin 1-200 ng/mL derişim aralığında doğrusal, geri kazanım değerini %96 ve alıkonma zamanını 5.17 dakika olarak tespit etmişlerdir. Plazmadan olanzapin bütil asetat-bütanol (9:1, h/h) karışımı kullanarak ekstrakte edilmiştir.

Urinovska ve ark.[59] çalışmalarında olanzapinin de aralarında bulunduğu dört atipik antipsikotik ve beş antidepresan ilaç ile onların ana metabolitlerini insan serumunda LC-MS/MS yöntemini kullanarak tayin etmişlerdir. Serum proteinlerini çöktürmek için içerisinde %0.05'lik çinko sülfat bulunan asetonitril-metanol (40:60, h/h) karışımını kullanmışlardır. IS olarak alprenolol, kolon olarak C_{18}, gradient ayırım şartlarında hareketli faz olarak ise %0.1 formik asit içeren asetonitril ve 2 mM amonyum asetat kullanmışlardır. Çalışmada, yöntemin olanzapin için 5-500 ng/mL arasında doğrusal olduğu ve geri kazanım değerinin %97.6 den yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca olanzapin kullanan 11 hastanın plazmalarından ilaç alımından 6 saat sonra olanzapin derişimi 4.9–46.6 ng/mL arasında olduğu belirlenmiştir.

Ikeda ve ark.[60] plazmada olanzapini tayin etmek için GC-MS (Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi) yöntemini geliştirmişlerdir. Plazmadan olanzapini ekstrakte etmek için, %1'lik trietilamin içeren diklorometan-hekzan (1:1, h/h) karışımını ve IS olarak promazini kullanmışlardır. Yöntemin 0.5-100 ng/mL arasında doğrusal, güniçi-günler arası kesinlik değerinin %7.3'den düşük ve doğruluk değerinin %94,6 ile %110 arasında olduğunu ve LOQ değerini 0.5 ng/mL olarak tespit etmişlerdir. Çalışmada, 3 şizofreni hastasının plazmalarında olanzapin derişiminini belirlemişlerdir. Günlük 5 mg olanzapin alan hastalarda 7.8 ile 13.3 ng/mL derişimde olanzapin, 10 mg/gün olanzapin alan hastada ise 47.4 ng/mL derişimde olanzapin olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca çalışmalarında 5, 25 ve 50 ng/mL derişimde olanzapin içeren plazma çözeltilerinin -40 °C'de 15 ve 90 gün sonunda ölçülen değerlere göre stabilitelerini koruduğunu ve en düşük ortalama geri kazanım değerinin %102 olduğunu belirtmişlerdir.

Fonseca ve ark.[61] GC-MS/MS (Gaz Kromatografisi-Ardışık Kütle Spektrometrisi) yöntimini geliştirerek insan plazmasında 7 antipsikotik ilacı (klorpromazin, haloperidol, siyamemazin, ketiapin, klozapin, olanzapin ve levomepromazin) tayin etmişledir. Çalışmada, yöntemin 0.8–200 ng/mL arasında doğrusal olduğunu, LOQ değerinin 0.2 ng/mL, ortalama geri kazanım değerinin ise %62 ile 84 arasında olduğunu tespit etmişlerdir.

Bao ve ark.[62] rat beyin dokularında olanzapini tayin etmek için HPLC-ED yöntemini geliştirmişlerdir. Beyin doku homojenatını diklorometan-siklohekzan (15:85, h/h) karışımı yardımıyla ekstrakte etmişlerdir. Mobil faz olarak fosfat tamponu (pH:7.75 mM)-metanol-asetonitril (46:26:26, h/h/h) kullandıkları analizlerde yöntemin 0,5-100 ng/mL arasında doğrusal ve geri kazanım değerinin ise %82 ile %87 arasında olduğunu tespit etmişlerdir. Yapılan stabilite çalışmalarında ise 25 ve 100 ng/mL

derişiminde olanzapin içeren doku homojenatına 2 kez donma-çözme yapılabileceğini ve -70 °C'de 110 gün boyunca, oda sıcaklığında ise 2 saat boyunca saklanabileceğini belirtmişlerdir.

Ravinder ve ark.[63] insan plazmasında olanzapin ve fluoksetini tayin etmek için LC-MS/MS yöntemini geliştirmişlerdir. IS olarak duloksetin, mobil faz olarak ise amonyum asetat tamponu (pH:5.5 mM)-asetonitril (10:90, h/h) kullanmışlardır. Plazmadan olanzapini metil tersiyer bütil eter-hekzan (80:20, h/h) karışımı kullanarak sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte etmişlerdir. 0.250 mL numune ile 3.20 dakikada (olanzapin için 1.69 dakika) analizlerini gerçekleştirdiklerini ifade etmişlerdir. Olanzapinin 0.1-50000 ng/mL çalışma aralığında doğrusal olduğunu ve ortalama geri kazanım değerinin ise %86.3 olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan stabilite çalışmalarında 0.15 ve 20 ng/mL plazma olanzapin derişimi için, 3 kez donma-çözme yapılabileceğini ve 5 saat 22 dakika oda ısısında, 24 saat -10 °C'deki oto örnekleyicide, 22 gün -70 °C'de saklanabileceğini belirtmişlerdir. 6 gönüllü üzerinde yapılan farmakokinetik çalışmada ise 10 mg olanzapinin oral alımından sonra C_{max} değeri 12.67 ng/mL, T_{max} değeri ise 4.83 saat olarak bulmuşlardır.

Bonde ve ark.[64] LC-MS/MS yöntemini geliştirerek insan plazmasında eş zamanlı olarak olanzapin ve fluoksetini belirlemişlerdir. Plazmadan katı faz ekstraksiyon yöntemi kullanarak elde ettikleri olanzapini, kolon olarak C_{18}, akış hızının 1 mL/dk olduğu hareketli faz olarak da metanol-2 mM amonyum asetat tamponu (90:10, h/h) kullanarak tayin etmişlerdir. Analiz süresinin 2 dakika (olanzapinin alıkonma zamanı 1.05 dakika) olduğu çalışmalarında olanzapinin 0.1-20 ng/mL çalışma aralığında doğrusal olduğunu ve plazmadan geri değerinin ise %87.75 ile %93.98 arasında bulunduğunu belirtmişlerdir. Yapılan stabilite çalışmalarında olanzapinin 0.3 ve 15 ng/mL derişimdeki plazma çözeltilerinin 21 gün -20 °C'de, 58 saat oto örnekleyicide, 6

gün -80 °C'de, 7 saat oda sıcaklığında stabil olduğunu ve 5 kez donma-çözme yapılabileceğini belirtmişlerdir.

Ansermot ve ark.[65] insan plazmasında olanzapin ile beraber 10 psikotik ilacı ve metabolitlerini katı faz ekstraksiyon yöntemi ile ekstraksiyon sonucunda ultra HPLC-MS/MS yöntemi ile miktar tayinini gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada, 10 mM amonyum format tamponu-asetonitril (85:15, h/h) mobil fazını kullanmışlar ve yöntemin olanzapin için 0.5-200 ng/mL derişim aralığında doğrusal olduğu ve alıkonma zamanının 0.63 dakika olduğu tespit edilmiştir. 1.5 ve 160 ng/mL derişimde olanzapin içeren plazma çözeltilerinin oda sıcaklığında ve +4 °C'de 72 saat, -20 °C'de 3 ay stabil olduğu ve 3 defa donma çözme yapıldığında stabilitesinin bozulmadığı belirlenmiştir.

Farmasötik preparatlarda olanzapin miktar tayini için HPLC-UV yöntemini Cui ve ark.[66] geliştirmişlerdir. Çalışmada, hareketli faz (A) olarak asetik asit ile pH:3.73'e ayarlanmış %0.3'lük trietilamin içeren su, hareketli faz (B) olarak da metanolden oluşan gradient ayırım kullanmışlardır. 30 °C ve 274 nm dalga boyunda gerçekleştirdikleri tayinde alıkonma zamanının 11.10 dakika, yöntemin 50-320 μg/mL derişim aralığında doğrusal ve geri kazanım değerinin ise %100.26'dan büyük olduğu tespit etmişlerdir.

Lu ve ark.[67] insan plazmasında olanzapini ve metaboliti olan N-desmetil olanzapini tayin etmek için ters faz HPLC-kolumetrik dedektör yöntemini geliştirmişlerdir. C_{18} kolon, 50 mM pH:5.7 fosfat tamponu-asetonitril-metanol (67:22:11, h/h/h) den oluşan hareketli fazını ve katı-faz ekstraksiyon yönteminini kullanmışlardır. LOQ değerinin 1 ng/mL, geri kazanım değerini %73.26-%93.83 ve yöntemin 1-100 ng/mL arasında doğrusal olduğunu belirlemişlerdir. 30 dakika olan analiz süresinde olanzapin, desmetil olanzapin ve IS'ın (clozapin) alıkonma zamanlarının sırasıyla 8.04 dakika, 5.88 dakika ve 26.27 dakika olarak tespit etmişlerdir. Günlük 5-20 mg olanzapin kullanan 48 şizofreni hasta plazmalarında

olanzapin geliştirilen yöntem ile analiz etmişler ve ortalama plazma derişimini 35.46±24.12 ng/mL olarak belirlemişlerdir.

Urinovska ve ark.[68] insan serumunda ve farmasötik preparatlarda içerisinde olanzapininde bulunduğu birkaç atipik antipsikotik ve antidepresan ilaç ile bunların hem aktif hemde pasif metabolitlerini tayin etmek için LC-MS/MS yöntemini geliştirmişlerdir. Çalışmada, hareketl faz (A) olarak %5'lik asetonitril içerisinde %1'lik formik asit ve 2 mM amonyum asetat, hareketli faz (B) olarak da %95'lik asetonitril içerisinde %1'lik formik asit ve 2 mM amonyum asetattan oluşan gradient ayırım ve IS olarak aprenololü kullanmışlardır. Olanzapinin alıkonma zamanı 0.52 dakika ve geri kazanım değeri %97.6'dan büyük olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca geliştirilen yöntem ile günlük 7.5 ile 30 mg arasında olanzapin alan hastaların 6 saat sonraki serumlarında olanzapin analizi yapılmış ve olanzapin derişimim 4.9 ile 46.6 ng/mL arasında belirlemişlerdir. .

Zakeri-Milani ve ark.[69] 24 gönüllü insana 10 mg olanzapin oral olarak verildikten sonra HPLC-UV yöntemini kullanarak olanzapin miktar tayini yapıldıktan sonra farmakokinetik parametre değerlerini belirlemişlerdir. C_8 kolon, %0.25 fosforik asit ve %0.05 trietilamin içeren pH:2'de su ve asetonitril (86:14, h/h)'den oluşan hareketli faz çalışma parametrelerini kullanmışlardır. Olanzapin alıkonma zamanı 3.9 dakika, yöntemin 2-24 ng/mL derişim aralığında doğrusal olduğu ve LOQ değerinin ise 1.25 ng/mL olduğunu belirlemişlerdir. 72 saat boyunca gönüllülerden alınan kan örneklerinden elde edilen C_{max} değerini 15.82±3.15 ng/mL olarak tespit etmişlerdir.

Tantawy ve ark.[70] spektrofotometri, TLC ve HPLC-UV yöntemleri ile farmasötik preparatlarda olanzapin ve fluoksetin hidroklorit miktar tayinlerini yapmışlardır. Spektrofotometri yönteminde 292 nm dalga boyunda çalışmışlar ve yöntemin 5–17.5 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu, TLC yöntemi için metanol-toluen-

amonyakdan (7:3:0.1, h/h/h) oluşan hareketli fazı kullanmışlar ve yöntemin 1-8 µg/bant derişim aralığında doğrusal olduğu ve HPLC yöntemi için ise fosfat tamponu (pH:4.0)-asetonitril-trietilaminden (53:47:0.03, h/h/h) oluşan hareketli fazı kullanmışlar ve yöntemin 20-100 µg/mL aralığında doğrusal olduğunu tespit etmişlerdir. Farmasötik preparattan geri kazanım değerleri HPLC için %100.97, TLC yöntemi için %99.51 ve spektrofotometri yöntemi için ise %100.55 olarak belirlemişlerdir.

Rubesh ve ark.[71] olanzapin ve fluoksetin HCl'i farmasötik preparatlarda tayin etmek için UV-görünür bölge spektrofotometri yöntemini geliştirmişlerdir. 258 nm dalga boyunda gerçekleştirilen analizlerde yöntemin 10-100 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu, %BSS değerinin %2'den küçük ve geri kazanım değerlerinin ise %97-102 arasında olduğunu tespit etmişlerdir.

Chatsiricharoenkul ve ark.[72] 10 mg oral olanzapin verilen 24 Tayvanlı sağlıklı gönüllünün plazmalarında olanzapin miktarı LC-MS/MS yöntemi ile belirlemişlerdir. İki farklı 10 mg olanzapin etken madde içeren ticari preparat gönüllülere verildikten sonra 0-120 saat aralığında kan örnekleri toplanmış ve plazma olanzapin derişimleri tespit edilmiştir. Çalışmada, IS olarak loratadine, C_{18} kolon, asetonitril-10 mM amonyum asetat tamponundan (60:40, h/h) oluşan hareketli fazı, hekzan-izoamil alkol ile sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Elektrosprey iyonizasyon pozitif iyon modunda gerçekleştirilen analizlerde yöntemin 0.005 ile 50 ng/mL derişim aralığında doğrusal olduğu ve gönüllülerin plazmalarından elde edilen C_{max} değerinin ise 27.6±8.45 ng/mL derişiminini tespit etmişlerdir.

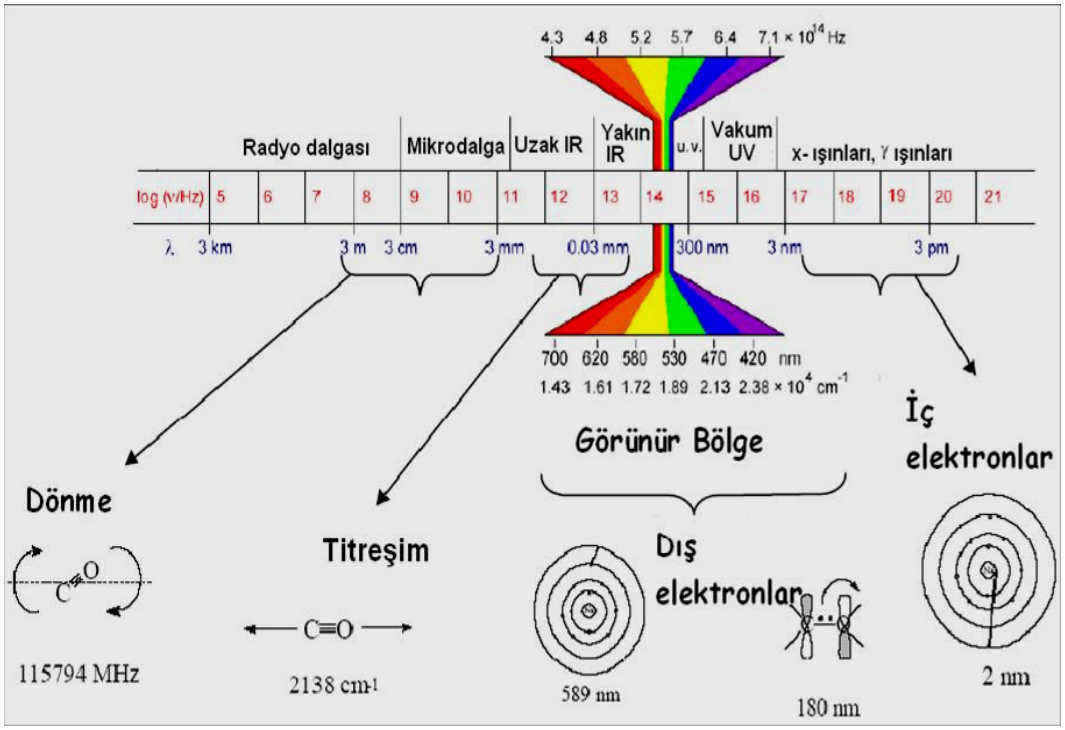
Bir çalışmada, 10 mg olanzapin içeren 2 farklı ticari preparat 26 sağlıklı gönüllüye verildikten sonra plazmalarında katı faz ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edidikten sonra olanzapin miktarları LC-MS/MS yöntemi ile belirlenmiştir.[73] IS olarak citalopram, 0.01 M amonyum asetat-asetonitrilden (25:75, h/h) oluşan hareketli faz

çalışma parametreleri kullanmıştır. Yöntemin 0.1-100 ng/mL derişim aralığında doğrusal olduğu ve plazmadan geri kazanım değerleri ise %79.07 ile %87.73 arasında olduğu tespit edilmiştir. Gönüllülerden alınan kanlardan elde edilen sonuçlara göre olanzapin C_{max} değerinin ağızda eriyen tablet için 21.3 ng/mL ve film-kaplı tablet için ise 30.7 ng/mL olduğu belirlenmiştir.

2.5. Spektroskopik Yöntemler

Elektromagnetik ışının madde ile etkileşmesini inceleyen bilim dalına spektroskopi denir. Spektroskopik yöntemler; atomik ve moleküler spektroskopiye dayanan geniş bir analitik yöntemler grubudur. İnorganik ve organik bileşiklerin kalitatif, kantitatif analizlerinde, asit-baz denge sabitlerinin ve molekül yapılarının aydınlatılmasında spektroskopik yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır. Spektroskopi kavramı önceleri görünür bölge ışınının çeşitli dalga boylarına ayrılıp spektrumlarının elde edilmesi için kullanılırken günümüzde ise elektromanyetik ışınların madde ile etkileşimini inceleyen genel bir bilim dalı olarak tanımlanmaktadır. Önceleri sadece elektromanyetik ışıma ile madde arasındaki etkileşimlerle ilgilenilirdi; ancak bugün için spektroskopinin kapsamı madde ve diğer enerji türleri arasındaki etkileşimleri de içerecek şekilde genişletilmiştir. Elektromanyetik ışıma uzayda çok büyük bir hızla hareket eden dalga ve parçacık yapısında bulunan, pek çok yapıya girebilen bir enerji şeklidir. Elektromanyetik ışının madde (atom ya da moleküller) tarafından soğurulması veya yayılması inceleniyorsa sırasıyla, soğurma (absorpsiyon) veya yayılma (emisyon) spektroskopileri olarak adlandırılır. Işının moleküller tarafından soğurulması moleküldeki atomların türüne, düzenlenmesine, moleküllerin şekline, büyüklüğüne vb. özelliklerine bağlı olduğundan spektroskopik yöntemler maddelerin yapılarının ve stereokimyasal özelliklerinin bulunması, tanınması ve saflık kontrolü gibi çok geniş bir alanda uygulanmaktadır. Spektroskopik çalışmalarda madde üzerine dalga boyu 110 nm

den 30000 nm'ye kadar değişen çeşitli ışınlar gönderilir (Şekil 2.3). Bütün bu dalga boylarını verecek ve hangi dalga boylarının absorplandığını tespit edecek tek bir cihaz yapmak mümkün olmadığından, belirli dalga boyları arasında çalışan cihazlar geliştirilmiştir. 110-1000 nm dalga boylarındaki ışınlarla çalışan cihazlara ultraviyole ve görünür alan, 2500-30000 nm dalga boylarında çalışan cihazlara infrared ve dalga boyları yüzlerce metreye kadar değişen radyo dalgalarıyla çalışan cihazlara da nükleer manyetik rezonans cihazları denir. Bu cihazların geçerli oldukları alan spektroskopilerine de sırasıyla Ultraviyole-Görünür Bölge (UV-Visible), Infrared (IR titreşim) ve Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektroskopileri adı verilir.[74,75]



Şekil 2.3. Elektromanyetik ışınların sistematik olarak tanımlanması[76]

2.5.1. Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi

Atomların en dış tabaka elektronlarının uyarılması üzerine kurulmuş olan spektroskopi dalına atomik absorpsiyon spektroskopisi denir. Atomlarda, en dış tabaka

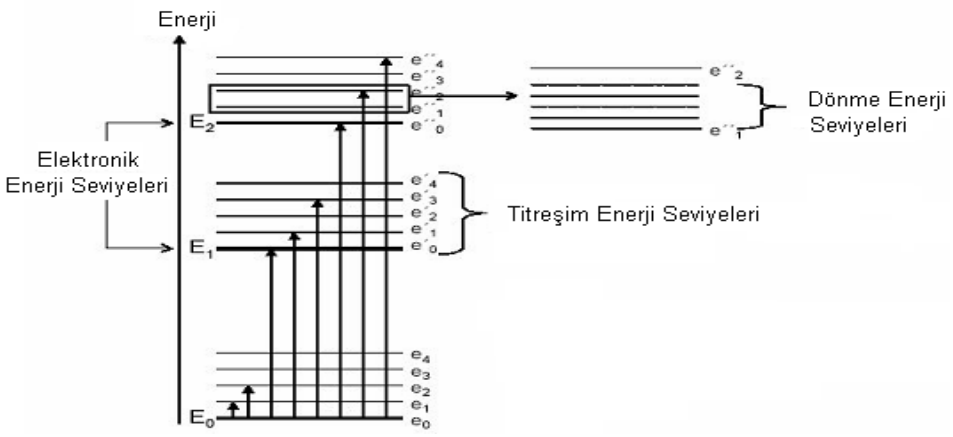
elektronları ultraviyole ve görünür bölge ışınlarla uyarıldıkları halde, iç tabaka elektronları uyarılamaz. İç tabaka elektronlarını uyarabilmek için X-Işınları kullanılır. X-Işınları görünür bölge ışınlarından daha fazla enerjilidirler, en iç tabaka elektronlarının uyarılması üzerine kurulmuş olan spektroskopi dalına ise X-ışınları spektroskopisi denir.

2.5.2. Moleküler Absorpsiyon Spektroskopisi

Moleküler Absorbans**,** UV ve görünür ışınları, düşük enerjili atomik ve moleküler orbitallerdeki elektronlarını, daha yüksek enerjili orbitallere çıkarılması sonucunda gerçekleşir. Moleküller, UV, görünür ve infrared ışınları ile uyarıldıkları zaman, kuantlaşmış 3 tip geçiş vardır. Bunlar elektronik geçişler ve ışın ile oluşturulabilen titreşim ve dönme geçişleridir (Şekil 2.4). Bir molekülün toplam enerjisi E_T;

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

olarak ifade edilir. 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.[75,77]



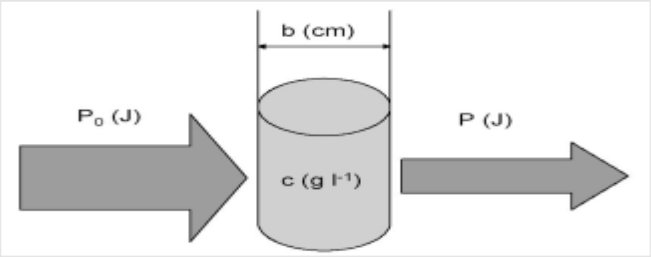
Şekil 2.4. Bir molekül için elektronik, titreşim ve dönme enerji seviyelerini gösteren enerji diyagramı

Elektronik geçişler dalga boyları 200-1000 nm arasında olan ultraviyole ve görünür alan ışınlarıyla gerçekleşir. Moleküler absorpsiyon spektroskopisinin, atomik absorpsiyon spektroskopisinden ayrılan en önemli yanı; atomik absorpsiyon spektroskopisinde birbirinden farklı dalga boylarında keskin çizgiler meydana gelmesine karşılık, moleküler absorpsiyon spektroskopisinde, birçok dalga boylarını içine alan geniş absorpsiyon bantlarının meydana gelmesidir. Bir molekülün UV-Görünür alan spektrumu, molekülün bağ elektronlarından birinin bir foton enerjisini absorplayarak bir üst elektronik seviyeye geçmesi şeklinde açıklanabilir.

2.5.3. Işının Absorplanması ve Lambert-Beer Yasası

Çeşitli dalga boylarında ışın içeren bir demet, saydam ve şeffaf bir ortamdan geçirilirse, içinden bazı dalga boylarının kaybolduğu görülür. Buna ışının absorplanması denir. Absorpsiyonla ışın enerjisi, maddenin iyon, atom, moleküllerine aktarılır. Böylece ışın enerjisini absorplamış olan iyon, atom veya moleküller uyarılmış hale geçerler.

Uyarılmış bir atom veya molekül 10^{-8} saniye kadar yaşayabilir. Sonra absorpladığı ışın enerjisini geri vererek tekrar eski haline veya temel haline döner. Madde tarafından absorplanan ışın enerjisinin geri verilmesi, genellikle ısı şeklinde olur ve madde az çok ısınır. Bazı maddelerde ise absorplanan ışın enerjisi daha uzun dalga boylu ışınlar halinde yayınlanır. Buna fotolüminesans olayı denir. Bu olayın çok kısa süreli olanına floresans, daha uzun süreli olanına fosforesans adı verilir. Bir maddenin temel haliyle uyarılmış halleri arasındaki enerji farkları, başka bir maddeninkinden farklı olduğundan, her maddenin kendine özgü bir absorpsiyon spektrumu vardır. Absorpsiyon spektrumları; atomik absorpsiyon spektrumları ve moleküler absorpsiyon spektrumları olmak üzere iki kısma ayrılır.[77]



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

Maddenin ışını soğurma (absorplama) derecesini ölçmek ve bundan yararlanarak derişimi saptamak için, soğurma ile derişim arasındaki ilişki bilinmelidir. Monokromatik (tek dalgaboylu ışın) ve P_o şiddetindeki bir ışın demeti, kalınlığı b cm olan bir küvette bulunan çözeltideki herhangi bir molekül tarafından absorplandığında şiddeti azalı ve P şiddetinde terkeder (Şekil 2.5). Buna göre ışın demetinin ortamdan geçme oranına geçirgenlik (T) adı verilir.[74,75,77]

$$T = P / P_o$$

şeklinde gösterilir. Geçirgenlik, genellikle yüzde olarak verilir:

$$\%T = P / P_o \; 100$$

Geçirgenliğin eksi logaritması absorbans (A) olarak adlandırılır ve absorbans

$$A = -\log_{10} T = -\log P / P_o$$

şeklinde formüle edilir.

Moleküllerin seçilen dalgaboyundaki ışımayı absorplaması sonucu ortaya çıkan azalma Lambert-Beer eşitliği ile verilir.[74,75,77]

$$A = \log P_o / P = \varepsilon.b.C$$

ε : Molar absorptivite katsayısı, C: Derişim (mol/L)

2.5.4. Ultraviyole-Görünür Bölge Spektrofotometreleri

Spektrofotometre, elektromanyetik ışının dalga boyunun bir fonksiyonu olarak numunenin absorbans veya geçirgenliğini ölçmek için kullanılan bir cihazdır. Spektrofotometre başlıca ışık kaynağı, monokromatör, örnek kabı ve dedektörden oluşur (Şekil 2.6). Ultraviyole-Görünür Bölge spektrofotometreleri, 110 nm'den 1000 nm arasında değişen dalga boylarında çalışırlar. Ancak 110 nm ile 200 nm dalga boyu aralığında çalışan cihazlar vakum tertibatlı ve oldukça pahalı cihazlardır. Bundan dolayı laboratuvarlarda kullanılan spektrofotometri cihazları 200 nm ile 1000 nm dalga boyu aralığında çalışmaktadırlar. Spektrofotometrelerde elektromanyetik ışın kaynağı olarak döteryum ve tungsten olmak üzere iki lamba kullanılmaktadır. 180-400 nm aralığında ışın üretmek için döteryum lambası, 400-2500 nm arasında ışın üretmek için tungsten lambası kullanılmaktadır.[74,75,77] 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.



Şekil 2.6. Spektrofotometre cihazının basit bir şematik gösterimi[78]

2.5.5. UV-Görünür Bölge Spektrofotometre Cihazının Kullanım Amaçları

2.5.5.1. Kalitatif Analiz

Bilinmeyen bir madde saflaştırıldıktan sonra UV spektrumu alınır. Bu spektrum, her yönüyle aynı şekilde daha önce alınmış olan spektrumlarla karşılaştırılır. Bilinmeyen maddenin spektrumu daha önceki madde spektrumlarından hangisine uyuyorsa, bilinmeyen madde o maddedir. Bilinmeyen madde, bilim dünyası tarafından bilinmeyen yeni bir madde değil, sadece analizi yapan kişi tarafından bilinmeyen maddedir. Bundan başka maddenin ne olduğu biliniyor fakat saf olup olmadığı bilinmiyorsa, maddenin spektrumu alınır. Spektrumda beklenmedik piklerin görünmesi maddenin saf olmadığını gösterir. Ayrıca, ultraviyole ışınlarla yapılan spektrofotometrik ölçümlerde benzer kromofor grupların kalitatif tayininde de yararlı olur. Çok karmaşık yapılı organik moleküllerin bile, fonksiyonel gruplar dışında kalan kısımları, 180 nm'den daha uzun dalga boylarına karşı geçirgendir. Onun için, 200-400 nm aralığında bir veya daha çok pik gözleniyorsa bu, molekülde doymamış grupların veya kükürt, halojen gibi hetero atomların varlığını gösterir. Çoğu zaman, analitin spektrumu, çok sayıda kromofor grup içeren ve yapısı bilinen başka bir molekülün spektrumu ile karşılaştırılarak, analitteki fonksiyonel grup hakkında bir fikir edinilebilir. Fakat genel bir kural olarak, analitin kesin yapısını anlamak için yeterli ayrıntılı bilgileri, utraviyole spektrumlarında bulamayız. Bu yüzden, ultraviyole spektrumlarından elde edilen kalitatif veriler, NMR, MS gibi başka fiziksel ve kimyasal verilerle desteklenmeli mümkünse çözünürlük, erime noktası, kaynama noktası gibi bilgilerle birleştirilmelidir. Kalitatif analiz amaçlı ultraviyole spektrumları genelde analitin seyreltik çözeltileri kullanılarak elde edilir. Fakat uçucu bileşiklerin gaz halindeki spektrumları alınabilirse, daha ayrıntılı ve dolayısıyla daha yararlı spektrumlar ele geçer. Ultraviyole-Görünür Bölge spektroskopisinde kullanılacak çözücünün bu bölgedeki ışınlar için geçirgen

olması ve numuneyi, belirgin pikler verebilecek derişimlerde çözmesi gerekir. Ayrıca çözücü ile absorpsiyon yapan tür arasındaki mümkün etkileşmeleri de hesaba katmak gerekir. Örneğin, su, alkol, ester ve keton gibi polar çözücüler, spektrumdaki titreşim ayrıntılarını örtme etkisi gösterirler. Polar çözücüler, hem spektrumun titreşimlerinden ileri gelen küçük piklerin kaybolmasına, hem de absorpsiyon bandlarının ve dolayısıyla piklerin esas yerlerinden kaymasına neden olurlar.[75]

2.5.5.2. Kantitatif Analiz

Ultraviyole ve Görünür Bölge absorpsiyon spektroskopisi, kimyacıların kantitatif analizlerde en çok faydalandıkları tekniklerden biridir. Kantitatif analizde, ilk önce analizi yapılacak maddenin en iyi absorbans yaptığı dalga boyu bulunur ve bu dalga boyunda spektrumu alınır. Belirlenen dalga boyu sabit tutularak, artan derişimlerde hazırlanan çözeltilerin absorbansları okunur. Derişime karşı absorbans grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edilir. Sonra bilinmeyen maddenin derişimi kalibrasyon eğrisi yardımıyla bulunur ve ayrıca seçilen dalga boyu sabit tutularak absorbtivite katsayısı da belirlenmeye çalışılır.

2.6. Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, karmaşık karışımlarda bulunan birbirine yakın özellik gösteren bileşenlerin ayrılmasında, tanınmasında ve tayininde yaygın olarak kullanılan birçok farklı yöntemi içeren bir analitik yöntemler topluluğudur.[74,75,77-80] Diğer ayırma yöntemlerinden hiç birisi kromatografik yöntemler kadar etkili olmayıp uygulamada yaygın bir şekilde kullanılmazlar. Bu nedenle de kromatografik yöntemler daha çok araştırma amacıyla kullanılır. Bu sebeple çok geniş ve verimli bir alana sahiptir.

Bütün kromatografik ayırımlarda; numune gaz, sıvı veya süperkritik bir akışkan olan hareketli faz yardımı ile sabit bir faz üzerinden taşınır. Taşınma esnasında bileşenlerin farklı göç hızlarına bağlı olarak ayırma işlemi gerçekleşir. Kromatografik

ayırmada seçilen sabit faz ile taşıyıcı fazın birbiri ile karışmaması gerekmektedir. Bu bilgiler ışığında kromatografinin genel bir tanımını yapmaya çalışırsak; bir karışımdaki bileşenler sabit bir ortama ilave edilip bunların belirli bir hareketli faz yardımıyla yüzey adsorpsiyonu, dağılma, iyon değiştirme ve boyut eleme özelliklerine bağlı olarak, sabit ortamdan ayrılma yöntemlerine kromatografi denir.

2.6.1. Kromatografik Yöntemlerinin Sınıflandırılması

Kromatografi; sabit faz, hareketli faz ve ayırma şekillerine göre değişik şekillerde sınıflandırılırlar.[75,80] Bunlar:

1. Teorik Sınıflandırma

a- Dağılma Kromatografisi

b- Adsorpsiyon Kromatografisi

c- Boyut Eleme Kromatografisi

d- İyon Değişim Kromatografisi

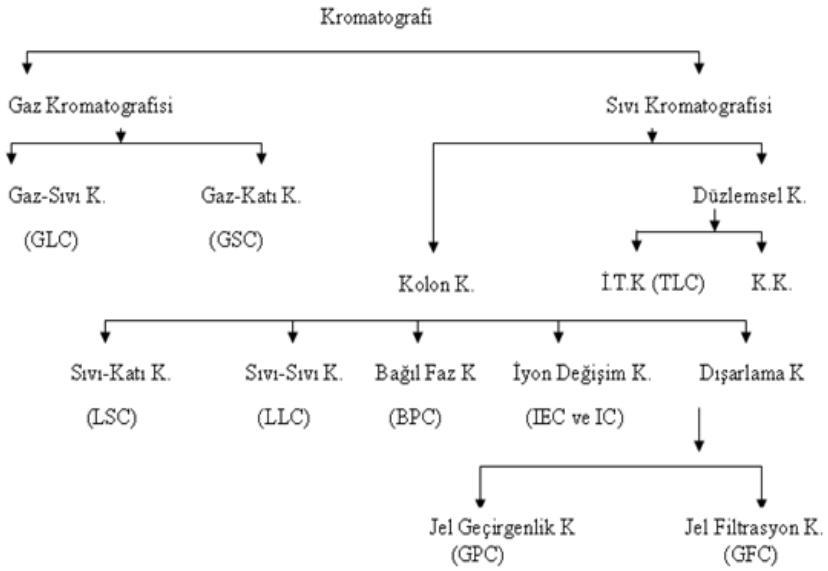
2. Pratik Sınıflandırma

a- Düzlemsel Kromatografi (Kağıt ve İnce Tabaka Kromatografisi)

b- Kolon Kromatografisi (Gaz, Sıvı ve Süper Akışkan Sıvı Kromatografisi)

3. Hareketli ve Sabit Fazlara Göre Sınıflandırma

Kromatografinin hareketli ve sabit fazlara göre sınıflandırması Şekil 2.7'de gösterilmektedir.



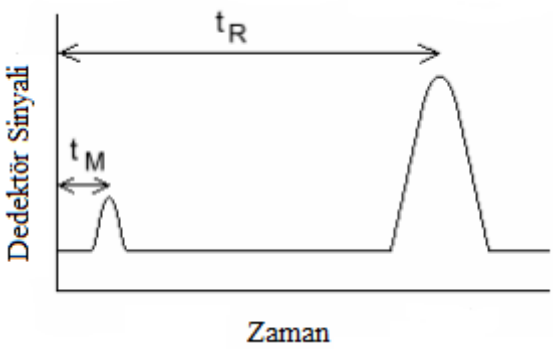
Şekil 2.7. Kromatografinin hareketli ve sabit faza göre sınıflandırılması

2.6.2. Kromatografinin Dayandığı Temel Olaylar

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

$A_{hareketli} \leftrightarrow A_{sabit}$ $K = C_{sabit}/C_{hareketli}$

Bu reaksiyon için denge sabiti *K*, partisyon oranı veya dağılma 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 da alıkonma zamanı denir ve t_R ile gösterilir (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. 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) 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.

Kromatografik yöntemlerde maddelerin ayrılmasında etkin olan dört ayrı mekanizma mevcuttur. Bunlar aşağıda özetlenmiştir.[74,75,78,80]

2.6.2.1. Dağılma Kromatografisi

Dört ayrı tip sıvı kromatografi içinde en yaygın kullanılanıdır. Dağılma çözünen maddenin hareketli faz ile katı faz üzerinde adsorplanmış sıvı fazdaki çözünürlüğüne veya hareketli faz gaz ise uçuculuğuna dayanan bir olaydır. Sıvı-sıvı ve bağlı-Sıvı faz kromatografi olmak üzere iki alt sınıfa ayrılabilir. Bu teknikler arasındaki fark, destek katısına durgun fazın tutunma farkına dayanır. Sıvı-sıvı kromatografisinde, sıvı faz sabit bir dolgu maddesinin yüzeyine fiziksel absorpsiyonla tutturulmuştur. Bağlı-sıvı faz kromatografisinde ise katı destek yüzeye bağlı organik sıvı türler kimyasal olarak tutturulmuştur. Dağılma kromatografisinde hareketli ve sabit fazların bağıl polarlıklarına bağlı olarak iki kısma ayrılmaktadır. Sabit faz oldukça polar ve hareketli fazda apolar ise buna normal-faz kromatografisi, sabit faz apolar (çoğu zaman bir hidrokarbon) hareketli faz ise nispeten polar (su, asetonitril, metanol) ise buna da Ters-faz kromatografisi denir.[74,75,80]

2.6.2.2. Adsorpsiyon Kromatografisi

Bir karışımdaki maddelerin katı destek üzerinde farklı kuvvetlerde tutunması prensibine göre birbirlerinden ayrıldıkları kromatografi olarak adlandırılır ve ilk

keşfedilen kromatografi çeşididir. Çözücü ve katı sabit fazın polarlıkları bir kolon boyunca veya bir yüzey boyunca çözünen maddenin hareketinin hızını tayin eder.[74,75,80]

2.6.2.3. İyon Değiştirme Kromatografisi

Bir katı maddenin yapısında bulunan iyonları, temasta bulunduğu çözelti içindeki aynı cinsten yüklü başka iyonlarla bir dengeye göre değiştirmesi özelliğine dayanan bir kromatografik yöntemdir. Bu amaçla kullanılan katı maddeler, çözelti ortamında hiç çözünmeyen büyük moleküllü doğal veya yapma maddelerdir. Organik iyon değiştiriciler (bunlara reçineler de denir) suda ve birçok organik çözücüde hiç çözünmeyen, yapılarında sayılamayacak kadar çok anyon ve katyon taşıyan büyük moleküllü maddelerdir. Bunlar hem anyon, hem katyon değiştirmede ve hatta selektif iyon değiştirmede kullanılır. İnorganik iyon değiştiricilerde en çok bilineni zeolitlerdir. Bunlar genel olarak; $Na_2\ Al_2\ Si_4\ O_{12}$ formülündedir.

İyon değiştirme kromatografisi, ilaçlar ve bunların metabolitleri, serumlar, gıda koruyucu maddeler, vitamin karışımları, şekerler ve farmasötik preparatlar gibi birçok farklı organik ve biyokimyasal sistemlere uygulanabilmektedir.[74,75,80]

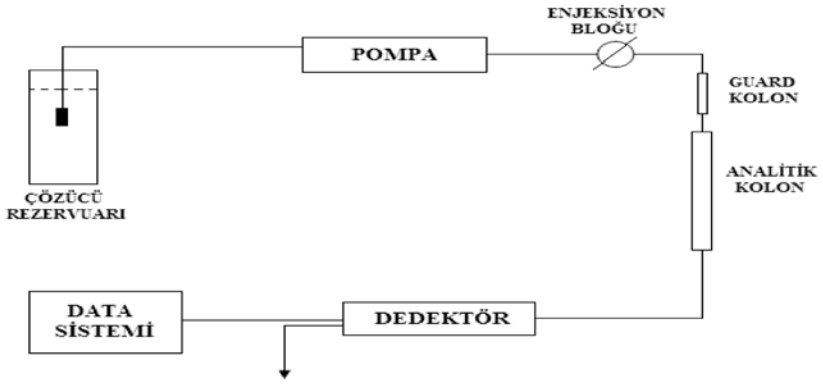
2.6.2.4. Boyut-Eleme Kromatografisi

Jel-geçirgenlik veya Jel-süzme kromatografisi adı da verilen boyut-eleme kromatografisi, özellikle yüksek mol kütleli maddelere uygulanabilen önemli bir tekniktir. Boyut-eleme kromatografisi için dolgu maddeleri, çözünen madde ve çözücü moleküllerinin içine difüzlenebileceği düzgün bir gözenek ağı içeren küçük boyutlu silis veya polimer taneciklerinden meydana gelmiştir. Gözenekler içinde küçük moleküller etkin bir şekilde yakalanabilmekte, büyük moleküllerde gözenek dışında kaldığından dolayı hareketli faz akımı ile kolondan kolaylıkla elüe edilebilmekte ve daha sonrada gözeneklerde tutulan küçük moleküllerde hareketli faz akımı ile yüzeyden kolaylıkla

uzaklaştırılabilmektedir. Gözenek içinde ortalama kalma süresi, analit molekülünün etkin büyüklüğüne bağlıdır.[74,75,80]

2.7. Yüksek Performans Sıvı Kromatografi (HPLC)

Küçük dolgu maddeleri ile doldurulup yüksek basınç altında bir kolonda yapılan kromatografi türlerine yüksek performans sıvı kromatografisi denir. Hareketli fazın sıvı olduğu, hareketli fazın sabit fazı içeren bir kolondan belirli bir basınç uygulanarak geçirildiği kromatografik sistemlerdir. Yüksek performans sıvı kromatografisi, dağılma kromatografisi, adsorbsiyon kromatografisi, iyon kromatografisi, jel kromatografisi olmak üzere dörde ayrılır.[75] Yüksek performans sıvı kromatografisi bütün analitik ayırma yöntemleri arasında en çok kullanılanıdır. Bunun nedeni bu yöntemin, hassas olması, sıcaklığa hassas olan maddelere bile uygulanabilmesi, doğruluk dereceleri ve kesinlikleri yüksek sonuçlar vermesidir. HPLC cihazı kendine özgü işlevlere sahip olan pompa, örnek giriş sistemi (enjeksiyon bloğu), kolon, dedektör ve kaydedici (data sistemi) olmak üzere beş ana bölümden oluşan bir sistemdir (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. HPLC cihazının şematik gösterimi

2.7.1. Pompalar

Pompalar sıkıca doldurulmuş kolon içinden hareketli fazın akışını sağlayan aletler olup sabit basınçlı ve sabit akışlı pompalar olmak üzere ikiye ayrılırlar. Sabit

basınçlı pompalarda; hareketli faz bir haznede bulunur ve bu hazne azot gibi eylemsiz bir gaz yardımıyla basınç altında tutulur, bu basınç hareketli fazın akışını sağlar. Sabit akışlı pompalar; Herhangi bir nedenle sistemin geçirgenliği bozulursa veya çözücünün vizkozitesi değişirse oluşan iç basınç değişikliği, motorla sağlanan basınç değişikliği ile kapatılır.[74,75,80]

HPLC cihazlarında, hareketli fazın kolon ve dedektör'den geçmesini sağlayan pompa sistemleri aşağıdaki özellikleri taşımalıdır.

1-6000 psi kadar basınç üretmek

2-Pulse-free çıkış vermek

3-0,1-10 mL/dk aralığında akış hızı düzenlemek

4-%0,5 ve daha iyi akış tekrarlanabilirliği sağlamak

5-Korozyona dayanıklı parçalara (paslanmaz çelik, teflon) sahip olmak

2.7.2. Örnek Giriş Sistemi (Enjeksiyon Bloğu)

Valf enjektörler ve şırınga enjektörler olmak üzere iki tip enjeksiyon vardır. Valf enjektörler, paslanmaz çelikten yapılmış boru şeklindeki bir üniteye bağlanan ve açılıp kapanabilen valflardan ibaret olup küçük bir boru ile kolon başına bağlanmıştır. Valf yükleme durumunda iken örnek loop içine verilir. Aynı anda hareketli faz, valf içindeki ayrı bir bölümden kolona akar. Valf, enjekt durumuna getirildiği zaman loop pompa ve kolon arasındaki akışa bağlanmış olur. Valf enjektörler dayanıklı olup az bakım ister bu yüzden rutin ilaç analizlerinde fazlaca kullanılır. Şırınga enjektörler, enjeksiyon aleti doğrudan doğruya kolon başına bağlanmıştır. Kolon başında 5-10 mm derinliğinde bir bölüm bulunmakta ve bu bölüme cam tanecikleri doldurmaktadır. Kolonun dolgu materyali ile bu cam tanecikler arasında paslanmaz çelikten yapılmış bir ağ vardır. Örnek, cam tanecik tabakası içine bir şırınga iğnesi ile verilir. Şırınga enjeksiyon ya pompayı kapatıp akışı durdurduktan sonra örneği vermek ve sonra tekrar pompayı

açarak hareketli fazın akışını sağlamak ya da akışı durdurmadan örneği kauçuk bir bölmeden (septum) kolona enjekte etmek suretiyle yürütülür. Valf enjektörlerden daha iyi kolon etkinliği verir.[74,75,80]

2.7.3. Kolonlar

Kolon sistemin en önemli kısmı olup paslanmaz çelikten ve plastikten yapılabilir. Analitik amaçlar için kullanılan kolonlar 5-150 cm uzunluğunda ve iç çapları 11-8 mm arasında değişmektedir. Dolgu maddesi taneciklerinin çapı ise 5-10 μm ile 35-125 μm arasında değişir ve sistemin performansını büyük ölçüde belirleyen niteliktir. Mikropartiküllü ve tamamen gözenekli dolgulara sahip kolonların en bilinenleri 10-30 cm uzunluktadır. Kısa kolonlarla çalışmak, retensiyon zamanını azaltacağından hızlı analizlerde tercih edilir. Son yıllarda üretilen yüksek performanslı kolonlar 2.1 mm iç çapında ve yaklaşık 100 mm ve üstü uzunluğunda olan dar çaplı kolonlardır. Preparatif çalışmalarda kullanılan kolonların çapları daha geniş olabilmektir. Ayırabildikleri maksimum madde miktarına göre kolonlar aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir. (Tablo.2.1)

Tablo 2.1. Ayırabildikleri maksimum madde miktarına göre kolonlar

Kolon Tipi	**Çapı (mm)**	**Uzunluk (cm)**	**Örnek miktarı (mg)**	**AkışHızı (mL/dk)**
Mikrobor Analitik	1-2	7-30	0.01	0.1
Standart Analitik	3-5	7-30	0.1	1.0
Preparatif	5-20	25-50	1.0	10.0

Yeni alınan kolonlar kullanılmaya başlamadan önce, üretici firmanın kolon için belirlediği çalışma parametreleri bulunmalıdır. Bu bilgiler, kolonun maksimum hangi basınca dayanıklı olduğu, hangi akış hızlarında ve pH aralığında çalışılması gerektiği gibi bilgilerdir ve çalışmalar sırasında, kolonun verimliliği ve ömrü için, bu bilgiler göz önüne alınmalıdır.

Çok pahalı analitik kolonların ömrünü uzatmak için iki tip koruyucu kolon kullanılabilir. Bu koruyucu kolonları ilki, pompa ile enjektör arasında yer almakta, dolgu materyali olarak silika içermekte ve ön kolon (precolumn) adını almaktadır. Hareketli fazın bu kolondan geçirilmesi, silika ile doyurulmasını sağlar ve böylece analitik kolon içindeki dolgu materyalinin hareketli fazdaki çözünürlüğü önlenmiş olur. Koruyucu kolonların ikincisi enjektör ile analitik kolon arasına yerleştirilen ve iç çapı analitik kolona eşit olan 2-10 cm uzunluğundaki koruyucu kolon (guard column) dur. Bu kolon, örnek içindeki parçacıkları ve safsızlıkları tutmak suretiyle bunların analitik kolondaki dolgu materyaline bağlanmasına engel olur.[74,75,80]

2.7.4. Dedektörler

Dedektörler, kolondan çıkan elüatın içindeki maddeleri saptamaya yarayan aletler olup temelde üniversal ve seçici olmak üzere ikiye ayrılmakta, seçici dedektörler arasında floresans dedektörler, ED dedektörler, UV-Görünür Bölge dedektörler, diod array dedektörler, üniversial dedektörlerdende reflaktif indeks dedektörleri uygulamada çok kullanılan dedektörlerdir. Üniversial dedektörler, kolondan çıkan elüatların hemen hemen tümüne karşı duyarlı olabilen dedektörlerdir. Seçici dedektörler ise elüe edilen bileşiklerin sadece bir kısmına karşı duyarlı ve bu nedenle daha yüksek bir hassasiyete sahip bulunan dedektörlerdir. Bu dedektörlerden başka kondüktivite, radyoaktivite, fotokondüktivite, İnfrared (IR) ve kütle dedektörleri gibi dedektörler bulunmaktadır.[74,75,80]

2.8. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisinin Uygulama Alanları

2.8.1. Kimyasal Ayırma

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

2.8.2. Saflaştırma

Hedef bir bileşiğin, diğer bileşiklerden ya da safsızlıklardan ayrılmasıdır. Bu kromatografi yapılırken, yeterli ayırmanın sağlanabilmesi için, ne tür bir bileşiğin saflaştırılması gerektiği göz önünde tutularak, uygun hareketli faz ve durgun faz seçimi yapılmalıdır. İstenilen bileşiğin saf olarak ekstrakte edilebilmesi için, bileşiklerin ve kontaminantların, kolondaki göç hareketleri yeterli derecede farklı olmalıdır.

2.8.3. Kalitatif Analiz

HPLC ile herhangi bir bileşiğin tanımlanması için, ilk önce uygun dedektör seçilmelidir. Bu dedektörler, kolondan ayrılan bileşikleri ortaya çıkarmak amaçlı olarak, sabit fazın posterior kısmına yerleştirilirler. Bu amaç için geliştirilmiş birçok çeşit dedektör mevcuttur. Bu tip ayırma yapılırken en çok dikkat edilmesi gereken nokta, bilinen bir örneğin verdiği pikin kesin olarak saptanmış olmasıdır. Ancak yine de kesin bir sonuç elde etmek için, birkaç yöntemin karşılaştırmalı olarak denenmesi gerekmektedir.

2.8.4. Kantitatif Analiz

HPLC ile miktar ölçümü, bilinmeyen bir derişimdeki bileşiğin, bilinen bir çözelti içinde tanımlanması yöntemine dayanır ve bu tip bir ölçüm için, bir seri standart çözeltinin, HPLC'ye enjekte edilmesi gerekir. Bilinen bu çözeltilerin kromatografileri sonucu elde edilen pikler, istenen bileşiğin derişiminin hesaplanmasında kullanılacaktır.

2.9. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (LC-MS)

LC-MS, sıvı kromatografisinin fiziksel ayrıma özellikleri ile kütle analizine olanak tanıyan MS teknolojisinin birleşmesiyle oluşan sistemdir. LC-MS birçok amaç için kullanılan yüksek seçiciliğe ve hassasiyete sahip çok güçlü bir analitik tekniktir. Genellikle belli bir karışım içerisinde istenen bir kimyasal maddenin miktarını belirlemek için kullanılır. Kütle spektroskopisinde single quadrapole, triple quadrapole, ion trap, TOF ve Q-TOF gibi farklı kütle analizörleri kullanılmaktadır. Uzun bir süre boyunca sıvı kromatografisi için sabit bir akış hızı sağlamak zordur. Elektrosprey iyonizasyon yöntemi bu zorluğu yenmiştir. Interface genel olarak elektrosprey kaynağı ya da bunun değişik bir versiyonu olan nanosprey kaynağıdır. Bunlara ek olarak atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon interface'i de kullanılmaktadır. Çok değişik depozisyon ve kurutma teknikleri de kullanılmaktadır. Bunların içinde en çok kullanılanı Maldı'dır. LC-MS-EI tekniği HPLC nano sistemi ile elektron iyonizasyon kütle spektroskopisinin birleşimidir.[75]

2.10. Kütle Spektrometrisi (MS)

Kütle Spektrometrisi (MS) uzun yıllardan beri kullanılmakta olup ilk kez bir kütle spektrumu 1898'de Wien tarafından elde edilmiştir. 1905'de ise Thompson kararlı izotopların bulunduğunu göstermek için yapmış olduğu deneyde farklı pozitif iyonların kütle/yük (m/z) oranına göre farklı parabolik yörünge kat ettiğini göstermiştir. Sıvı kromatografisi ve gaz kromatografisinde kütle spektrometrisinin dedektör olarak kullanılmasıyla daha hassas sonuçlar elde edilmekte ve çalışmada kullanılan bileşikler hakkında daha çok bilgiler elde edilmektedir. Tüm organik bileşiklerde ortak bir fiziksel özellik olan kütleye cevap verebilmesi en büyük özelliktir.

Kütle Spektrometrisini temel şekilde açıklarsak; gaz fazındaki numune, yüksek enerjili elektronlarla çarpışarak yüklü iyonlar haline dönüşmektedir. Hızlandırılan bu

iyonlar manyetik ve/veya elektrik alanında saptırılmaktadır. İyonların sapması kütlelerine, yüklerine ve hızlarına bağlıdır. Eğer yük, hız ve saptırıcı güç sabit ise, sapma ağır parçacıklarda az hafif parçacıklarda çok olacaktır.[76,81-84]

Kütle Spektrometrisi, evrensel, kütle bağımlı ve yıkıcı (parçalayan) bir dedektördür. Her numune için sinyal verir. Kütle Spektrometrisi şu kısımlardan oluşur.

1. Numune giriş sistemi
2. İyon kaynağı
3. Kütle analizörü
4. Dedektör

2.10.1. Numune Giriş Sistemi

Numune giriş sisteminin amacı çok az miktardaki numuneyi numune giriş sisteminin içine almaktır. Bu kısım vakum altında bulunur ve numune alma esnasında vakum düşmez. Numunenin cihaza alınması başlıca üç şekilde yapılır.[83,84]

a. Buharlaştırarak
b. Doğrudan
c. Kromatografi düzeneğinden geldiği gibi

2.10.2. İyon Kaynağı

Moleküllerin iyonlaştığı bölümdür. Bir molekül, atom veya iyondan bir elektron uzaklaşması olayına iyonizasyon denir. İyonlaştırma teknikleri; gaz, sıvı ve katı gibi maddenin farklı fiziksel durumuna ve maddenin ısısal kararlılığına bağlı olarak seçilir. Gazlar ve sıvılar için elektron, foton bombardımanlı iyonlaştırma; katılar için ise termal, lazer desorpsiyon, atom bombardımanı, elektrik boşalım ve alan desorpsiyon iyonlaşma uygundur. Günümüzde en çok kullanılan iyonlaştırma teknikleri elektron impact, kimyasal ve elektrosprey iyonizasyondur.[82-84]

Elektronik Impact (EI) kısaca analit molekülünün enerjili elektronlarla bombardıman edildiği iyonizasyon yöntemi olarak tanımlanır. Sıcak bir flamandan çıkan elektronlar bölme boyunca odaklanacaklar ve 70 eV'luk bir potansiyele sahip bir elektrot tarafından çekileceklerdir. Böylece her bir elektron 70 eV'luk bir enerji kazanır ve ortama giren numune ile çarpışarak bir seri parçalanma tepkimeleri oluşur. Moleküldeki bağların kırılması tüm pozitif ve negatif iyonların oluşmasını sağlayabilecektir. Çoğu organik molekül için pozitif iyon oluşumu enerji açısından daha çok tercih edilir. Elektronun sahip olduğu enerji bütün bağları kırmak için yeterli enerjidir. 70 eV'luk enerjinin kullanılması kararlı, tekrarlanabilir ve moleküle özgü kütle spektrumlarının oluşmasını sağlar. Elektron bombardımanı ile oluşan iyonların bağıl büyüklükleri, iyonize edici elektronların enerjileri ve iyonizasyonun oluştuğu sıcaklığa bağlıdır. Elektrosprey iyonizasyon (ESI) elektrik alanda iyonlaşmış bir sprey oluşturup çözücü buharlaştırılır.[82-84] Kimyasal İyonizasyon (CI) genellikle düz zincirli alkan, alken veya alkoller gibi homolog bileşikler EI ile kararlı moleküler iyonlara sahip pozitif tanımlama yapılamayacak kadar küçük bağıl çokluğa sahiptirler. CI'nın esası iyon-molekül tepkimelerine dayanır. Yüksek enerjili iyonlar çarpıştıkları moleküle ya proton aktarırlar ya da ondan hidrür ve elektron koparırlar. Kimyasal iyonlaşmalı kütle spektrometrisinde (CI-MS), iyon kaynağına reaktif gaz verilerek yüksek basınç elde edilmektedir. Reaktif gaz numune molekülleri ile iç etkileşime girecek reaktif iyonlarını oluşturmak üzere elektron demeti tarafından iyonize edilmektedir. Ortamdaki yüksek basıncın etkisiyle reaktif iyon ile numune iç etkileşime girer. EI'ya göre enerji daha düşüktür.[83-85]

2.10.3. Kütle Analizörü

İyon kaynağından çıkan iyonlaşma ürünleri analizöre yönlendirilir. Analizör, kütle/yük (m/z) oranlarına göre maddelerin ayırımının sağlandığı bölümdür.[83-86]

Bugün en çok kullanılan kütle analizörleri şunlardır;

a. Manyetik sektörlü kütle analizörü

b. Uçuş zamanlı kütle analizörü

c. Kuadropol kütle analizörü.

2.10.4. Dedektör

Kütle analizörlerinden geçen iyonlar elektron çoğaltıcı dedektöre ulaşır. Elektron çoğaltıcıda çarpışmadan dolayı oluşan akım önce analog voltaja, sonra da dijital sinyale dönüşür. En çok kullanılan dedektörler dizi dinot elektron çoğaltıcı ve devamlı dinot elektron çoğaltıcılardır. Bunlar sinyali 10^7 değerine kadar artırabilirler. Bu da fentoamper gibi çok düşük iyon akımlarının kaydedilmesini sağlar.

MS'den milisaniye aralıklarla gelen verilerin hızla kaydedilmesi ve depolanması gereklidir ki bu da bir bilgisayarla kolayca sağlanabilmektedir. LC-MS ve GC-MS sistemleri, ara bağlantı ve veri toplama basamaklarındaki problemlerin çözülmesinden sonra, daha yaygın kullanılmaya başlanmıştır. Bunlardan başka aletin kalibrasyonun otomatik yapılıp, sonuçlarının alınabilmesi, analiz koşullarının kolayca girilmesi, aletin kontrolünün yapılıp verilerin alınabilmesi, analiz sonrası veri değerlendirmelerinin yapılabilmesini bilgisayar sağlamaktadır.[84-86]

Kütle spektrometrisi ile analizlerde 3 tip iyon tarama şekli vardır:

1.Toplam iyon taraması: Bir analiz sırasında ayrım yapmadan tüm iyonların 10-800 akb (atomik kütle birimi) aralığında taratılması ile gerçekleştirilir.

2. Seçilen iyon taraması: Aranılan bileşik için en karakteristik olan, kararlı ve çokluğu fazla olan m/z değerleri seçilip, taratılır. Seçici iyon taramasında seçilen iyonların tarama süresi (dwell time) analizci tarafından seçilir.

3.Tek iyon taraması: Tek iyon taratılır. Çok hassastır, ancak kesin tanımlama yapılamaz.

2.10.5. Vakum Sistemleri

MS cihazı 10^6-10^8 torr civarında çalışmaktadır. MS'de vakum sisteminin olmasını gerektiren nedenler şöyle sıralanabilir:[84,86]

1. Flaman yüksek basınçtaki oksijen altında ısıtılırsa yükseltgenip yanabilir.

2. Basınç arttıkça kütledeki çoğaltıcı, kaynak ve analizörde yüksek voltaj kırılmaları olabilir.

3. Kütle spektrometrisinin iyon kaynağında bulunan gaz, spektral geri zemine katılabilir (örn; su, azot ve oksijenden gelebilecek m/z:18, 28 ve 32).

4. Kütle spektrometrisinde düşük basınç sağlamanın en önemli nedeni, analiz edilen iyonlar arasındaki çarpışmayı en aza indirmektir. Çünkü iyon sürekli diğer moleküller ve yüzeyler ile çarpışıyorsa, iyonları belli bir yolda yönlendirmek için kullanılan güçler yararsız olacaktır.

5.Yüksek basınç ile analizörün, iyon kaynağının ve odakların (slit) kirlenmesi artmaktadır.

6.Yüksek basınç ile spektrum almak ve yorumlamak zordur.

7. Basınç artarken iyon kaynağına doğru olan elektron akımı düzeltmeleri zorlaşır.

8. Vakum sistemi analizörün işlemini gerçekleştirmesi için gereken moleküler ortalama yolu sağlar.

Bu nedenlerden dolayı MS için vakum sistemleri çok önemlidir. MS de cihaz içindeki basıncı 10^6 torr civarında tutmak için değişik pompalar kullanılır. Bunlardan en çok kullanılanları pompalar, turbo moleküler ve difüzyon pompalarıdır.

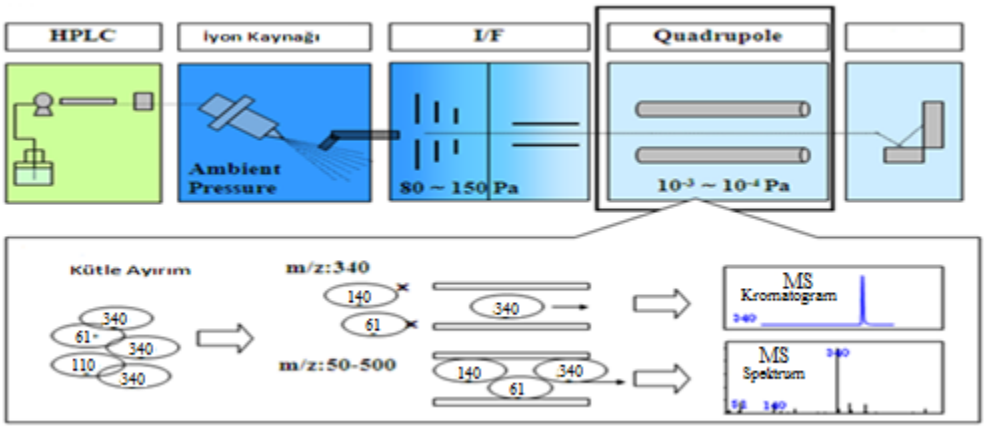
2.11. LC-MS'in Uygulama Alanları

LC-MS ilaç ile ilgili olan çalışmalarda oldukça sık başvurulan bir yöntemdir. Bundan dolayı farmakokinetik ve biyoanaliz çalışmalarında yaygın bir kullanımı vardır.

Bu çalışmalarda en kısa sürede ilacın kanda veya organlarda tayinini yapmak çok önemlidir. MS hassasiyetinin, analiz süresinin ve seçiciliğinin UV'ye göre çok daha üst düzeyde olması dolayısıyla tercih edilmektedir. MS kullanımındaki en büyük avantajlardan biri de MS-MS'in kullanılmasıdır. Dedektör sadece belli bir iyonun ölçülmesine programlanabilir. İşlem genelde bir seçim işlemidir fakat göründüğünden daha komplekstir. Ölçülen değer operatör tarafından seçilen molekül parçalarıdır. LC-MS tekniğinde eğer hiçbir iyon interferesi yoksa yöntem çok hızlıdır. MS-MS yöntemi ile analiz süresi bir dakika ve altına düşürülebilmiştir. Bu analiz süresi HPLC'nin ortalama 10 dakikalık analiz süresiyle karşılaştırıldığında oldukça hızlı görünmektedir.[82-86]

LC-MS proteomiks çalışmalarda da kullanılarak karışım içindeki maddeler teşhis ve tayin edilir. Denatürasyonu sonucunda çıkan ürünlerin kütle spektroskopisi fingerprint (parmak izi) ya da tandem MS-MS yöntemi ile her bir peptidin sırasının belirlenmesi gibi uygulamalar vardır. LC MS/MS yöntemi yüksek çözünürlükteki kütle spektroskopilerinde dahi çakışan molekülerin analizinde kullanılır. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezinde ya da HPLC güçlü katyon değiştiricisinde ayrımı yapıldıktan sonra biyolojik sıvılar ve serumlardaki 1000 kadar proteinin analizi LC MS/MS ile yapılabilir.[82-87]

LC-MS cihazları ilaç geliştirmenin birçok aşamasında kullanılmaktadır. Örneğin Peptit Mapping, Glikoprotein Mapping, doğal ürün dereplikasyonu, bioafinite taraması, In vivo ilaç araştırmaları, metabolik stabilite araştırması, metabolit tayini, safsızlık tayini, bozulan ürünlerin tayini, kantitatif araştırmalar ve kalite kontrol çalışmalarında kullanılmaktadır.[85,87]



Şekil 2.10. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi cihazının şematik gösterimi

2.12. Analitik Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)

Geçerlilik testi (validasyon), bir analiz yönteminin performans özelliklerini istenilen analitik uygulamada, belirlenen gerekli koşullarda sağladığını göstermek için yapılan işlemlerin tümüdür. Analitik yöntemin kabul edilebilirliğini göstermek için kullanılan analitik parametreler:

1. Doğruluk; 2. Kesinlik; 3. Doğrusallık; 4. Duyarlılık; 5. Stabilite; 6. Seçicilik/ Belirleyicilik; 7. Sağlamlık; 8. Geri Kazanım.

İn vivo ortamlardaki miktar tayininde; farmakokinetik parametrelerin doğru kesin bir şekilde hesaplanması, biyoyararlanım ve atılım çalışmalarında ilaç ve metabolitinin plazma ve idrar gibi fizyolojik sıvılardaki derişiminin doğru bir şekilde saptanmasına bağlıdır. İyi bir şekilde tanımlanmış ve tam olarak valide edilmiş analitik yöntem kullanılması güvenilir sonuç almak için önemlidir.

2.12.1. Doğruluk ve Kesinlik

Doğruluk, elde edilen değerin gerçek değere olan yakınlığı olarak ifade edilir ve bağıl hata (%BH) ile verilir. Kesinlik, tekrarlanan deney sonuçlarının birbirine olan yakınlığını ifade eder ve standart sapma (SS), bağıl standart sapma (%BSS), varyans

veya varyans katsayısı ile verilir. Kesinlik; tekrarlanabilirlik, ara kesinlik ve yenilenebilirlik olarak üç basamakta düşünülebilir. Tekrarlanabilirlik, aynı çalışma şartlarında kısa bir zaman aralığından sonra kesinlik değerinin göstergesidir. Ara kesinlik, laboratuvarlar arasındaki farkları (gün değişikliği, analizci değişikliği, cihaz değişikliği gibi) ifade eder. Yenilenebilirlik: laboratuvarlar arasındaki kesinliği ifade eder (laboratuvarlar arasında yapılan işbirlikli çalışmalar, yöntem standardizasyonu gibi).

2.12.2. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi

En düşük derişimden en yüksek derişime doğru bir seri çözelti hazırlanarak derişime karşı cihaz cevabının (absaobans, pik alanı vb. gibi) grafiğe geçirilmesi ile elde edilen eğriye kalibrasyon eğrisi denir. Ağırlıklı ve ağırlıksız en küçük kareler yöntemi uygulanarak kalibrasyon eğrisinin regresyon analizi yapılarak standart eğrinin doğru denklemi ve regresyon katsayısı elde edilir. Kalibrasyon doğrusunun eğimi, doğrusallığın matematiksel bir ölçüsüdür**.** Cihazın cevabı ve numunenin derişimi arasındaki ilişki kullanılarak elde edilen kalibrasyon eğrisinde, belirli bir aralıkta numune derişimi ile doğru orantılı olduğu aralık doğrusallık olarak ifade edilir.

2.12.3. Duyarlılık

Analizi yapılan maddenin (analit) değişimine karşı ölçüm sinyalinde meydana gelen değişikliktir. Bir başka deyişle, analitik yöntemin düşük derişimleri saptayabilme yeteneğidir.

Gözlenebilme Sınırı (Limit of Dedection, LOD): Belirlenen deney koşulları altında, örnek içinde kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikte ölçülebilen en düşük madde derişimidir.

Miktar Tayin Alt Sınırı (Limit of Quantitation, **LOQ):** Belirlenen deney koşullarında saptanabilen en düşük derişimdir. Bir sınır değeri olup, madde derişiminin

belirli bir derişim altında veya üstünde olup olmadığı saptanır. Bu sınır, saptama sınırında hazırlanmış uygun sayıda örneğin analizi ile gerçekleşir.

2.12.4. Stabilite

Stabilite, belirli bir matriks içindeki bir analitin, amaçlanan saklama ısısında, dondurma veya çözme dönemlerinin etkisinde, oda ısısında veya diğer çevresel faktörlerin etkisinde bozunmadan kalma süresi olarak tanımlanır. Ayrıca, normal laboratuvar şartlarında nem, sıcaklık, ışık ve hava gibi etkilere saf analit ve/veya analit çözeltisi maruz bırakılarak hangi sürede bozunmadan kaldığının laboratuvar testleri ile incelenmesidir.

2.12.5. Sağlamlık

Bir analitik yöntemin sağlamlığı, yöntem parametrelerindeki küçük ancak önemli değişikliklerde etkilenmeden kalma kapasitesinin bir ölçüsüdür ve yöntemin normal kullanımı sırasında güvenilirliğinin bir göstergesidir. Yöntem geliştirme sırasında akış, pH, ısı, kolon gibi elde edilen sonuçlar üzerine etki gösteren bu gibi parametrelerin sonuçlar üzerine etki göstermeyen değişikliklerin aralığı da sağlamlık aralığı olarak isimlendirilmektedir**.**

2.12.6. Geri Kazanım

Analitik geri kazanım bir numune ortamından ekstrakte edilen ve numune ortamına ilave edilen analitin miktarından elde edilen değerin standart çalışma çözeltilerinden elde edilen değerler ile kıyaslanması sonucunda belirlenen değerdir. Biyolojik ortamlarda ise analiz sonucunda bulunan değerin gerçek değere oranı olarak ifade edilir.

2.12.7. Seçicilik-Belirleyicilik

Olması beklenen bileşenler varlığında incelenenin tam olarak değerlendirilebilmesi yeteneğidir. Bunlar kirlilikler, parçalanma ürünleri, diğer interferanslar olabilir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kimyasal Maddeler ve Cam Malzemeler

Olanzapin (Sigma-Aldrich); Olaxinn (Generica İlaç); Ollafax (Dr.F.Frik İlaç)

Ozaprin (Ali Raif İlaç); Rexapin (Abdi İbrahim İlaç); Zyprexa (Lilly İlaç)

Asetonitril (HPLC saflık, Merck, Almanya)

Metanol (Merck, Almanya)

Etanol (Sigma-Aldrich)

Diizopropil eter (Merck, Almanya)

Dietil eter (Merck, Almanya)

Trifloro Asetik Asit (TFA) (Merck, Almanya)

Formik asit (Merck, Almanya)

İrbesartan (Sigma-Aldrich)

Deiyonize Su

Çalışma sırasında kullanılan otomatik pipetler (10-100 µL, 100-1000 µL ve 1000-5000 µL), kuvartz küvet (USA), oto örnekleyici vial kitleri (Agilent, 1.8 mL screw cap), beher, erlen, mezür, deney tüpü, balon joje Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Laboratuvarından, biyolojik matriks olarak kullanılan sağlıklı insan plazması Atatürk Üniversitesi Yakutiye Araştırma Hastanesi Kan Bankasından temin edildi.

3.2. Cihazlar

Santrifüj (Hettich, RPM x 100)

Ultrasonik banyo (Elma LC 30)

Terazi (Metler Toledo)

Karıştırıcı (Vorteks, IKA)

Su banyosu (GFL)

Etüv (Memmert)

Vakum pompası (Phenomenex)

Spektrofotometre sistemi (Thermospectronic, HeαIOS β)

HPLC Sistemi; (Agilent Technologies 1200 Series)

-Degazer (Agilent Technologies)

-Pompa (Agilent Technologies)

-Kolon (C_{18}, 5 μm, 250 x 4.6 mm, USA)

-Oto örnekleyici (Agilent Technologies)

-UV-dedektör (Agilent 1200 serisi)

-MS-dedektör (Agilent 6120 Quadrupole)

3.3. Yöntemler

3.3.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri Yöntem Şartları

UV-Görünür Bölge Spektrofotometri çalışmasında uygulanan yöntem şartları Tablo 3.1'de verildi.

Tablo 3.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yöntem şartları

Yöntem Şartları	Olanzapin
Data modu	Absorbans
Start Lambda(λ) (nm)	242
Stop Lambda (λ) (nm)	320
Lambda (λ) Değişimi (nm)	325
Tarama Hızı	600 nm/dk
Bant Genişliği	2 nm
Düzgünlük	Yüksek

3.3.2. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) Yöntem Şartları

HPLC çalışmasında, uygulanan yöntem şartları Tablo 3.2'de verildi.

Tablo 3.2. HPLC yöntem şartları

	Standart/Plazma
Kolon	C_{18} (5 µm, 150 x 4.6 mm)
Dedektör	UV
Dalga boyu	272 nm
Hareketli faz	Metanol/Asetonitril/Su (%0.1'lik TFA içeren) (40:30:30, h/h/h)
Kolon sıcaklığı	-
Kolon akış hızı	1mL/dk
Enjeksiyon hacmi	10 µL

3.3.3. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (LC-MS) Yöntem Şartları

LC-MS çalışmasında, uygulanan yöntem şartları Tablo 3.3'de verildi.

Tablo 3.3. LC-MS yöntem şartları

Sabit Faz	Agilent C_{18} kolon (5 µm, 150 x 4.6 mm)
Hareketli faz	Su (%0.1'lik formik asit içeren)-Asetonitril (20:80, h/h)
Akış hızı	1 mL/dk
Kolon sıcaklığı	25 ° C
Enjeksiyon hacmi	10 µL
Analiz süresi	5 dk
İyonizasyon	Elektron sprey pozitif
Moleküler iyon (Olanzapin)	313.2
Moleküler iyon (Irbesartan)	429.2
Kurutma gaz akış hızı	10 l/dk
Püskürtme basıncı	40 psi
Kurutma gaz sıcaklığı	300 °C
Parçalama voltajı	60 eV
Kurutma sıcaklığı	250 °C
Kapiler voltaj	4000 V
Korana current	5 µa
Şarj voltaj	2000 V

3.4. Olanzapinin Plazmadan Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon Prosesi

- İstenen derişimdeki çözeltiyi elde etmek için eklenen standart olanzapin çözeltisinin etanolü azot gazı altında uçuruldu.
- 0.5 mL boş insan plazması eklendi 2 dakika karıştırıldı.
- 5 mL dietil eter-diizopropil eter (50:50, h/h) karışımı eklendi.
- Tüplerin ağzı kapatılarak 5 dakika karıştırıldı.
- 4000 rpm de 7 dakika santrifüjlendi.
- Organik faz alındı, oda koşullarında azot gazı altında uçuruldu.

Elde edilen kalıntı:

HPLC ve LC-MS Yöntemi;

- 1 mL metanolde çözüldü
- 30 saniye karıştırıldı
- 45 µm gözenek büyüklüğüne sahip filtreden süzüldü
- Otomatik pipetle viallere koyuldu
- 10 µL HPLC ve LC-MS sistemlerine enjekte edildi

UV-Görünür Bölge Spektrofotometri Yöntemi;

- 5 mL etanolde çözüldü
- 30 saniye karıştırıldı
- Kuvartz küvetlere koyuldu ve ölçümler alındı

3.5. Tablet Çözeltilerinin Hazırlanması

Olanzapin etkin maddesini içeren beş farklı farmasötik preparat (rexapin, olaxinn, ozaprin, ollafax ve zyprexa tablet) Piyasa Eczanelerinden temin edildi. Herbir ilaçtan sekiz tablet tartılarak tek bir tablet kütlesi belirlendi. 8 tablet iyice öğütülerek toz haline getirildi. İyice karıştırılarak homojenize edildi. Örnekleme yöntemine göre bir

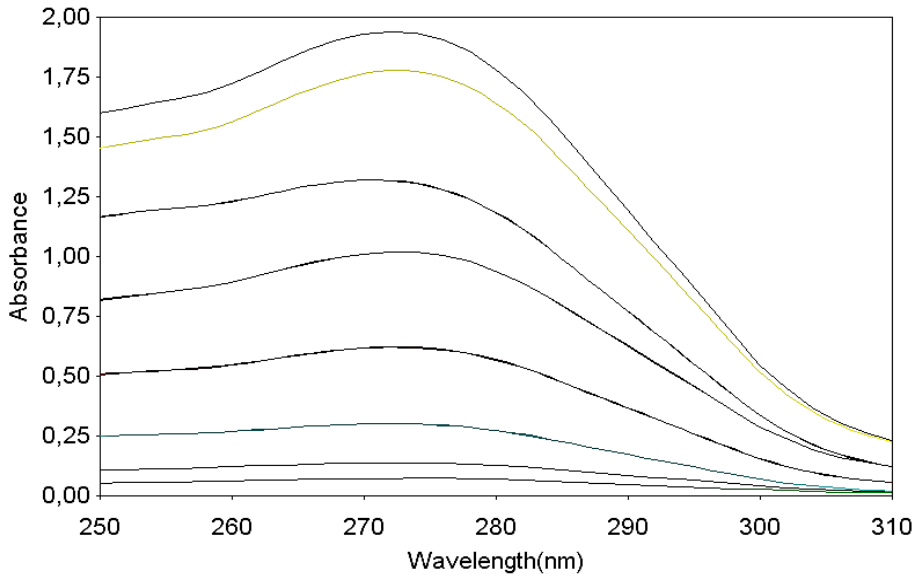
tabletin kütlesinde tartılarak balon jojeye konuldu ve etanolde çözülerek 100 µg/mL derişiminde tablet stok çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden uygun derişimlerde tablet çalışma çözeltileri hazırlandı.

4. BULGULAR

4.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri Yöntemi

4.1.1. Stok, Standart ve Kalite kontrol Çözeltilerin Hazırlanması

10 mg olanzapin tartıldıktan sonra 100 mL etanolde çözülerek 100 µg/mL'lik stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltiden 1, 2, 5, 8, 10, 20, 25 ve 30 µg/mL derişimlerinde standart çalışma çözeltileri ve 3, 15 ve 27 µg/mL derişimlerde kalite kontrol çözeltileri hazırlandı. Standart çalışma çözeltilerinin UV-Görünür Bölge spektrofotometre de 272 nm dalga boyunda absorbansları alındı ve Şekil 4.1'de verildi.



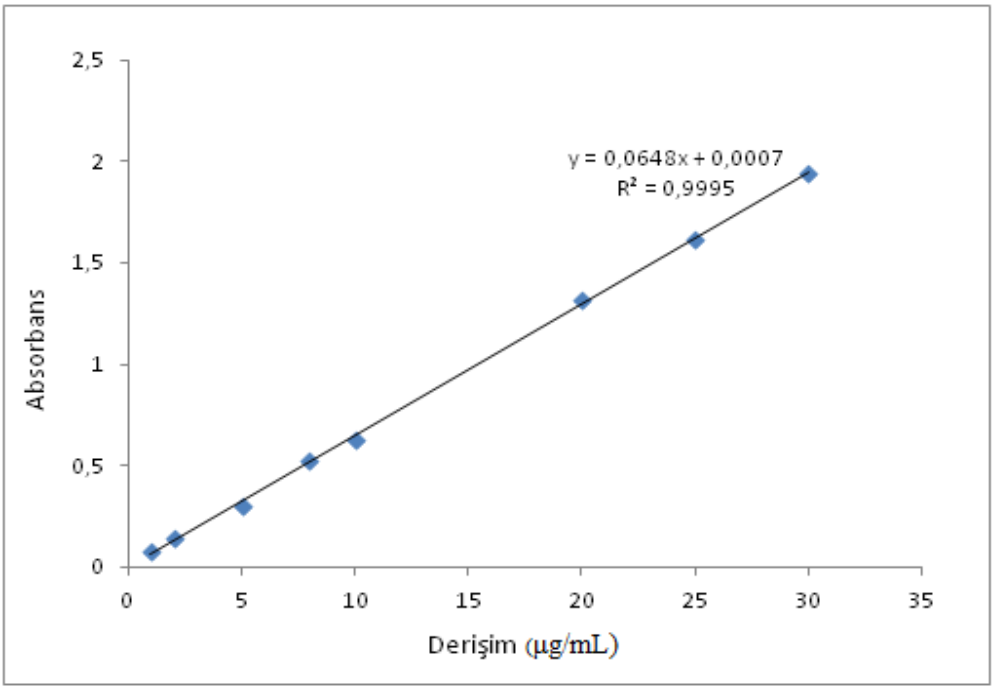
Şekil 4.1. 1, 2, 5, 8, 10, 20, 25 ve 30 µg/mL derişimdeki standart olanzapin çözeltilerinin UV-Görünür Bölge Spektrofotometri absorbsiyon spektrumları

4.1.2. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)

4.1.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi

UV-Görünür Bölge Spektrofotometride 1-30 µg/mL derişim aralığında hazırlanan bir seri olanzapin çözeltilerinin spektrumları alındıktan sonra olanzapin çözeltilerinin derişimlerine karşı okunan absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile

kalibrasyon eğrisi elde edildi ve Şekil 4.2'de verildi. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yöntemiyle elde edilen kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.1'de verildi.



Şekil 4.2. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminde standart çözeltilerin kalibrasyon eğrisi

Tablo 4.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz sonuçları

[a]ÇA (µg/mL)	[a]LR	Sa	Sb	R
1-30	A_{272nm}=0.0648x+0.0007	0.000266	0.005298	0.9997

ÇA: çalışma aralığı, [a]:6 analiz sonucunun ortalaması, LR: lineer regrasyon, Sa: regrasyon eğrisindeki kaymanın standart sapması, Sb: regrasyon eğrisindeki eğimin standart sapması, R: korelasyon katsayısı

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

Olanzapinin standart çözeltileri ile elde edilen kalibrasyon eğrisinin en küçük derişiminden daha küçük derişimlere inilerek bir seri standart çözeltiler hazırlandı ve altı kez absorbansları okundu. Okunan değerlerin standart sapma ve bağıl standart sapmaları (%BSS) belirlendi. Yüzde bağıl standart sapma değeri %20'den küçük olan derişim LOD değeri ve %10'dan küçük olan derişim ise LOQ değeri olarak belirlendi. Yöntemin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.33 μg/mL ve 1.00 μg/mL olarak belirlendi.

4.1.2.3. Doğruluk ve Kesinlik

Yöntemin doğruluğu, kesinliği güniçi ve günler arası değişkenlerle belirlendi. Kalibrasyon eğrisi içine düşen üç farklı derişimde (3, 15 ve 27 μg/mL) hazırlanan olanzapin kalite kontrol çözeltileri güniçi (aynı yöntem ve aynı labaratuvar şartlarında 1 günde 6 kez) ve günler arası (aynı yöntemle 6 farklı günde 6 kez) miktar tayinleri yapıldı. Elde edilen deney sonuçlarının ortalaması, standart sapması, bağıl standart sapması ve bağıl hatası belirlendi. Doğruluk bağıl hatayla [%BH= (bulunan değer-eklenen değer)/eklenen değer) x100] ve kesinlik bağıl standart sapma ile [%BSS = (SS/bulunan değer) x 100] verildi (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminin doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)

λ (nm)	Eklenen (μg/mL)	Güniçi			Günler arası		
		Bulunan±SS (μg/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS	Bulunan±SS (μg/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS
272	3	3.11±0.018	3.721	0.578	3.09±0.054	2.864	1.756
	15	15.06±0.054	0.374	0.360	15.07±0.041	0.442	0.271
	27	26.74±0.024	0.970	0.088	26.90±0.023	-0.379	0.087

λ: dalga boyu, SS: Standart sapma, BH: Bağıl hata, BSS: Bağıl standart sapma

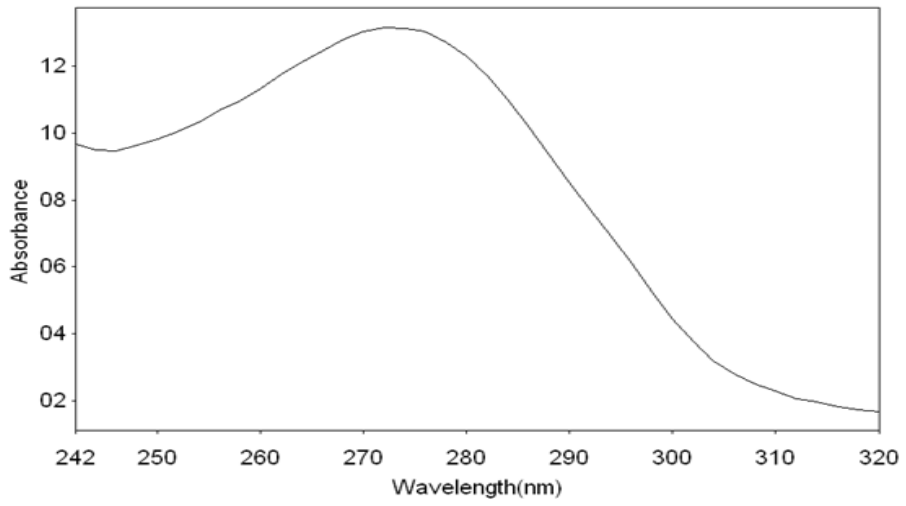
4.1.2.4. Analitik Geri Kazanım

UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yöntemi ile farmasötik preparatlarda olanzapinin geri kazanım çalışması standart ekleme yöntemine göre yapıldı. Olanzapin etkin maddesi içeren rexapin, olaxinn, ozaprin, ollafax ve zyprexa ticari ilaçlardan 2 µg/mL derişimde Bölüm 3.4.'de belirtildiği şekilde hazırlandı. 2 µg/mL derişimdeki ilaç çözeltilerinin UV-Görünür Bölge spektrumları alındı. Bu çözeltiler üzerine 1, 13 ve 25 µg/mL derişimlerde olanzapin standart çalışma çözeltileri eklendi ve UV Spektrumları alındı. Elde edilen sonuçların ortalaması, standart sapması ve bağıl standart sapması belirlendi. Analitik geri kazanım [%GK= (toplam çözeltinin bulunan değeri-ilaç çözeltisinin değeri) / eklenen standart çözeltisinin değeri)x 100]. Çalışma sonucunda elde edilen, standart sapma, bağıl standart sapma ve yüzde geri kazanım (%GK) değerleri Tablo 4.3'de ve 2 µg/mL derişimindeki beş farklı ilaç çözeltisine ait UV spektrumları ise Şekil 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 ve 4.7'de verildi.

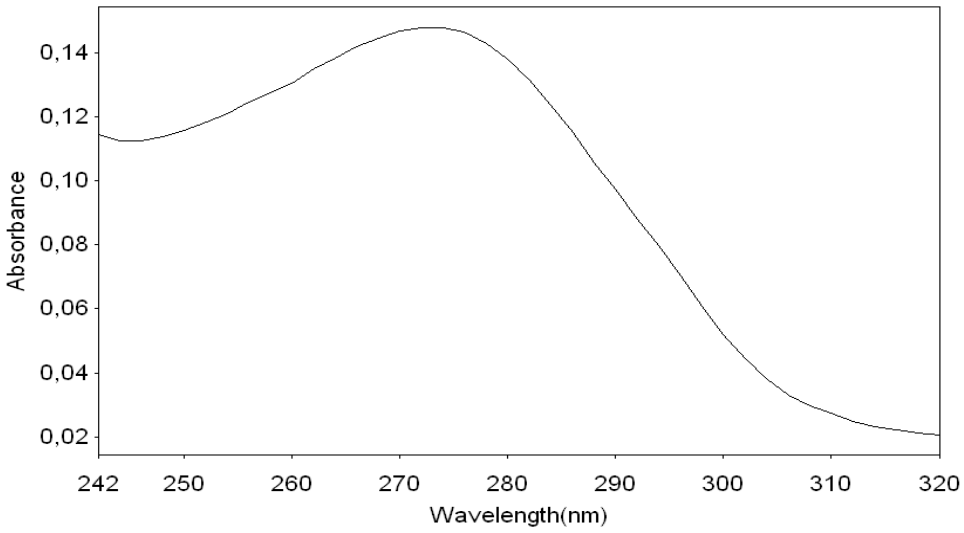
Tablo 4.3. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminin analitik geri kazanım değerleri

Farmasötik Preparat	Tablet çözeltisi (µg/mL)	Eklenen olanzapin (µg/mL)	Ortalama±SS (µg/mL)	%GK	%BSS
Olaxinn (10 mg/tablet)	2	1	3.03±0.06	103.0	1.98
		13	14.99±0.21	99.9	1.40
		25	26.84±0.31	99.4	1.16
Ollafax (10 mg/tablet)	2	1	3.01±0.07	101.0	2.33
		13	15.16±0.09	101.2	0.59
		25	27.6±0.40	102.4	1.45
Ozaprin (10 mg/tablet)	2	1	2.99±0.08	99.0	2.68
		13	15.24±0.07	101.9	0.46
		25	27.15±0.48	100.6	1.76
Rexapin (10 mg/tablet)	2	1	3.02±0.14	102.0	4.64
		13	14.91±0.04	99.3	0.27
		25	27.39±0.38	101.6	1.39
Zyprexa (10 mg/tablet)	2	1	2.99±0.09	99.0	3.01
		13	15.04±0.12	100.3	0.80
		25	27.4±0.73	101.6	2.66

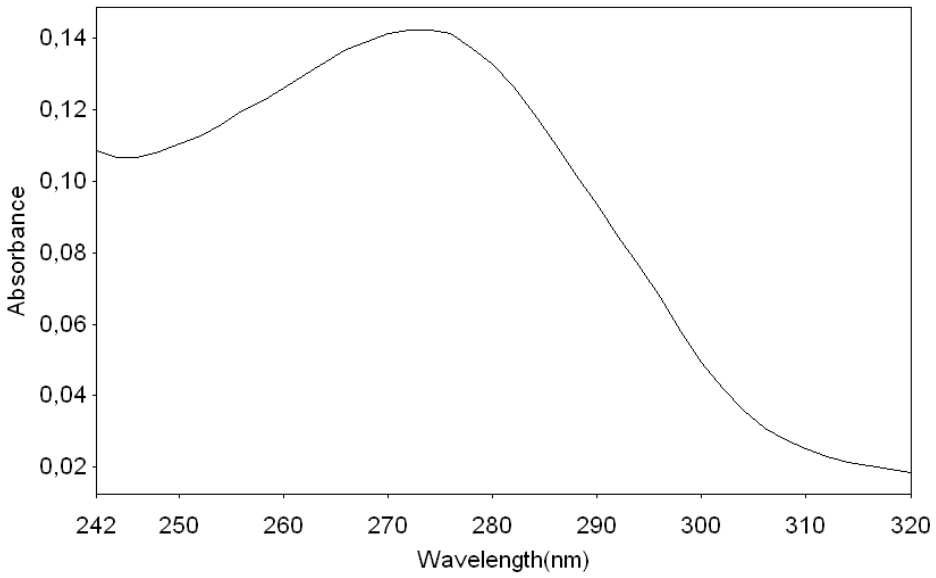
SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma, GK: Geri kazanım



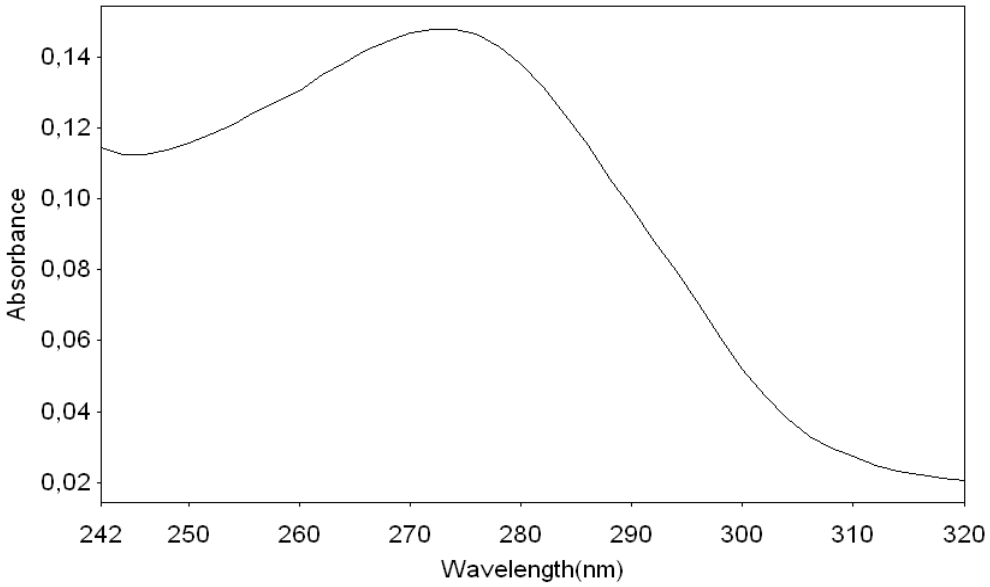
Şekil 4.3. Olaxinn tablet çözeltisinin (2+13 µg/mL) UV spektrumu



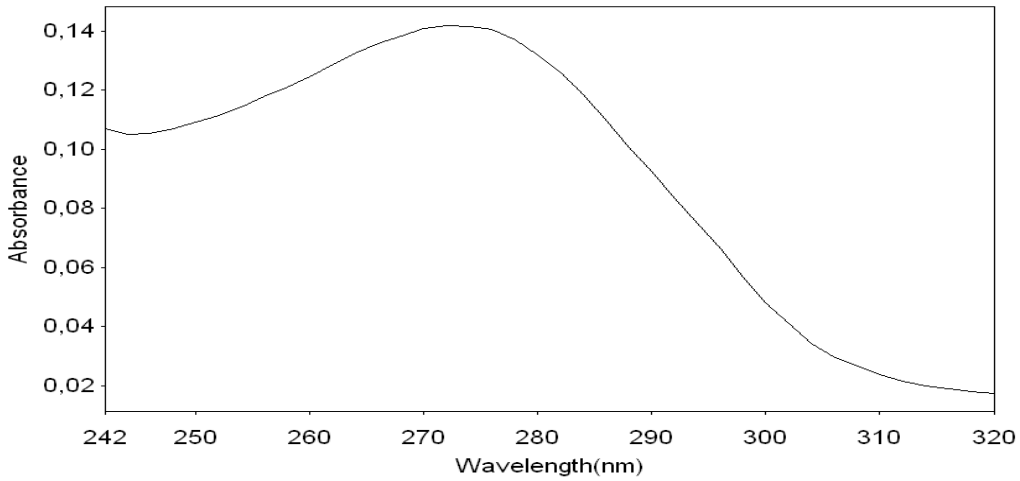
Şekil 4.4. Ollafax tablet çözeltisinin (2+13 µg/mL) UV spektrumu



Şekil 4.5. Ozaprin tablet çözeltisinin (2+13 µg/mL) UV spektrumu



Şekil 4.6. Rexapin tablet çözeltisinin (2+13 µg/mL) UV spektrumu



Şekil 4.7. Zyprexa tablet çözeltisinin (2+13 µg/mL) UV spektrumu

4.1.2.5. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

10 mg/tablet olanzapin içeren rexapin, olaxinn, ozaprin, ollafax ve zyprexa tablet çözeltileri Bölüm 3.4.'de belirtildiği şekilde hazırlandı. Kalibrasyon eğrisi sınırlarında tayin edilecek şekilde çözeltiler seyreltildi ve UV-Görünür Bölge spektrofotometri

yöntemi ile miktar tayinleri yapıldı. Elde edilen absorbans değerleri standart olanzapin çözelti değerleri ile karşılaştırılarak %GK ve %BSS değerleri Tablo 4.4'de verildi.

Tablo 4.4. Olanzapin içeren rexapin, olaxinn, ozaprin, ollafax ve zyprexa tabletlerinin miktar tayini (n=6)

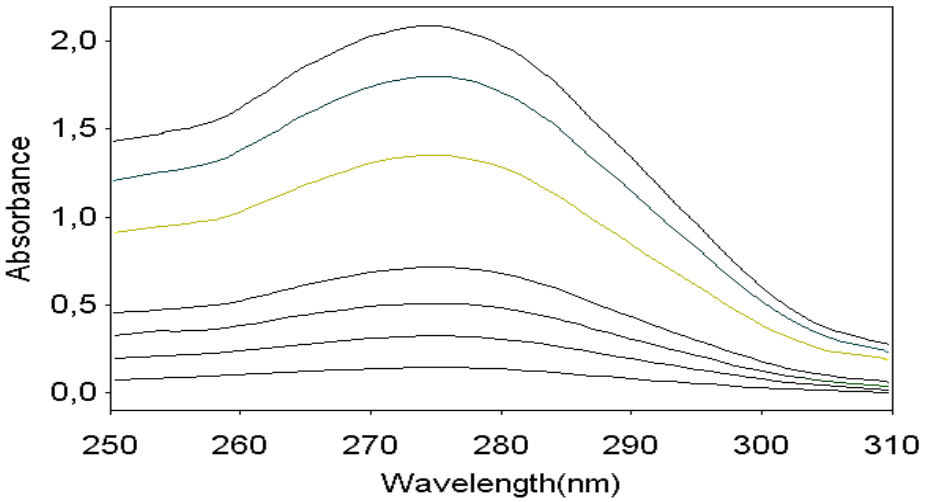
Ticari Preparat	Ölçülen (mg)	Bulunan±SS (mg)	%GK	%BSS	Güven Aralığı
Olaxinn (10 mg/tablet)	10	9.90±0.05	99.0	0.47	98.87-99.13
Ollafax (10 mg/tablet)	10	10.21±0.11	102.1	1.10	101.82-102.38
Ozaprin (10 mg/tablet)	10	9.75±0.13	97.5	1.32	97.22-97.78
Rexapin (10 mg/tablet)	10	9.75±0.03	97.5	0.35	97.42-97.58
Zyprexa (10 mg/tablet)	10	10.06±0.03	100.6	0.26	100.52-100.68

SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma, GK: Geri kazanım

4.2. Plazma Çalışması

4.2.1. Plazma Çözeltilerinin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan plazma Atatürk Üniversitesi Yakutiye Araştırma Hastanesi kan merkezinden temin edildi. Plazma kalibrasyon eğrisini elde edebileceğimiz 2, 5, 8, 10, 20, 25 ve 30 μg/mL'lik derişimlerdeki olanzapin standart çalışma çözeltilerinden uygun miktarlarda boş plazmanın 0.5 mL'sine spayk edildi, karıştırıldı ve Bölüm 3.4'de belirtildiği şekilde ekstraksiyonları yapıldı. Her bir çözeltinin UV-Görünür Bölge spektrumları alındı ve Şekil 4.8'de verildi.

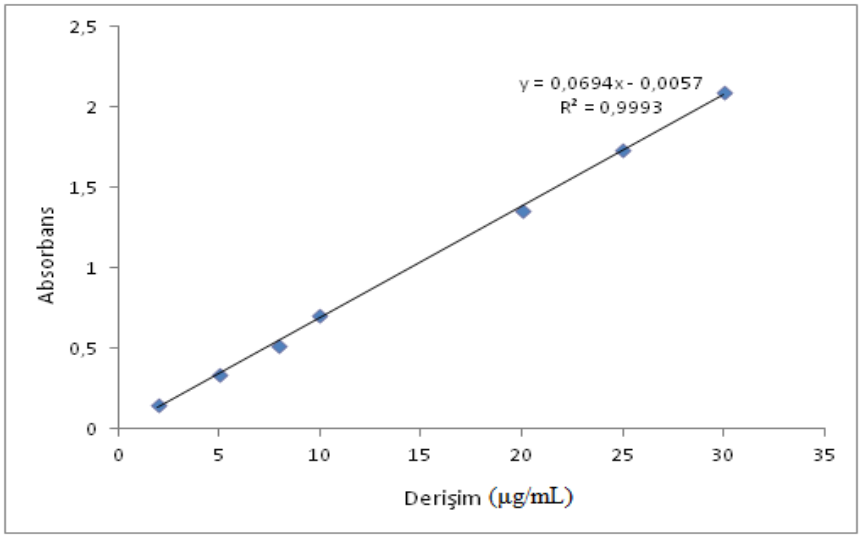


Şekil 4.8. 2, 5, 8, 10, 20, 25 ve 30 µg/mL derişimdeki olanzapin plazma çözeltilerinin UV spektrumları

4.2.2. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)

4.2.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi

2-30 µg/mL derişim aralığındaki olanzapin plazma çözeltilerinin derişimlerine karşı 272 nm'deki UV spektrumlarından elde edilen absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon eğrisi elde edildi ve ortalama kalibrasyon eğrisi Şekil 4.9'da verildi.



Şekil 4.9. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminde plazma çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi

UV-Görünür Bölge spektrofotometri yönteminde plazma çözeltilerinin kalibrasyon eğrisinin regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.5'de verildi.

Tablo 4.5. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yöntemi, plazma çözeltilerinin kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz sonuçları

Matriks	[a]ÇA (μg/mL)	[a] LR	Sa	Sb	R
plazma	2-30	A_{272nm}=0.0694x-0.0057	0.00025	0.00216	0.9996

ÇA: çalışma aralığı, [a]:6 analiz sonucunun ortalaması, LR: lineer regrasyon, Sa: regrasyon eğrisindeki kaymanın standart sapması, Sb: regrasyon eğrisindeki eğimin standart sapması, R: korelasyon katsayısı

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

Olanzapin plazma çözeltileri ile elde edilen kalibrasyon eğrisinin en küçük derişiminden daha küçük derişimlerde bir seri plazma çözeltileri hazırlandı ve altı kez absorbansları okundu. Okunan değerlerin %BSS'ları belirlendi. Yüzde bağıl standart sapma değeri %20'den küçük olan derişim LOD değeri ve %10'dan küçük olan derişim ise LOQ değeri olarak belirlendi. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.7 μg/mL ve 2 μg/mL olarak belirlendi.

4.2.2.3. Doğruluk ve Kesinlik

Yöntemin doğruluğu ve kesinliği güniçi ve günler arası değişkenlerle belirlendi. Kalibrasyon eğrisi içine düşen üç farklı derişimde (3, 15 ve 27 μg/mL) hazırlanan olanzapin plazma kalite kontrol çözeltileri güniçi (aynı yöntem ve aynı labaratuvar şartlarında 1 günde 6 kez) ve günler arası (aynı yöntemle 6 farklı günde 6 kez) deneyleri yapıldı. Elde edilen deney sonuçlarının ortalaması, standart sapması, bağıl standart sapması ve bağıl hatası belirlendi. Doğruluk bağıl hatayla [%BH= (bulunan değer-

eklenen değer)/eklenen değer) x100] ve kesinlik bağıl standart sapma ile [%BSS= (SS/bulunan değer) x 100] verildi (Tablo 4.6).

4.2.2.4. Geri Kazanım

Plazmadan geri kazanım çalışmasında, üç farklı derişimde olanzapin kalite kontrol çözeltileri (3, 15 ve 27 µg/mL) plazmaya spayk edildi, karıştırıldı ve Bölüm 3.4'de verilen ekstraksiyon yöntemi ile ekstraksiyonları yapıldı. Ekstraksiyon sonrasında elde edilen çözeltilerin güniçi ve günler arası altı kez analizleri yapıldı ve ortalama değerleri ile standart sapması belirlendi. Plazmadan elde edilen değerler standart çalışma çözeltilerinden elde edilen değerlere oranlanarak yüzde geri kazanım değerleri belirlendi ve yüzde geri kazanım değerleri Tablo 4.6'da verildi.

Tablo 4.6. Plazma çalışmasında, UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminin doğruluk, kesinlik ve geri kazanım değerleri (n=6)

Eklenen (µg/mL)	Güniçi				Günler arası			
	Bulunan±SS (µg/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS	% GK	Bulunan±SS (µg/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik % BSS	% GK
3	2.98±0.02	-0.67	0.67	99.3	2.96±0.02	-1.33	0.68	98.7
15	14.91±0.03	-0.60	0.20	99.4	14.59±0.09	-2.73	0.62	97.3
27	25.95±0.04	-3.88	0.15	96.1	26.06±0.08	-3.48	0.31	96.5

SS: standart sapma, BH: Bağıl hata, BSS: Bağıl standart sapma, GK: Geri kazanım

4.3. Kromatografik Yöntemler

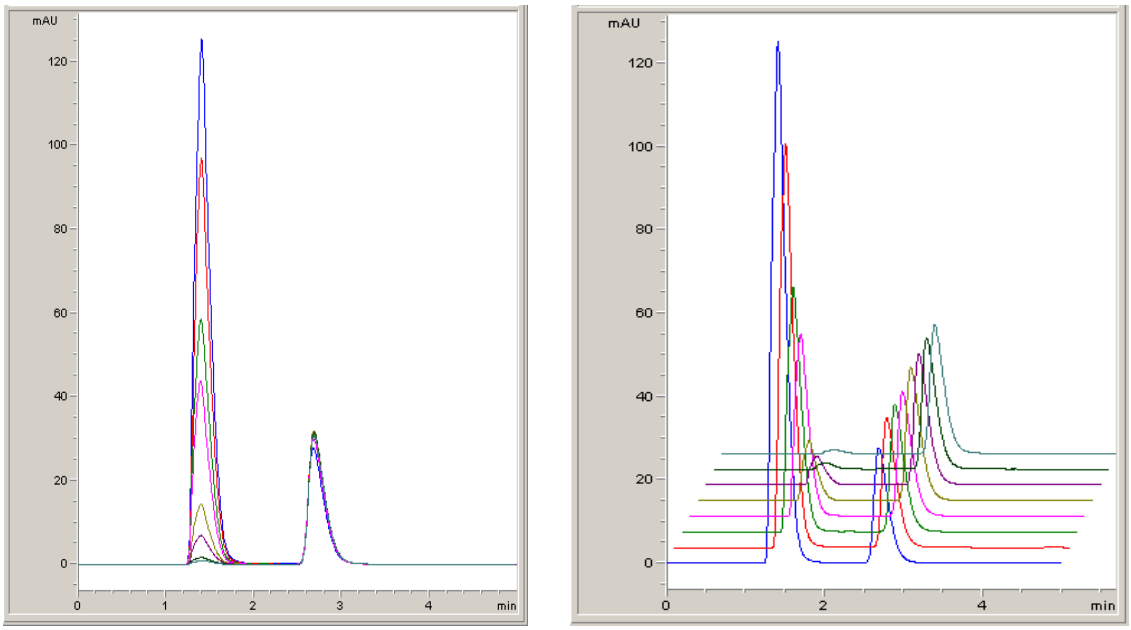
4.3.1. HPLC Yöntemi

4.3.1.1. Standart Çalışma ve Kalite Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması

100 µg/mL'lik olanzapin stok çözeltisinden etanol ile 0.25, 0.5, 2.5, 5, 15, 20, 30 ve 40 µg/mL derişimlerde standart çalışma çözeltileri ve 1, 10 ve 25 µg/mL derişimlerde ise kalite kontrol çözeltileri hazırlandı. Çalışmada internal standart (IS)

olarak irbesartan kullanıldı. İrbesartan (molekül ağırlığı: 428,5 g/mol) standartından 100 µg/mL derişimde stok çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden ise deneylerde kullanılmak üzere 5 µg/mL derişimde irbesartan standart çalışma çözeltisi hazırlandı.

Olanzapin standart çalışma çözeltilerine 5 µg/mL derişimde IS (irbesartan) çözeltisi eklendi ve elde edilen çözeltiler HPLC sistemine enjekte edilerek kromatogramları alındı ve Şekil 4.10'da verildi.



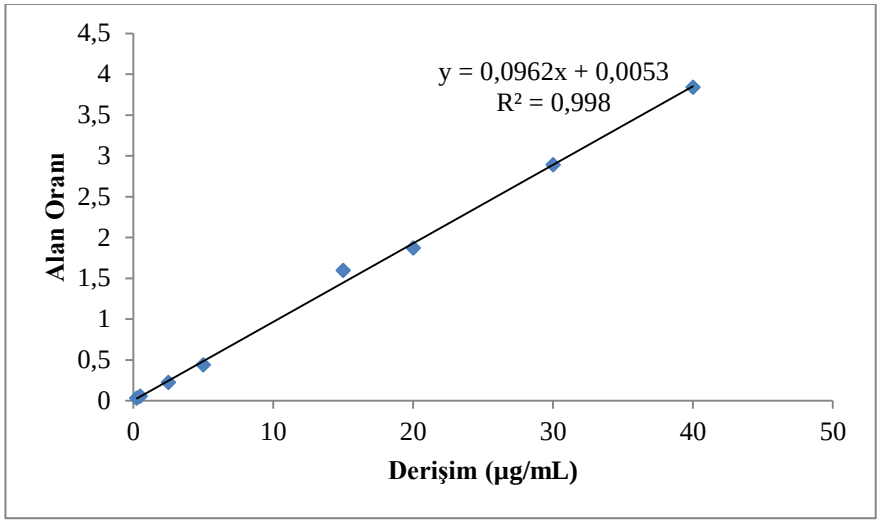
Şekil 4.10. 5 µg/mL derişimde IS içeren 0.25, 0.5, 2.5, 5, 15, 20, 30 ve 40 µg/mL derişimlerdeki olanzapin standart çalışma çözeltilerinin HPLC kromatogramları

4.3.1.2. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)

4.3.1.3. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi

5 µg/mL derişimde IS içeren 0.25-40 µg/mL derişim aralığında hazırlanan olanzapin standart çalışma çözeltilerinin HPLC kromatogramları alındı bu kromatogramlarda olanzapin ve IS pik alanları belirlendi. Olanzapin çözeltilerinin

derişiminine karşı, pik alan oranlarının (IS pik alanı/ olanzapin pik alanı) grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon eğrisi elde edildi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. HPLC yöntemi ile elde edilen olanzapin standart çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi

HPLC yöntemiyle elde edilen kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.7'de verildi.

Tablo 4.7. HPLC yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz sonuçları

[a]ÇA (µg/mL)	λ(nm)	[a]LR	Sa	Sb	R
0.25-40	272	y=0.0962x +0.0053	0.00424	0.00061	0.9990

ÇA: çalışma aralığı, [a]:6 analiz sonucunun ortalaması, LR: lineer regrasyon, Sa: regrasyon eğrisindeki kaymanın standart sapması, Sb: regrasyon eğrisindeki eğimin standart sapması, R: korelasyon katsayısı

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

HPLC yönteminin LOD ve LOQ değerleri ICH (International Conference on Harmonisation) klavuzlarında verildiği şekilde belirlendi. İlk olarak olanzapin standart çalışma çözeltilerinin kromatogramları alındı. Bu kromatogramlardan sinyal/gürültü (S/G) oranları tespit edilerek S/G oranı 3 olan değer gözlenebilme sınırı (LOD) ve S/G oranı 8 olan değerde miktar tayin alt sınırı (LOQ) olarak belirlendi. HPLC yönteminin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.08 µg/mL ve 0.25 µg/mL olarak tespit edildi.

4.3.1.5. Doğruluk ve Kesinlik

Yöntemin doğruluğu ve kesinliği güniçi ve günlerarası değişkenlerle belirlendi. Hazırlanan üç farklı derişimdeki kalite kontrol çözeltilerinin güniçi (aynı yöntem ve aynı labaratuvar şartlarında 1 günde 6 kez) ve günler arası (aynı yöntemle 6 farklı günde 6 kez) analizleri gerçekleştirildi. Analiz sonuçlarının ortalaması, standart sapması, bağıl standart sapması ve bağıl hata değerleri elde edildi. Doğruluk bağıl hatayla [%BH= (bulunan değer-eklenen değer)/eklenen değer) x100] ve kesinlik bağıl standart sapma ile [%BSS = (SS/bulunan değer) x 100] verildi (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. HPLC yönteminin doğruluk ve kesinlik değerleri

Eklenen (µg/mL)	Güniçi			Günler arası		
	Bulunan±SS (µg/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS	Bulunan±SS (µg/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS
1	0.98±0.003	-3.00	0.31	0.96±0.002	-4.00	0.21
10	9.53±0.006	-4.70	0.06	9.54±0.014	-4.60	0.15
25	25.08±0.010	0.32	0.04	25.11±0.017	0.44	0.07

SS: standart sapma, BH: Bağıl hata, BSS: Bağıl standart sapma

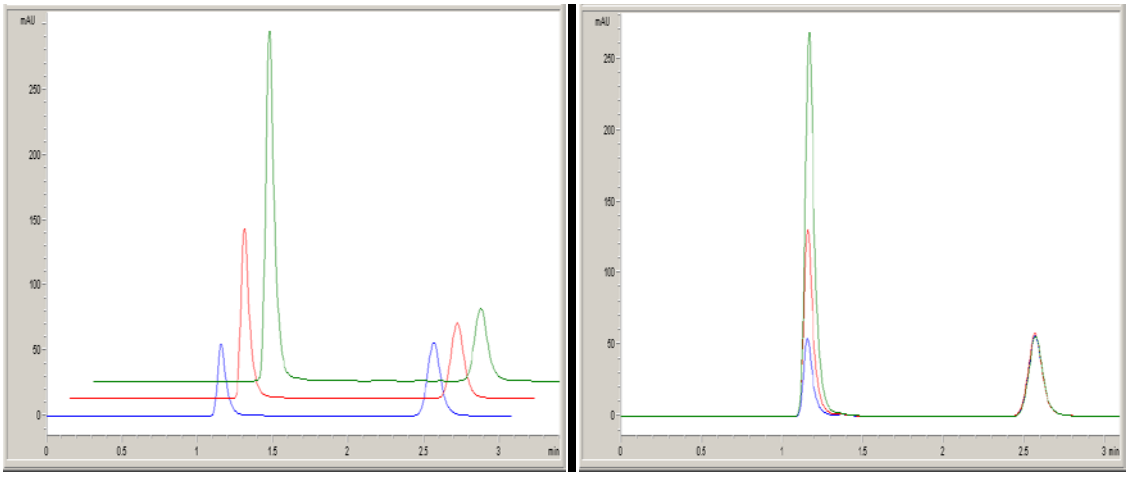
4.3.1.6. Analitik Geri Kazanım

HPLC yöntemi ile farmasötik preparatlarda olanzapinin analitik geri kazanım çalışması standart ekleme yöntemine göre yapıldı. Olanzapin etkin maddesi içeren rexapin, olaxinn, ozaprin, ollafax ve zyprexa ticari ilaçlardan 5 µg/mL derişimde Bölüm 3.4.'de belirtildiği şekilde hazırlandı ve hazırlanan ilaç çözeltilerine 5 µg/mL derişimde IS eklendi. Bu çözeltiler HPLC sistemine enjekte edildi, kromatogramları alındı ve pik alan oranları belirlendi. Tablet çözeltilerine 1, 10 ve 25 µg/mL derişimlerde olanzapin standart çalışma çözeltileri eklendi, HPLC sistemine enjekte edilerek kromatogramları alındı ve pik alan oranları belirlendi. Elde edilen sonuçların ortalaması, standart sapması ve bağıl standart sapması belirlendi. Analitik geri kazanım (% GK= (toplam çözeltide bulunan değeri-ilaç çözeltisinin bulunan değeri) / eklenen standart çözeltisinin değeri)x 100]. Çalışma sonucunda elde edilen, standart sapma, bağıl standart sapma ve yüzde geri kazanım (%GK) değerleri Tablo 4.9'da ve 5 farklı ilaç çözeltisine ait 5+1, 5+10 ve 5+25 µg/mL ilaç+standart olanzapin çözeltilerinin ve 5 µg/mL IS çözeltisinin HPLC kromatogramları Şekil 4.12, 4.13, 4.14, 4.15 ve 4.16'da, 5 µg/mL derişimde beş farklı tablet çözeltilerinin HPLC kromatogramları ise Şekil 4.17'de verildi.

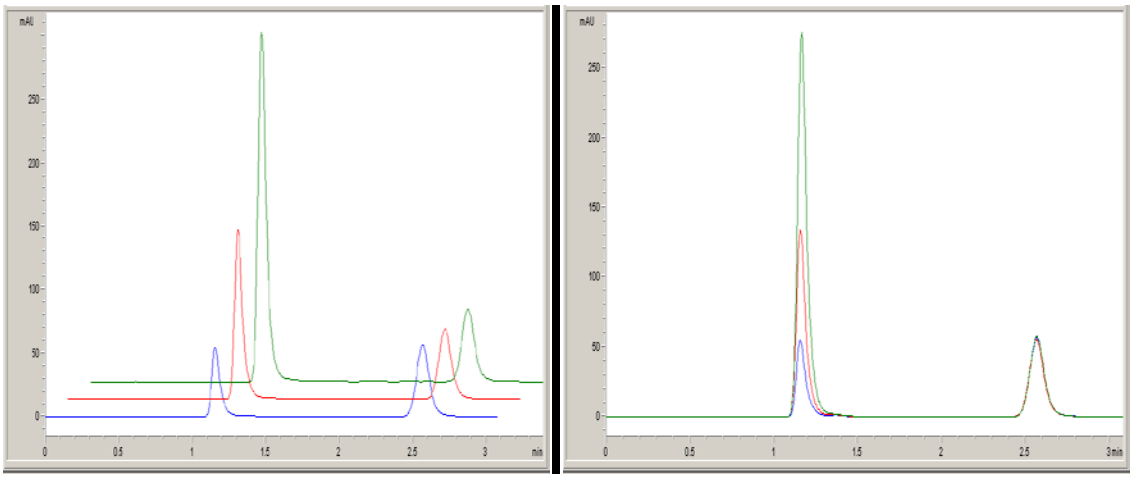
Tablo 4.9. HPLC yönteminin farmasötik preparatlarda analitik geri kazanım değerleri

Tablet	Eklenen Standart Çözeltiler (µg/mL)	Tablet Çözeltisi (µg/mL)	Bulunan±SS (µg/mL)	% GK	% BSS
olaxinn	1	5	6.03±0.01	103.0	0.17
	10		15.11±0.10	101.1	0.66
	25		30.46±0.11	101.8	0.36
ollafax	1	5	6.02±0.06	102.0	1.00
	10		15.04±0.26	100.4	1.73
	25		30.07±0.11	100.3	0.37
ozaprin	1	5	6.08±0.04	108.0	0.66
	10		15.09±0.09	100.9	0.60
	25		30.08±0.12	100.3	0.40
rexapin	1	5	5.99±0.08	99.0	1.34
	10		14.97±0.23	99.7	1.54
	25		29.99±0.12	99.9	0.40
zyprexa	1	5	6.01±0.09	101.0	1.50
	10		14.98±0.21	99.8	1.42
	25		30.01±0.07	100.0	0.23

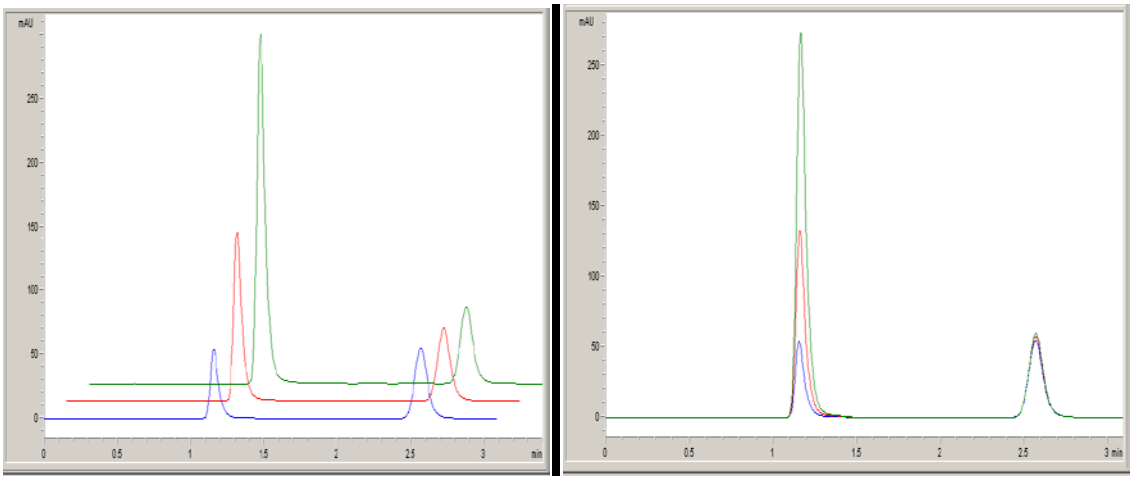
SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma, GK: Geri Kazanım



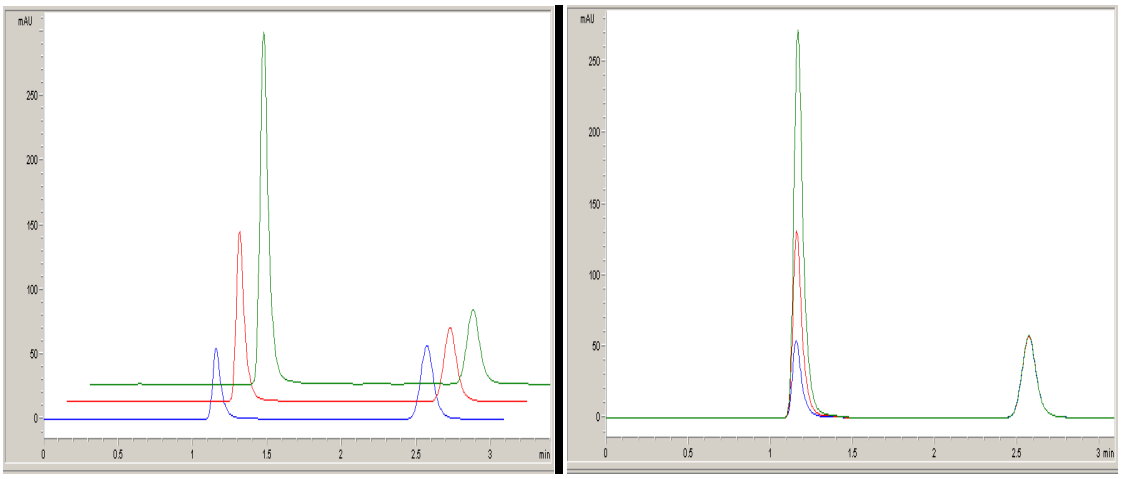
Şekil 4.12. 5 µg/mL IS içeren rexapin tabletin 5+1, 5+10 ve 5+25 µg/mL (ilaç+standart olanzapin çözeltisi) derişimdeki çözeltilerin HPLC kromatogramı



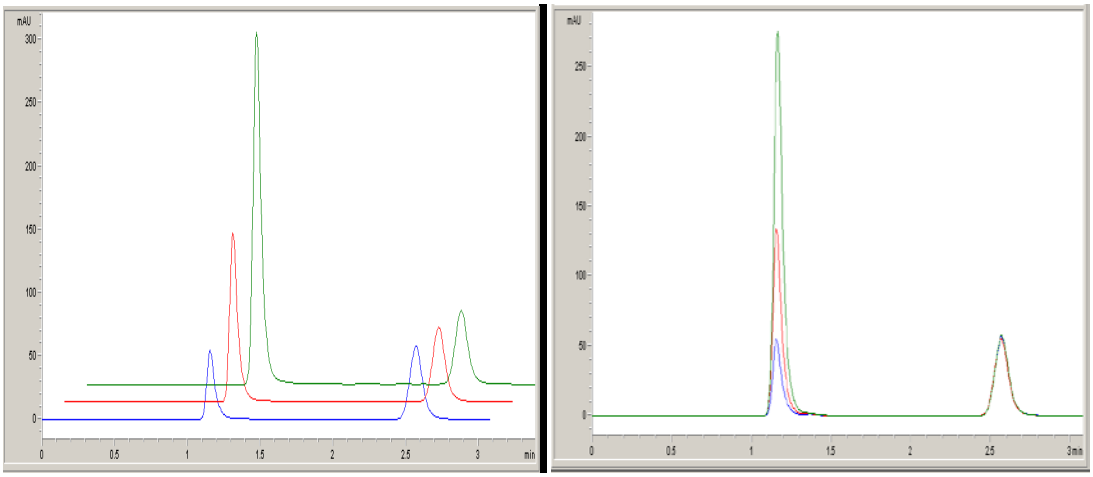
Şekil 4.13. 5 µg/mL IS içeren olaxinn tabletin 5+1, 5+10 ve 5+25 µg/mL (ilaç+standart olanzapin çözeltisi) derişimindeki çözeltilerin HPLC kromatogramı



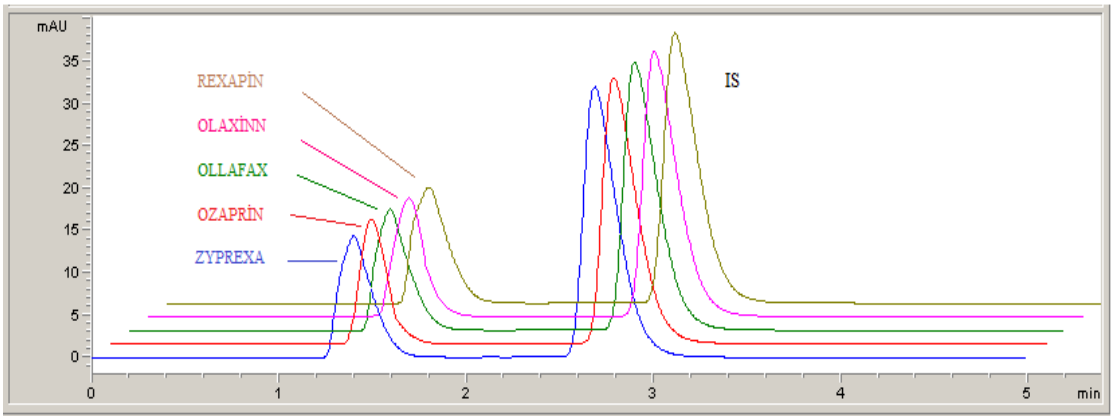
Şekil 4.14. 5 µg/mL IS içeren ozaprin tabletin 5+1, 5+10 ve 5+25 µg/mL (ilaç+standart olanzapin çözeltisi) derişimindeki çözeltilerin HPLC kromatogramı



Şekil 4.15. 5 µg/mL IS içeren ollafax tabletin 5+1, 5+10 ve 5+25 µg/mL (ilaç+standart olanzapin çözeltisi) derişimindeki çözeltilerin HPLC kromatogramı



Şekil 4.16. 5 µg/mL IS içeren zyprexa tabletin 5+1, 5+10 ve 5+25 µg/mL (ilaç+standart olanzapin çözeltisi) derişimindeki çözeltilerin HPLC kromatogramı



Şekil 4.17. 5 µg/mL IS ve 5 µg/mL derişimde olanzapin içeren rexapin, olaxinn, ollafax, ozaprin, zyprexa tablet çözeltilerinin HPLC kromatogramları

4.4. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulaması

10 mg/tablet olanzapin içeren rexapin, olaxinn, ozaprin, ollafax ve zyprexa tablet çözeltileri Bölüm 3.4.'de belirtildiği şekilde hazırlandı. Kalibrasyon eğrisi sınırlarında tayin edilecek şekilde çözeltiler seyreltildi ve 5 µg/mL derişimde internal standart eklendi. Elde edilen çözeltiler HPLC sistemine enjekte edilerek kromatogramları alındı ve kalibrasyon eğrisi kullanılarak miktar tayinleri yapıldı. Elde edilen değerler standart olanzapin çözelti değerleri ile karşılaştırılarak %GK ve %BSS değerleri Tablo 4.10'da verildi.

Tablo 4.10. Tablet başına 10 mg olanzapin içeren rexapin, olaxinn, ozaprin, ollafax ve zyprexa tablet çözeltilerinin HPLC yöntemi ile miktar tayini (n=6)

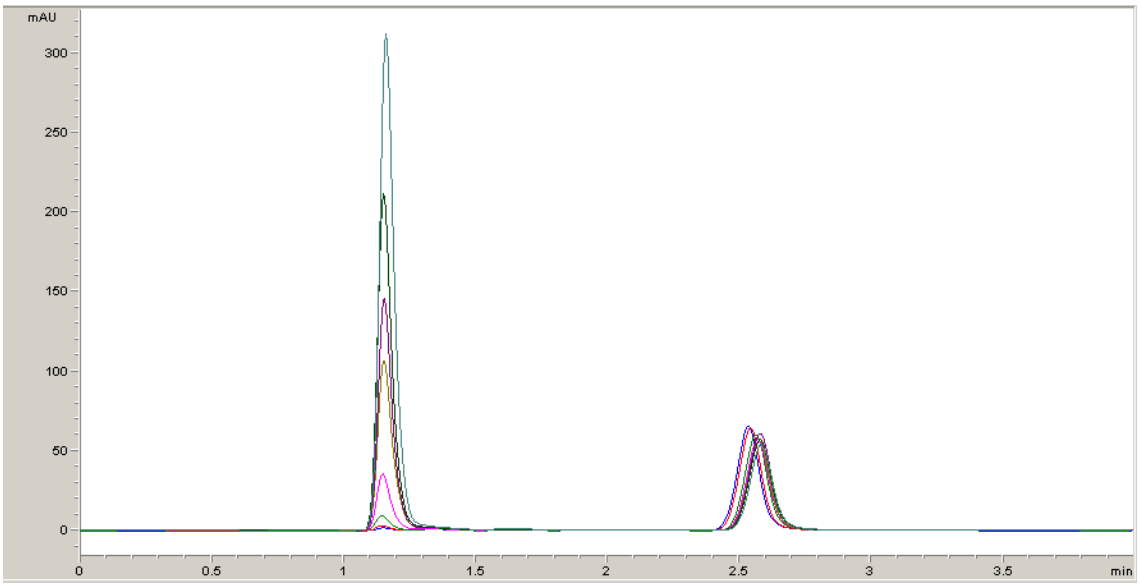
Ticari Preparat	Bulunan±SS (mg)	%GK	%BSS	Güven Aralığı
Rexapin (10 mg/tablet)	10.22 ±0,33	102.2	3.19	101.35-103.04
Olaxinn (10 mg/tablet)	9.87±0,27	98.7	2,69	98.01-99.84
Ozaprin (10 mg/tablet)	9.93±0,03	99.3	0.28	99.22-99.37
Ollafax (10 mg/tablet)	10.14±0.22	101.4	2,14	100.83-101.97
Zyprexa (10 mg/tablet)	10.09±0.11	100.9	1.07	100.62-101.18

SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma, GK: Geri Kazanım

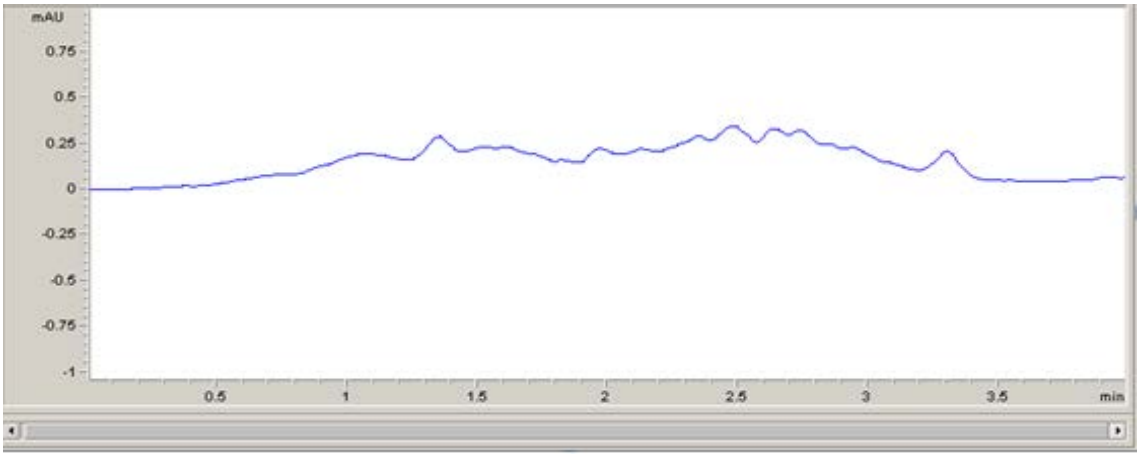
4.5. HPLC Plazma Çalışması

4.5.1. Plazma Çözeltilerinin Hazırlanması

Atatürk Üniversitesi, Yakutiye Araştırma Hastanesi Kan Alma Merkezinden temin edilen boş plazmanın 0.5 mL'sine 0.25, 0.5, 2.5, 5, 15, 20, 30 ve 40 µg/mL derişimlerde standart olanzapin çözeltisi ve 5 µg/mL derişimde IS çözeltisi eklendi, karıştırıldı ve Bölüm 3.4'de belirtildiği şekilde ekstraksiyonları yapıldı, HPLC sistemine enjekte edildi ve kromatogramları alındı (Şekil 4.18). Aynı şekilde boş plazmanında da ekstraksiyonu yapılarak HPLC kromatogramı alındı (Şekil 4.19).



Şekil 4.18. 5 µg/mL derişimde IS içeren 0.25, 0.5, 2.5, 5, 15, 20, 30 ve 40 µg/mL derişimdeki olanzapinin plazma çözeltilerinin HPLC kromatogramları



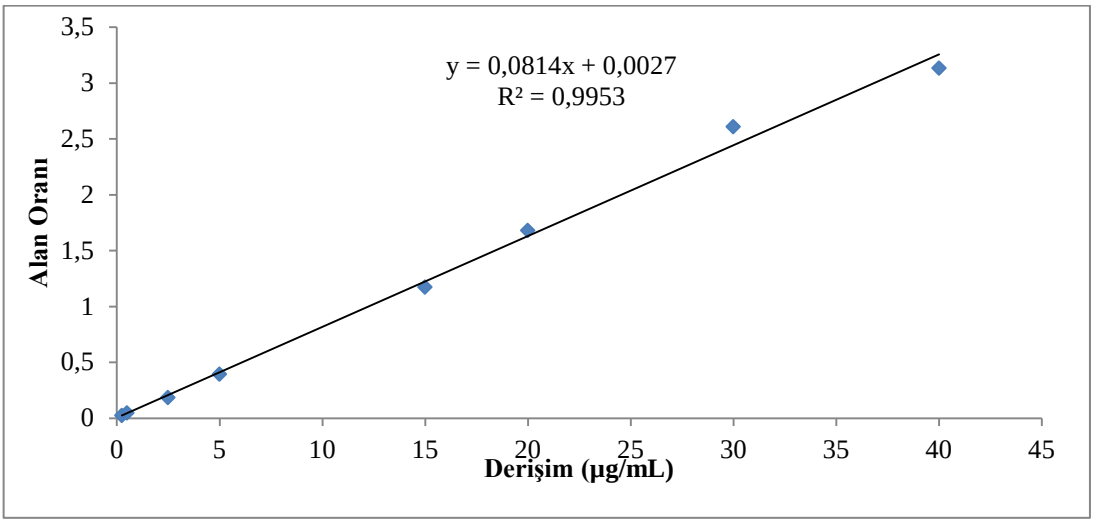
Şekil 4.19. Boş plazmanın HPLC kromatogramı

4.5.2. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)

4.5.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi

5 µg/mL derişimde IS ve 0.25-40 µg/mL derişim aralığında hazırlanan olanzapin standart çalışma çözeltileri boş plazmaya eklenip karıştırıldıktan sonra Bölüm 3.4'de verilen ekstraksiyon prosesiyle plazmadan ekstrakte edilen çözeltiler HPLC sistemine enjekte edildi, kromatogramları alındı ve pik alanları belirlendi. Olanzapin plazma

çözelti derişimlerine karşı, IS (irbesartan) ve olanzapin pik alan oranlarının grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon eğrisi elde edildi (Şekil 4.20). HPLC yöntemiyle elde edilen kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz sonuçları ise Tablo 4.11'de verildi.



Şekil 4.20. Olanzapin plazma çözeltilerinin HPLC yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisi

Tablo 4.11. Plazma çalışmasında, HPLC yönteminde kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz sonuçları

[a]ÇA (µg/mL)	λ(nm)	[a]LR	Sa	Sb	R
0.25-40	272	y=0.0814x + 0.0027	0.00583	0.00078	0.9976

ÇA: çalışma aralığı, [a]:6 analiz sonucunun ortalaması, LR: lineer regrasyon, Sa: regrasyon eğrisindeki kaymanın standart sapması, Sb: regrasyon eğrisindeki eğimin standart sapması, R: korelasyon katsayısı

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

Plazma çalışmasında, HPLC yönteminin LOD ve LOQ değerleri ICH kılavuzlarında verildiği şekilde tayin edildi. Kalibrasyon eğrisinin en küçük derişiminden daha düşük derişimlerde hazırlanan plazma çözeltilerinin kromatogramları

alındı. Bu kromatogramlardan sinyal/gürültü (S/G) oranı 3 olan değer gözlenebilme sınırı (LOD) ve S/G oranı 8 olan değerde miktar tayin alt sınırı (LOQ) olarak belirlendi. HPLC yönteminin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.10 µg/mL ve 0.25 µg/mL olarak tespit edildi.

4.5.2.3. Doğruluk ve Kesinlik

Yöntemin doğruluğu, kesinliği güniçi ve günler arası değişkenlerle belirlendi. Hazırlanan üç farklı derişimdeki kalite kontrol çözeltileri ve 5 µg/mL derişimdeki IS çözeltisi plazmaya eklenip ekstrakte edildikten sonra plazma kalite kontrol çözeltileri (1, 10 ve 25 µg/mL) elde edildi. Bu çözeltilerde güniçi (aynı yöntem ve aynı labaratuvar şartlarında 1 günde 6 kez) ve günler arası (aynı yöntemle 6 farklı günde 6 kez) olanzapin miktar tayinleri gerçekleştirildi. Analiz sonuçlarının ortalaması, standart sapması, bağıl standart sapması ve bağıl hata değerleri elde edildi. Doğruluk bağıl hatayla [%BH= (bulunan değer-eklenen değer)/eklenen değer) x100] ve kesinlik bağıl standart sapma ile [%BSS = (SS/bulunan değer) x 100] verildi (Tablo 4.12).

Tablo 4.12. Plazma çalışmasında, HPLC yönteminin doğruluk ve kesinlik değerleri

Eklenen (µg/mL)	Güniçi			Günler arası		
	Bulunan±SS (µg/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS	Bulunan±SS (µg/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS
1	0.99±0.01	-1.00	1.01	0.98±0.03	-2.00	3.06
10	9.94±0.08	-0.60	0.81	9.95±0.04	-0.50	0.40
25	24.89±0.25	-0.44	1.00	24.92±0.24	-0.32	0.96

SS: Standart sapma; BH: Bağıl hata; BSS: Bağıl standart sapma

4.5.2.4. Geri Kazanım

Plazmadan geri kazanım çalışmasında. olanzapinin üç farklı derişimdeki kalite kontrol çözeltileri ve 5 µg/mL derişimdeki IS plazmaya eklendi, karıştırıldı ve Bölüm 3.4'de verilen ekstraksiyon yöntemiyle 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 plazmadan geri kazanım değerleri tespit edildi (Tablo 4.13) .

Tablo 4.13. HPLC yönteminin plazmadan geri kazanım değerleri

Eklenen (µg/mL)	Güniçi		Günler Arası	
	%GK	%BSS	%GK	%BSS
1	99.13	0.04	99.40	0.03
10	98.95	0.01	98.47	0.04
25	99.92	0.01	99.54	0.01

BSS: Bağıl standart sapma, GK: Geri kazanım

4.5.2.5. Stabilite (Kararlılık)

Stabilite çalışması, olanzapinin plazma çözeltilesinde analiz boyunca hangi ortamlarda ne kadar süre ile bozunmadan stabil kaldığını belirlemek amacıyla yapıldı ve FDA rehberinde belirtilen kurallara göre (ortalamanın ± %10) analitlerin stabilite şartları belirlenerek analiz sonuçları değerlendiridi.

Olanzapinin düşük, orta ve yüksek (1, 10 ve 25 µg/mL) derişimlerde hazırlanan kalite kontrol çözeltileri 0.5 mL boş plazma çözeltilerine eklenerek 24, 48 ve 72 saat boyunca oda sıcaklığında (24 °C), + 4 °C'de (buzdolabında) ve -20 °C'de (derin dondurucuda) bekletildi. Ekstraksiyon prosesine göre ekstraksiyonları yapıldı. HPLC yöntemi kullanılarak analizleri gerçekleştirildi ve bulunan değerler yeni hazırlanıp analiz edilen standart çözeltilerin analiz sonuçları ile kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.14'de verildi.

Ayrıca olanzapin plazma çözeltilerine donma-çözme stabilitesi yapıldı. Yapılan donma-erime stabilitesinde; olanzapinin düşük, orta ve yüksek (1, 10 ve 25 μg/mL) derişimlerde hazırlanan kalite kontrol çözeltileri 0.5 mL boş plazma çözeltilerine eklendi. -20 °C depolama sıcaklığında 24 saat bekletilerek oda sıcaklığında yardımsız eritildi ve ekstraksiyon prosesine göre ekstraksiyonları yapıldı. Donma-çözme turları 3 kez tekrarlandı ve her donma-çözme turundan sonra HPLC yöntemi kullanılarak analizleri yapıldı. Bulunan değerler, yeni hazırlanıp analiz edilen standart çözeltilerinin analiz sonuçları ile kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.14'de verildi.

Tablo 4.14. Olanzapinin plazma içerisindeki stabilitesi

Eklenen (μg/mL)	**24 saat**	**48 saat**	**72 saat**
Stabilite -20°C (derin dondurucu) (%GK±SS)			
1	98.4±3.42	96.2±3.24	97.8±3.06
10	97.2±1.01	97.4±1.15	96.4±1.25
25	97.9±1.18	98.9±1.29	98.5±1.67
Stabilite +4°C (buzdolabı) (%GK±SS)			
1	95.7±8.36	93.8±6.76	91.4±7.78
10	96.2±2.42	94.6±2.67	91.7±2.94
25	97.0±0.42	95.2±0.57	92.4±0.83
Stabilite oda sıcaklığı (24 °C) (%GK±SS)			
1	91.5±5.77	80.0±6.08	76.5±5.92
10	92.2±8.69	91.5±9.17	90.3±2.81
25	93.1±2.86	91.3±2.61	90.4±1.97
Stabilite Donma-Çözme (%GK±SS)			
	Birinci	İkinci	Üçüncü
1	100.4±2.94	99.3±2.46	94.6±2.85
10	99.6±0.59	100.7±0.68	98.8±0.43
25	101.0±1.06	99.7±1.13	98.9±1.29

SS: Standart sapma, GK: Geri kazanım

4.6. İnterfere Etki

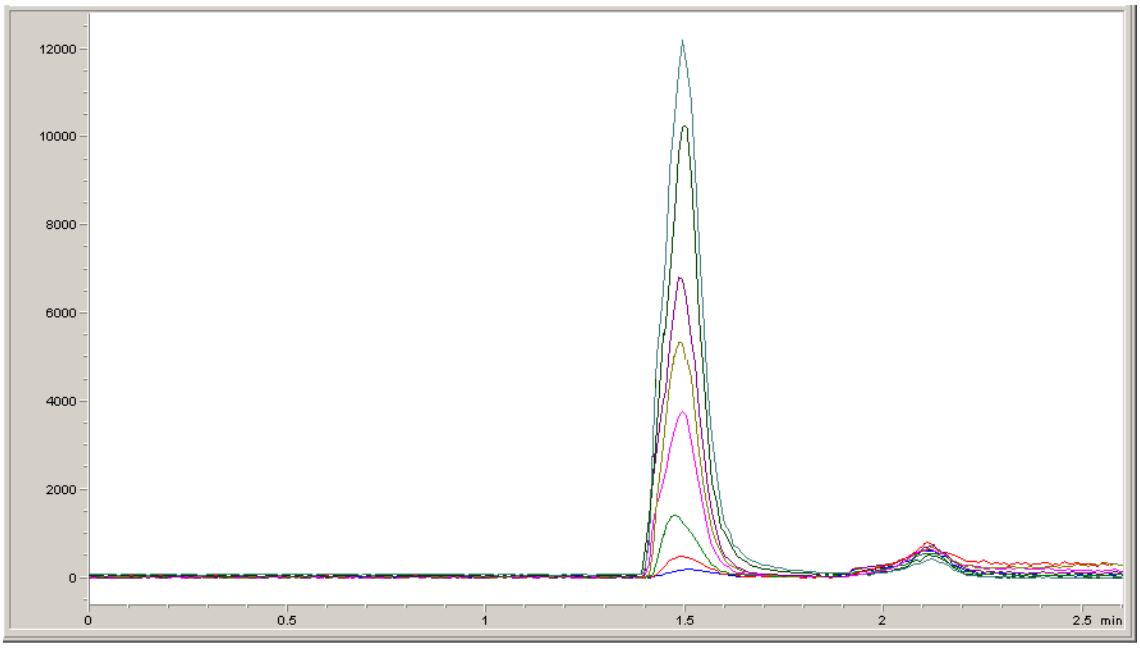
Olanzapin miktar tayini esnasında plazmada bulunabilecek diğer ilaçların interfere etkisini incelemek amacıyla, olanzapin kullanılan hastalara ihtiyaç duyulduğunda verilebilen 10 farklı ilacın (ativan (lorazepam); anksiyolitik, secita (essitalopram okzalat); antidepresan, citoles; (essitalopram okzalat): antidepresan, lithuril (lityum karbonat); duygu durum düzenleyici, depakin (sodyum valproat): antiepileptik, norodol (haloperidol): antipsikotik, xanax (alprazolam): anksiyolitik, supradyn: multi vitamin, tetralet (tetrasiklin hidroklorür): antibiyotik, parol (parasetamol): ağrı kesici, ateş düşürücü) plazmada bulunabilecek maksimum derişimleri araştırılıp belirlendikten sonra bu derişimdeki çözeltiler yukarıda belirtilen ilaçlardan hazırlanıp 0.5 mL plazmaya eklendi. Daha sonra plazmaya düşük, orta ve yüksek değerdeki olanzapin çözeltileri (1, 10 ve 25 μg/mL) ve 5 μg/mL'lik IS çözeltisi eklendikten sonra karıştırılıp Bölüm 3.4'de belirtilen ekstraksiyon yöntemi ile ekstraksiyonları yapıldı. HPLC sistemine enjekte edilerek kromatogramları alındı ve olanzapin miktarı kalibrasyon eğrisi kullanarak belirlendi. Elde edilen değerler standart çözelti değerleri ile kıyaslanarak yüzde geri kazanım değerleri elde edildi. Bu değerler boş plazmadan elde edilen değerler ile kıyaslandı. Hem kromatogramlardan hem de geri kazanım değerlerinden yukarıda belirtilen ilaçların herhangi bir interfere etkiye sahip olmadıkları gözlendi.

4.7. LC-MS Yöntemi

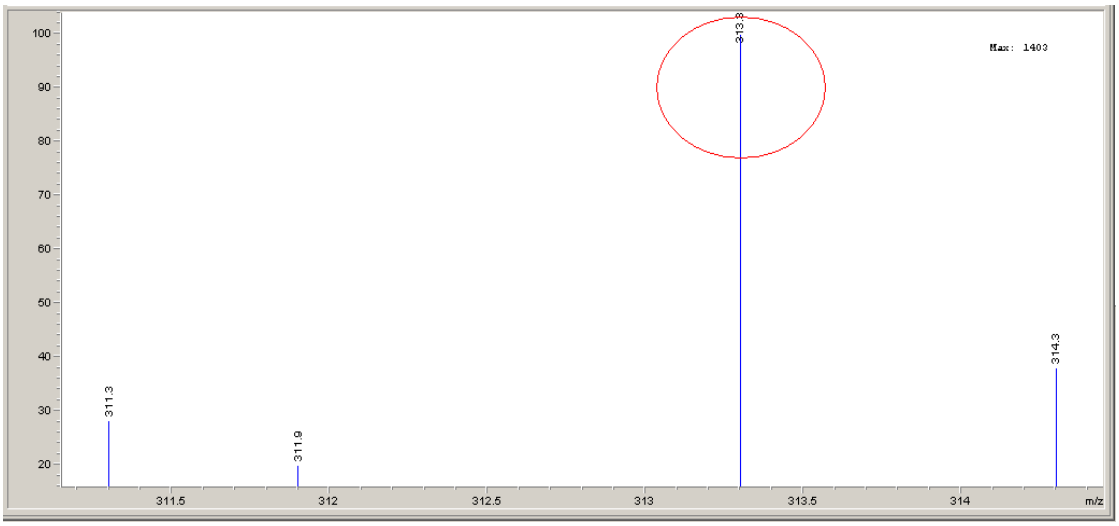
4.7.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

LC-MS ile yapılan çalışmalarda, 100 μg/mL'lik olanzapin stok çözeltisinden 2, 10, 25, 75, 100, 150, 250 ve 300 ng/mL derişimlerde standart çalışma çözeltilerine 50 ng/mL derişimde IS çözeltisi eklenerek hazırlandı ve LC-MS sistemine enjekte edilerek kromatogramları ve MS spektrumları alındı. Kromatogramlar Şekil 4.21'de; MS

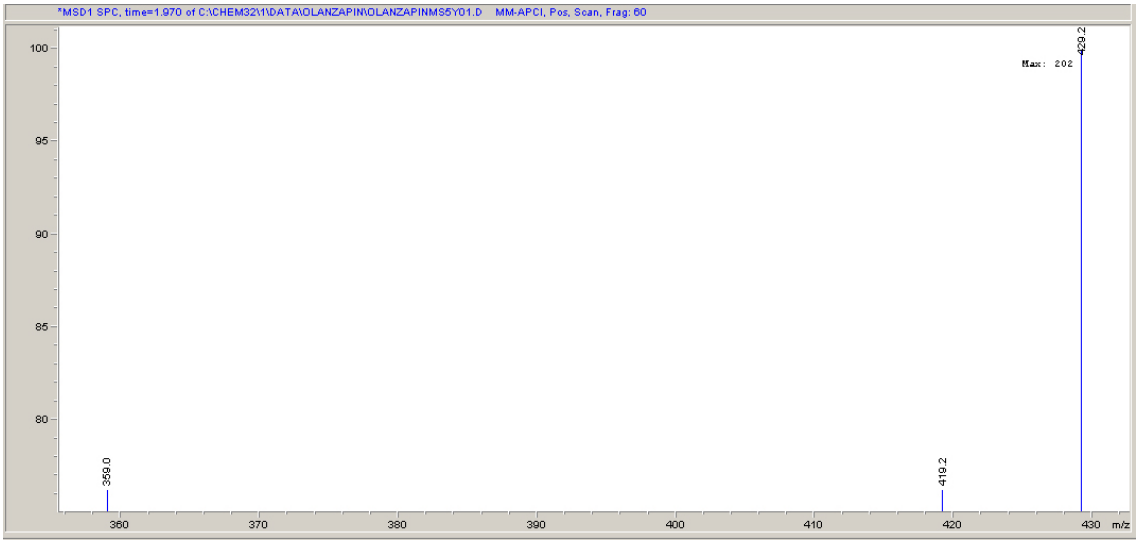
spektrumu Şekil 4.22'de verildi. Bu çalışmada irbesartan internal standart olarak kullanıldı. İrbesartanın da MS spektrumu alındı ve Şekil 4.23'de verildi. Bu spektrumlara göre olanzapin ve irbesartan için moleküler iyon değerleri sırasıyla 313.2 ve 429.2 olarak belirlendi.



Şekil 4.21. LC-MS sisteminde, 50 ng/mL derişiminde IS içeren 2, 10, 25, 75, 100, 150, 250 ve 300 ng/mL derişimlerdeki olanzapin çözeltilerinin kromatogramları



Şekil 4.22. Olanzapine ait MS spektrumu

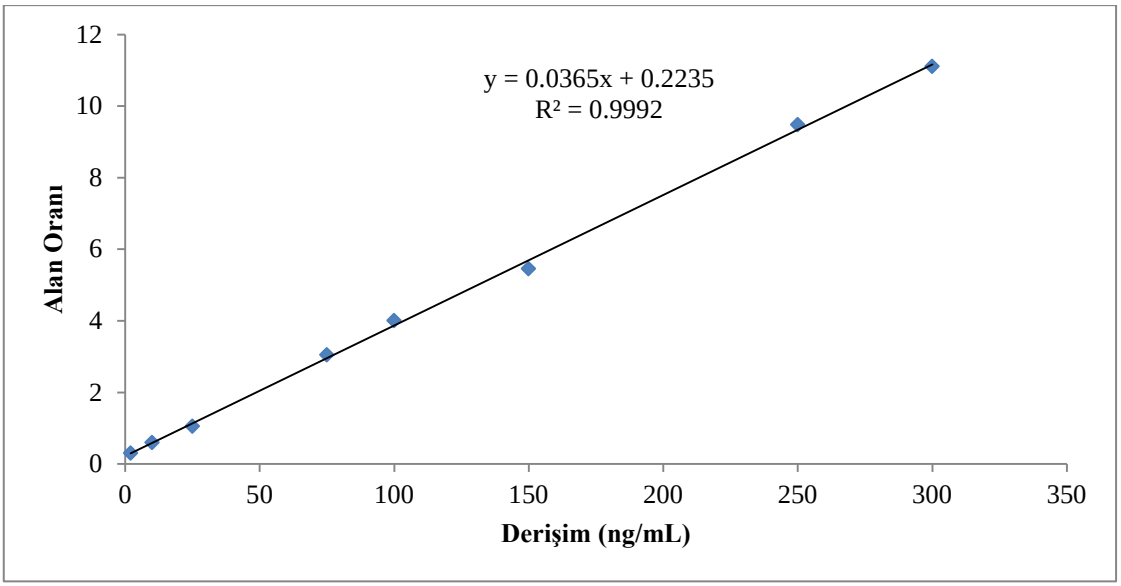


Şekil 4.23. İrbesartana ait MS spektrumu

4.7.2.Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)

4.7.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi

50 ng/mL derişimde IS içeren 2-300 ng/mL derişim aralığında sekiz farklı derişimde (2, 10, 25, 75, 100, 150, 250 ve 300 ng/mL) hazırlanan olanzapin çözeltilerinin LC-MS sisteminde kromatogramları alınarak pik alan oranları belirlendi. Olanzapin derişmine karşı, IS (irbesartan) ve olanzapin pik alan oranlarının grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon eğrisi elde edildi (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. Olanzapin standart çalışma çözeltilerinin LC-MS yöntemiyle elde edilen kalibrasyon eğrisi

LC-MS yöntemiyle elde edilen kalibrasyon eğrinin regrasyon eşitliğinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.15'de verildi.

Tablo 4.15. LC-MS yönteminin kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz sonuçları

[a]ÇA (ng/mL)	[a]LR	Sa	Sb	R
2-300	y=0.0365x + 0.2235	0.00375	0.00108	0.9995

ÇA: çalışma aralığı, [a]:6 analiz sonucunun ortalaması, LR: lineer regrasyon, Sa: regrasyon eğrisindeki kaymanın standart sapması, Sb: regrasyon eğrisindeki eğimin standart sapması, R: korelasyon katsayısı

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

LC-MS yönteminin LOD ve LOQ değerleri ICH klavuzlarında verildiği şekilde tayin edildi. Kalibrasyon eğrisinin en küçük değerinden daha düşük derişimlerde olanzapin çözeltileri hazırlandı ve LC-MS kromatogramları alındı. Bu

kromatogramlardan sinyal/gürültü (S/G) oranları tespit edilerek S/G oranı 3 olan değer gözlenebilme sınırı (LOD) ve S/G oranı 8 olan değerde miktar tayin alt sınırı (LOQ) olarak belirlendi. LC-MS yönteminin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.7 ng/mL ve 2.0 ng/mL olarak tespit edildi.

4.7.2.3. Doğruluk ve Kesinlik

Yöntemin doğruluğu, kesinliği güniçi ve günler arası değişkenlerle belirlendi. Hazırlanan üç farklı derişimdeki (5, 50 ve 200 ng/mL) kalite kontrol çözeltilerinin güniçi (aynı yöntem ve aynı labaratuvar şartlarında 1 günde 6 kez) ve günler arası (aynı yöntemle 6 farklı günde 6 kez) miktar analizleri gerçekleştirildi. Analiz sonuçlarının ortalaması, standart sapması, bağıl standart sapması ve bağıl hata değerleri elde edildi. Doğruluk bağıl hatayla [%BH= (bulunan değer-eklenen değer)/eklenen değer) x100] ve kesinlik bağıl standart sapma ile [%BSS = (SS/bulunan değer) x 100] verildi (Tablo 4.16).

Tablo 4.16. LC-MS yönteminin doğruluk ve kesinlik değerleri

Eklenen (ng/mL)	Güniçi			Günler arası		
	Bulunan±SS (ng/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS	Bulunan±SS (ng/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS
5	5.02±0.13	0.40	2.59	5.08±0.20	1.60	3.94
50	50.75±1.90	1.50	3.74	49.71±2.08	-0.58	4.18
200	201.19±4.56	0.59	2.27	198.89±4.32	-0.56	2.17

SS: Standart sapma; BH: Bağıl hata; BSS: Bağıl standart sapma

4.7.2.4. Analitik Geri Kazanım

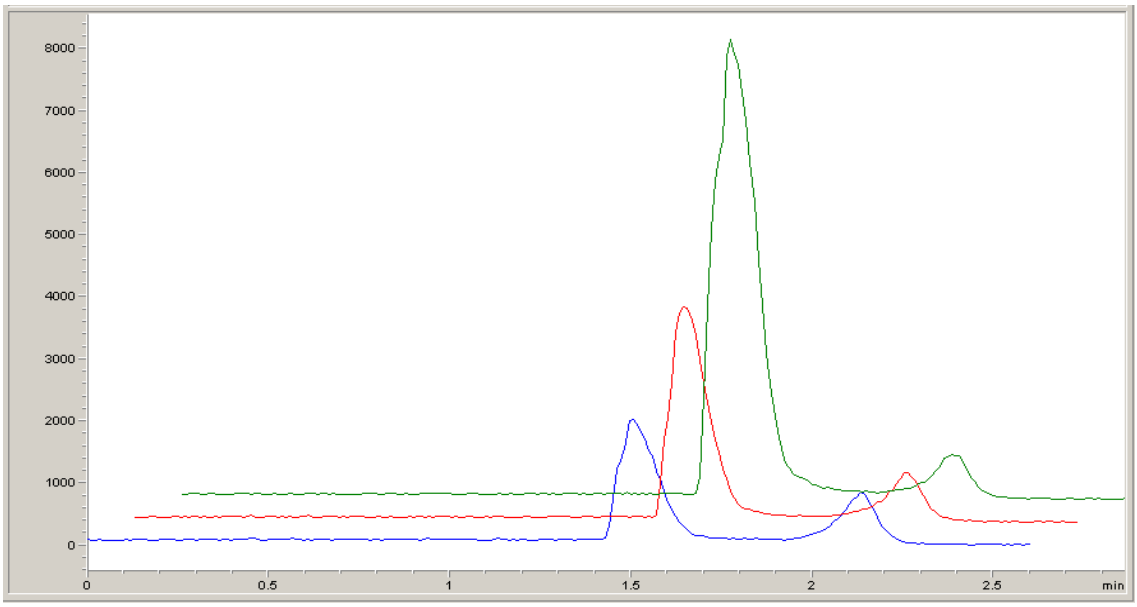
LC-MS yöntemi ile farmasötik preparatlarda olanzapinin analitik geri kazanım çalışması standart ekleme yöntemine göre yapıldı. Olanzapin etkin maddesi içeren rexapin, olaxinn, ozaprin, ollafax ve zyprexa ticari ilaçlardan 25 ng/mL derişimde Bölüm 3.4.'de belirtildiği şekilde hazırlandı ve hazırlanan ilaç çözeltilerine 50 ng/mL

derişimde IS eklendi. Bu çözeltiler LC-MS sistemine enjekte edildi, kromatogramları alınarak pik alan oranları belirlendi. Tablet çözeltilerine 5, 50 ve 200 ng/mL derişimlerde olanzapin standart çalışma çözeltileri eklendi, LC-MS sistemine enjekte edilerek kromatogramları alındı ve pik alan oranları belirlendi. Elde edilen sonuçların ortalaması, standart sapması ve bağıl standart sapması belirlendi. Analitik geri kazanım (% GK= (toplam çözeltide bulunan değeri-ilaç çözeltisinin bulunan değeri) / eklenen standart çözeltisinin değeri)x 100] (Tablo 4.17). 50 ng/mL IS içeren beş farklı tablet çözeltilerinin (25+5, 25+50 ve 25+200 ng/mL) LC-MS kromatogramları Şekil 4.25, 4.26, 4.27, 4.28 ve 4.29'da verildi. Ayrıca, 50 ng/mL IS içeren rexapin, olaxinn, ollafax, ozaprin, zyprexa tablet çözeltilerinin 25 ng/mL derişimdeki çözeltilerinin LC-MS kromatogramları ise Şekil 4.30'da verildi.

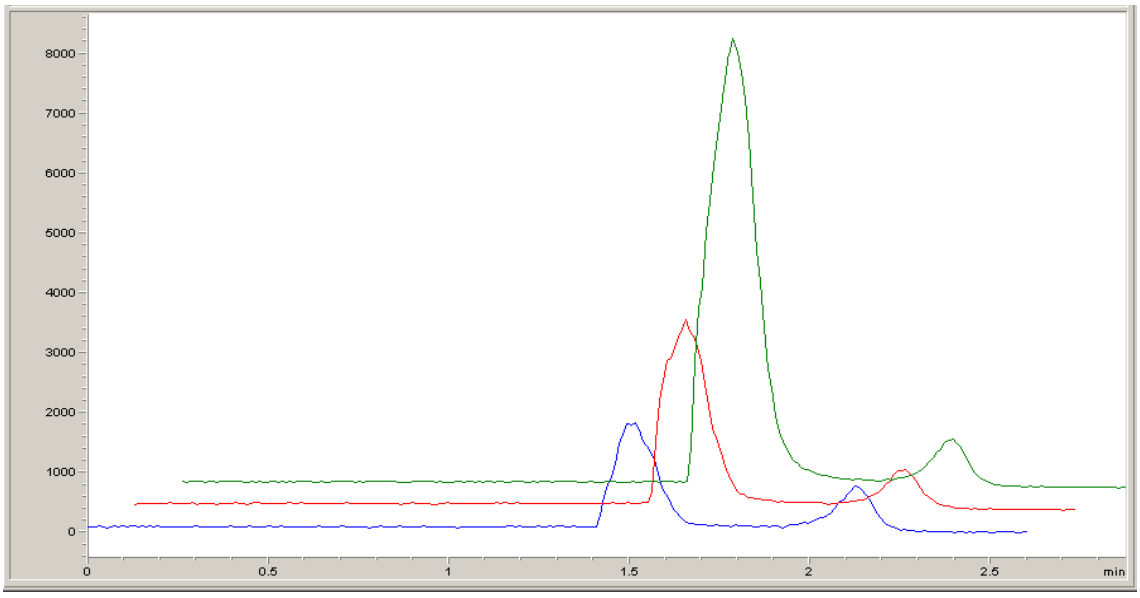
Tablo 4.17. LC-MS yönteminin farmasötik preparatlarda analitik geri kazanım değerleri

Tablet	**Eklenen Standart Çözelti (ng/mL)**	**Tablet Çözeltisi (ng/mL)**	**Bulunan±SS (ng/mL)**	**% GK**	**%BSS**
Olaxinn (10 mg/tablet)	5	25	30.06±0.76	101.2	2,52
	50		74.88±1.31	99.8	1.75
	200		225.42±1.62	100.2	0.72
Ollafax (10 mg/tablet)	5	25	29.91±0.89	98.2	2.98
	50		74.59±0.53	99.2	0.71
	200		225.93±3.39	99.5	1.50
Ozaprin (10 mg/tablet)	5	25	30.10±0.59	102.0	1.96
	50		75.12±1.43	100.2	1.90
	200		225.09±2.47	100.5	1.90
Rexapin (10 mg/tablet)	5	25	29.97±0.86	99.4	2.87
	50		74.98±1.96	99.9	2.61
	200		2225.09±1.24	100.1	0.55
Zyprexa (10 mg/tablet)	5	25	30.09±0.78	101.8	2.59
	50		75.25±2.01	100.5	2.67
	200		225.83±2.75	100.4	1.22

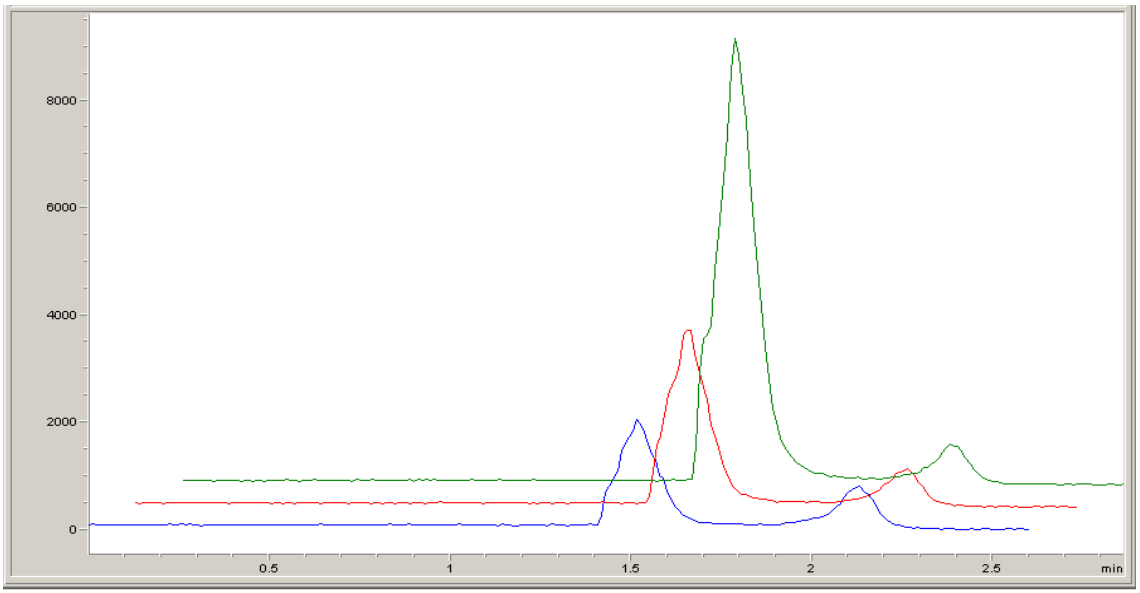
SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma, GK: Geri Kazanım



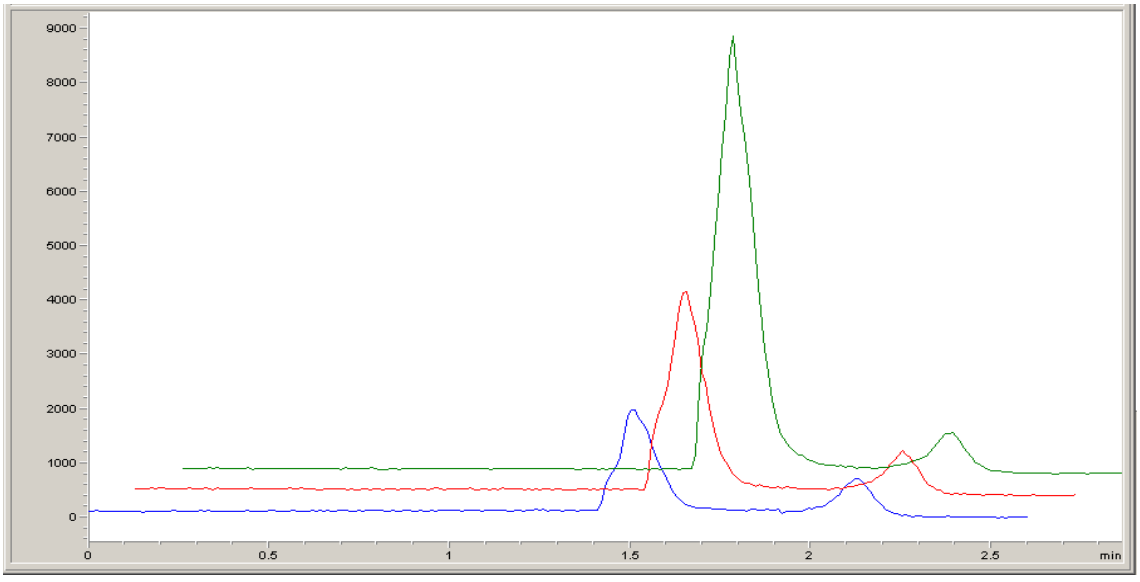
Şekil 4.25. 50 ng/mL IS içeren üç farklı derişimdeki (25+5, 25+50 ve 25+200 ng/mL) olaxinn tablet çözeltilerinin LC-MS kromatogramları



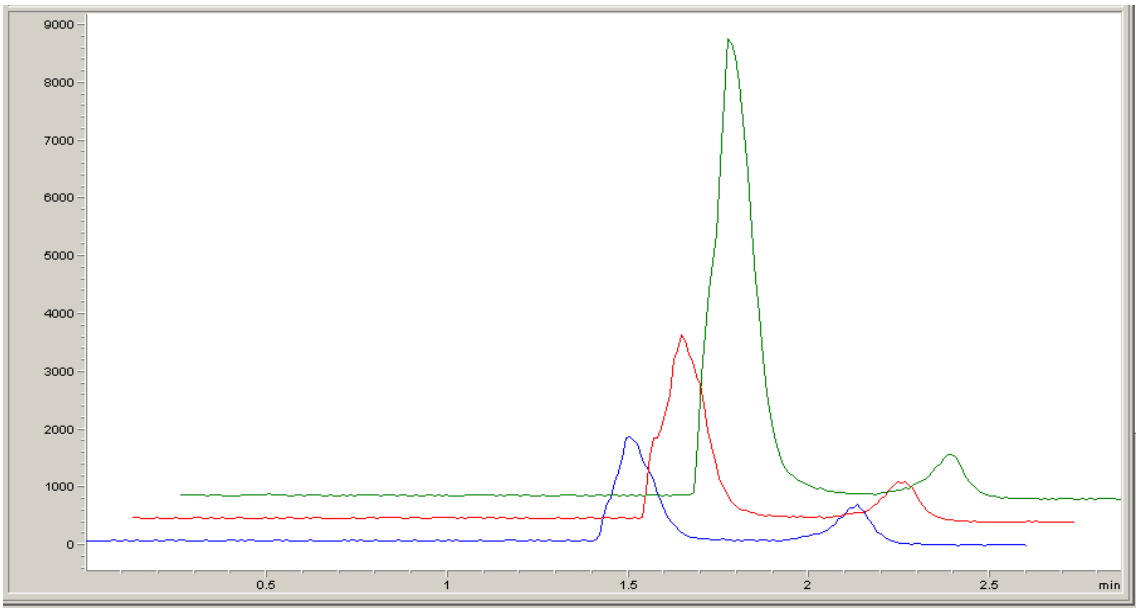
Şekil 4.26. 50 ng/mL IS içeren üç farklı derişimdeki (25+5, 25+50 ve 25+200 ng/mL) ollafax tablet çözeltilerinin LC-MS kromatogramları



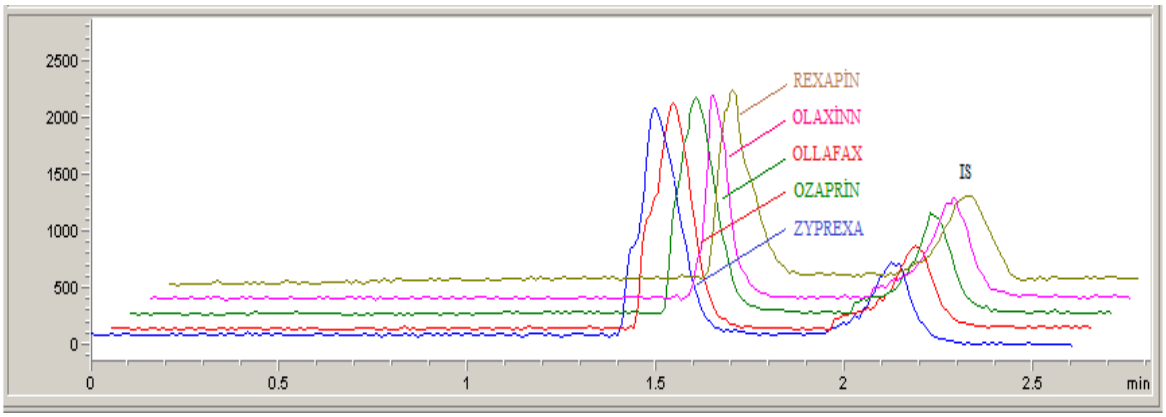
Şekil 4.27. 50 ng/mL IS içeren üç farklı derişimdeki (25+5, 25+50 ve 25+200 ng/mL) ozaprin tablet çözeltilerinin LC-MS kromatogramları



Şekil 4.28. 50 ng/mL IS içeren üç farklı derişimdeki (25+5, 25+50 ve 25+200 ng/mL) rexapin tablet çözeltilerinin LC-MS kromatogramları



Şekil 4.29. 50 ng/mL IS içeren üç farklı derişimdeki (25+5, 25+50 ve 25+200 ng/mL) zyprexa tablet çözeltilerinin LC-MS kromatogramları



Şekil 4.30. 50 ng/mL IS ve 25 ng/mL olanzapin içeren rexapin, olaxinn, ollafax, ozaprin ve zyprexa tablet çözeltilerinin LC-MS kromatogramları

4.8. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

10 mg/tablet olanzapin içeren rexapin, olaxinn, ozaprin, ollafax ve zyprexa tablet çözeltileri Bölüm 3.4.'de belirtildiği şekilde hazırlandı. Kalibrasyon eğrisi sınırlarında tayin edilecek şekilde çözeltiler seyreltildi, çözeltilere 50 ng/mL derişimde IS eklendi

ve LS-MS sistemine enjekte edilerek kromatogramları alındı. Kalibrasyon eğrisi kullanılarak miktar tayinleri yapıldı. Elde edilen değerler standart olanzapin çözelti değerleri ile karşılaştırılarak %GK ve %BSS değerleri Tablo 4.18'de verildi.

Tablo 4.18. LC-MS yöntemi ile tablet başına 10 mg olanzapin içeren rexapin, olaxinn, ozaprin, ollafax ve zyprexa tabletlerinin miktar analizi (n=3)

Ticari Preparat	Bulunan±SS (mg)	%GK	%BSS	Güven Aralığı
Rexapin (10 mg/tablet)	9.61±0.32	96.13	3.32	94.75-97.51
Olaxinn (10 mg/tablet)	9.53±0.05	95.34	0.53	95.12-95.56
Ozaprin (10 mg/tablet)	9.39±0.23	93.92	2.45	92.93-94.91
Ollafax (10 mg/tablet)	9.34±0.34	93.40	3.64	91.93-94.86
Zyprexa (10 mg/tablet)	9.78±0.14	97.82	1,43	97.22-98.42

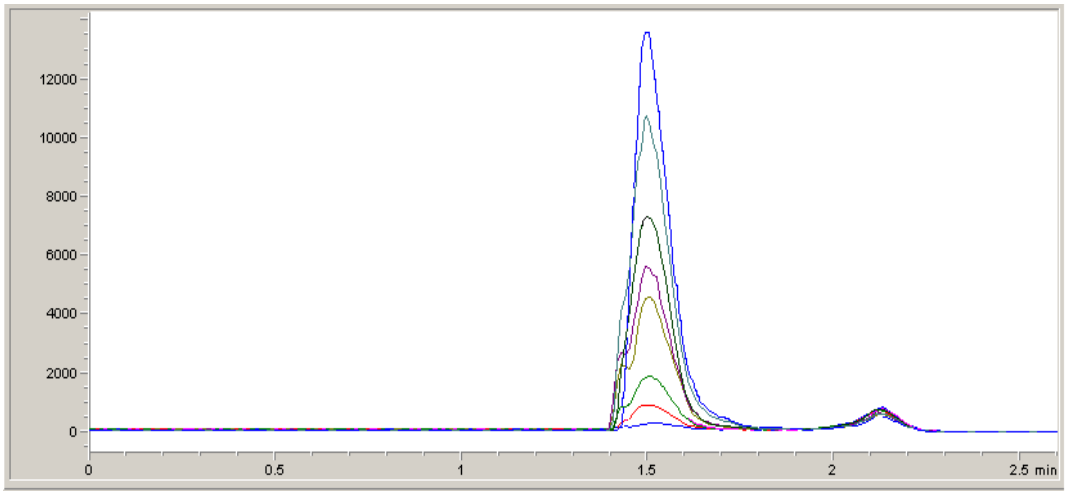
BSS: Bağıl standart sapma, GK: Geri Kazanım, SS: Standart sapma

4.9. LC-MS Plazma Çalışması

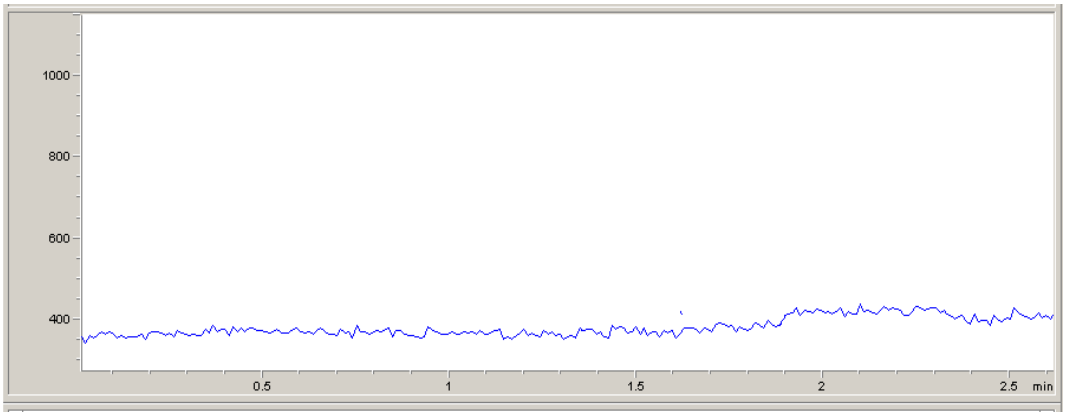
4.9.1. Plazma Çözeltilerinin Hazırlanması

Atatürk Üniversitesi, Yakutiye Araştırma Hastanesi Kan Alma Merkezinden temin edilen boş plazmanın 0.5 mL'sine 2, 10, 25, 75, 100, 150, 250 ve 300 ng/mL derişimlerde standart olanzapin çözeltileri ve 50 ng/mL derişimde IS çözeltisi eklendi, karıştırıldı, Bölüm 3.4'de belirtildiği şekilde ekstraksiyonları yapıldı, LC-MS sistemine

enjekte edildi ve kromatogramları alındı (Şekil 4.31). Aynı şekilde boş plazmanında da ekstraksiyonu yapılarak kromatogramı alındı (Şekil 4.32).



Şekil 4.31. 50 ng/mL derişimde IS içeren 2, 10, 25, 75, 100, 150, 250 ve 300 ng/mL derişimlerdeki olanzapin plazma çözeltilerinin LC-MS kromatogramları



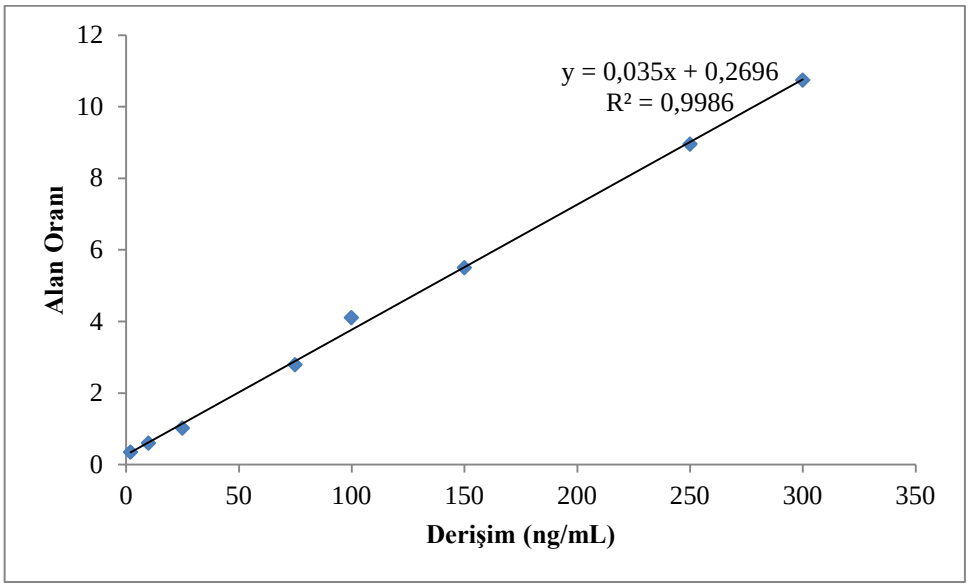
Şekil 4.32. Boş insan plazmasına ait kromatogram

4.9.2. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)

4.9.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi

50 ng/mL derişimde IS ve 2-300 ng/mL derişim aralığında hazırlanan olanzapin standart çalışma çözeltileri boş plazmaya eklenip karıştırıldıktan sonra Bölüm 3.4'de verilen ekstraksiyon prosesiyle plazmadan ekstrakte edildi ve bu çözeltiler LC-MS

sistemine enjekte edildi, kromatogramları alındı ve pik alanları belirlendi. Olanzapin plazma çözelti derişimlerine karşı, IS (irbesartan) ve olanzapin pik alan oranlarının grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon eğrisi elde edildi (Şekil 4.33). LC-MS yöntemiyle elde edilen kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz sonuçları ise Tablo 4.19'da verildi.



Şekil 4.33. Plazma çalışmasında, LC-MS yöntemiyle elde edilen plazma çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi

Tablo 4.19. Plazma çalışmasında**,** LC-MS yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz sonuçları

[a]ÇA (ng/mL)	[a]LR	Sa	Sb	R
2-300	y=0.035x + 0.2696	0.00426	0.00124	0.9993

ÇA: çalışma aralığı, [a]:6 analiz sonucunun ortalaması, LR: lineer regrasyon, Sa: regrasyon eğrisindeki kaymanın standart sapması, Sb: regrasyon eğrisindeki eğimin standart sapması, R: korelasyon katsayısı

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

Plazma çalışmasında, LC-MS yönteminin LOD ve LOQ değerleri ICH kılavuzlarında verildiği şekilde tayin edildi. Kalibrasyon eğrisinin en küçük derişiminden daha düşük derişimlerde hazırlanan plazma çözeltilerinin kromatogramları alındı. Bu kromatogramlardan sinyal/gürültü (S/G) oranı 3 olan değer gözlenebilme sınırı (LOD) ve S/G oranı 8 olan değerde miktar tayin alt sınırı (LOQ) olarak belirlendi. HPLC yönteminin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.9 ng/mL ve 2.0 ng/mL olarak tespit edildi.

4.9.2.3. Doğruluk ve Kesinlik

Plazma çalışmasında, yöntemin doğruluğu, kesinliği ve tekrarlanabilirliği güniçi ve günler arası değişkenlerle belirlendi. Kalibrasyon eğrisi içine düşen üç farklı derişimde (5, 50 ve 200 ng/mL) kalite kontrol çözeltilerinin ve plazmadan ekstraksiyon ile elde edilen plazma kalite kontrol çözeltilerinin güniçi günler arası analizleri ile doğruluk ve kesinlik değerleri elde edildi. Analiz sonuçlarını ortalaması, standart sapması, bağıl standart sapması ve bağıl hatası belirlendi. Kesinlik %BSS ve doğruluk da %BH ile verildi (Tablo 4.20).

Tablo 4.20. Plazma çalışmasında LC-MS yönteminin doğruluk ve kesinlik değerleri (n=3)

Eklenen (ng/mL)	Güniçi			Günler arası		
	Bulunan±SS (ng/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS	Bulunan±SS (ng/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS
5	4.96±0.08	-0.83	1.61	5.07±0.05	1.40	0.99
50	50.60±0.03	1.20	0.06	50.19±1.70	0.38	3.39
200	200.92±3.24	0.46	1.61	199.11±2.93	-0.45	1.47

SS: Standart sapma; BH: Bağıl hata; BSS: Bağıl Standart sapma

4.9.2.4. Geri Kazanım

Plazmadan geri kazanım çalışmasında, 50 ng/mL derişimde IS ile olanzapinin sekiz farklı standart çalışma çözeltileri plazmaya eklendi, karıştırıldı ve Bölüm 3.4'de verilen ekstraksiyon yöntemiyle ekstraksiyonları yapıldı. 2, 10, 25, 75, 100, 150, 250 ve 300 ng/mL derişimlerde plazma çözeltileri elde edildi ve bu çözeltiler LC-MS sistemine enjekte edilerek kromatogramları alındı pik alan oranları belirlendi. Elde edilen pik alan oranları standart çözeltilerin pik alan oranlarıyla kıyaslanarak plazmadan geri kazanım değerleri tespit edildi (Tablo 4.21).

Tablo 4.21. LC-MS yönteminin plazmadan geri kazanım değerleri

Plazmaya Eklenen (ng/mL)	Bulunan±SS (ng/mL)	%GK	%BSS
2	2.01±0.07	100.5	3.25
10	9.94±0.36	99.4	3.61
25	24.92±0.44	99.7	1.77
75	75.04±2.48	100.1	3.31
100	100.15±1.42	100.2	1.42
150	148.78±3.36	99.2	2.26
250	248.86±4.64	99.5	1.87
300	300.42±5.47	100.1	1.82

GK: Geri kazanım; BSS: Bağıl standart sapma, SS: Standart sapma

4.9.2.5. Stabilite (Kararlılık)

Stabilite çalışması, olanzapinin plazma çözeltilesinde analiz boyunca hangi ortamlarda ne kadar süre ile bozunmadan stabil kaldığını belirlemek amacıyla yapıldı ve

FDA rehberinde belirtilen kurallara göre (ortalamanın ± %10) analitlerin stabilite şartları belirlenerek analiz sonuçları değerlendiridi.

Olanzapinin düşük, orta ve yüksek (5, 50 ve 200 ng/mL) derişimlerde hazırlanan kalite kontrol çözeltileri 0.5 mL boş plazma çözeltilerine eklenerek elde edilen çözeltiler 24, 48 ve 72 saat boyunca oda sıcaklığında (24 °C) , + 4 °C'de (buzdolabında) ve -20 °C'de (derin dondurucuda) bekletildi. Ekstraksiyon prosesine göre ekstraksiyonları yapıldı. LC-MS yöntemi kullanılarak analizleri gerçekleştirildi ve bulunan değerler yeni hazırlanıp analiz edilen standart çözeltilerin analiz sonuçları ile kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.22'de verildi.

Ayrıca olanzapin plazma çözeltilerine donma-çözme stabilitesi yapıldı. Yapılan donma-çözme stabilitesinde; olanzapinin düşük, orta ve yüksek (5, 50 ve 200 ng/mL) derişimlerde hazırlanan kalite kontrol çözeltileri 0.5 mL boş plazma çözeltilerine eklendi. -20 °C depolama sıcaklığında 24 saat bekletilerek oda sıcaklığında yardımsız eritildi ve ekstraksiyon prosesine göre ekstraksiyonları yapıldı. Donma-çözme turları 3 kez tekrarlandı ve her donma-çözme turundan sonra LC-MS yöntemi kullanılarak analizleri yapıldı. Bulunan değerler, yeni hazırlanıp analiz edilen standart çözeltilerinin analiz sonuçları ile kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.22'de verildi.

Tablo 4.22. Olanzapinin LC-MS yöntemi ile belirlenen stabilite değerleri

Eklenen (ng/mL)	24 saat %GK±SS	48 saat %GK±SS	72 saat %GK±SS
Stabilite -20°C (derin dondurucu) (%GK±SS)			
5	96.8±2.32	96.5±3.61	95.5±2.16
50	93.9±2.01	92.2±2.23	93.3±1.37
200	95.6±2.28	93.8±2.59	93.5±1.51
Stabilite +4°C (buzdolabı) (%GK±SS)			
5	97±3.36	96.5±3.74	97.4±5.73
50	93.2±1.22	93.8±1.74	93.7±2.39
200	95.3±2.02	95.2±2.47	94.1±1.63
Stabilite oda sıcaklığı (24 °C) (%GK±SS)			
5	70.0±2.17	75.1±2.18	69.5±2.25
50	72.2±6.65	70.5±9.17	68.3±7.51
200	93.1±2.89	72.3±1.61	71.4±4.37
Stabilite Donma-Çözme (%GK±SS)			
	Birinci	**İkinci**	**Üçüncü**
5	95.8±2.54	94.8±1.43	94.6±1.87
50	94.1±1.52	94.7±1.63	92.8±2.46
200	94.6±1.07	93.9±2.16	93.4±1.75

GK: Geri kazanım; SS: Standart sapma

4.10. Matriks Etkisi

Matriks etkisi çalışmasında, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Alma merkezinden (1. plazma), Erzurum Kızılay Kan Alma Merkezinden (2. plazma) ve Erzurum Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kan Alma Merkezinden (3. plazma) sağlanan üç farklı plazmayla gerçekleştirildi. Bu plazmaların her birine olanzapinin üç farklı derişimdeki (5, 50 ve 200 ng/mL) kalite kontrol çözeltileri ayrı ayrı eklendi ve karıştırıldı. Daha sonra Bölüm 3.4'de verilen ekstraksiyon yöntemiyle ekstraksiyonları yapıldı. Ekstraksiyon sonrasında elde edilen çözeltilerin analizlerinde bulunan

değerlerinin standart çözeltilerden elde edilen değerlerle kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.23'de verildi.

Tablo 4.23. LC-MS yöntemi ile matriks etkisi

Eklenen (ng/mL)	1. Plazma		2. Plazma		3. Plazma	
	%GK	%BSS	%GK	%BSS	%GK	%BSS
5	94.91	7.94	95.45	5.90	93.64	7.09
50	96.99	1.72	94.72	2.34	95.14	3.97
200	95.90	0.78	96.42	1.66	97.43	2.28

GK: Geri kazanım; BSS: Bağıl standart sapma

4.11. İnterfere Etki (LC-MS)

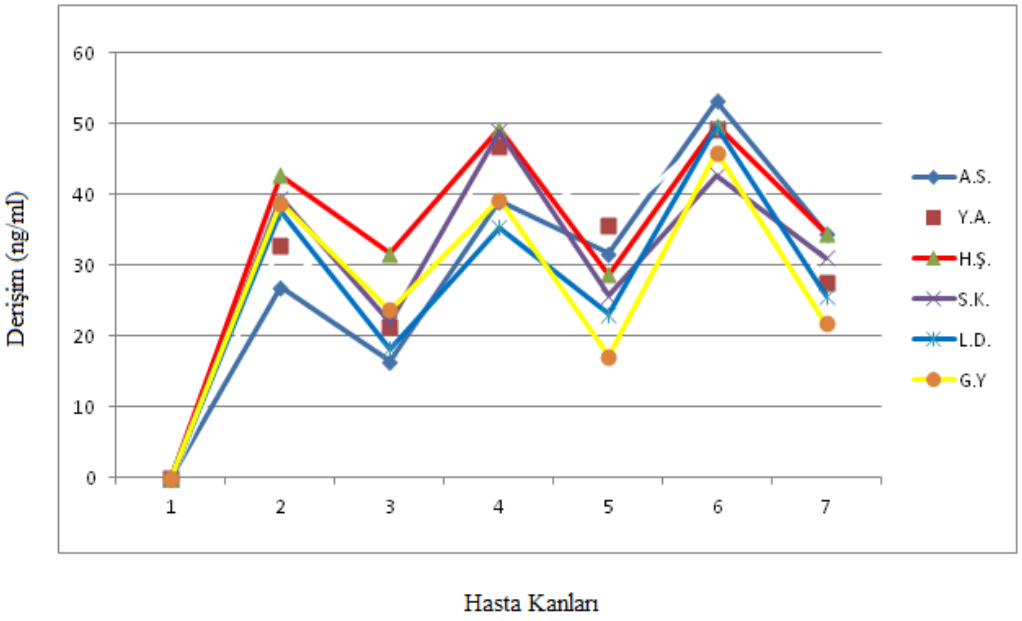
Olanzapin kullanılan hastalara ihtiyaç duyulduğunda verilebilen 10 farklı ilacın (ativan (lorazepam); anksiyolitik. secita (essitalopram okzalat); antidepresan, citoles; (essitalopram okzalat): antidepresan, lithuril (lityum karbonat); duygu durum düzenleyici, depakin (sodyum valproat): antiepileptik, norodol (haloperidol): antipsikotik, xanax (alprazolam): anksiyolitik, supradyn: multi vitamin, tetralet (tetrasiklin hidroklorür): antibiyotik, parol (parasetamol): ağrı kesici, ateş düşürücü) plazmada bulunabilecek maksimum derişimleri araştırılıp tespit edildikten sonra bu derişimdeki çözeltiler yukarıda belirtilen ilaçlardan hazırlanıp 0.5 mL plazmaya eklendi. Daha sonra plazmaya düşük, orta ve yüksek değerdeki kalite kontrol olanzapin çözeltileri (5, 50 ve 200 ng/mL) ve 50 ng/mL'lik IS çözeltisi eklendikten sonra karıştırılıp Bölüm:3.4'de belirtilen ekstraksiyon yöntemi ile ekstraksiyonları yapıldı. LC-MS yöntemi ile analizleri gerçekleştirildi. Elde edilen geri kazanım değerleri plazmadan elde edilen geri kazanım değeri ile kıyaslandı ve herhangi bir interfere etkiye rastlanmadı.

4.12. Geliştirilen Yöntemin Gerçek Numunelere Uygulanması

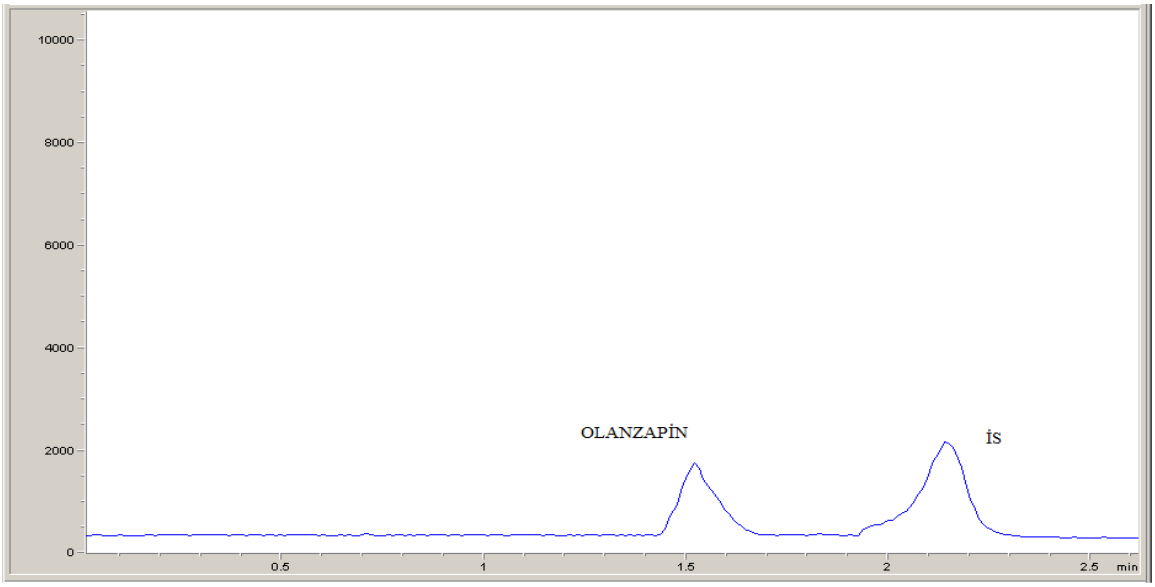
Geliştirilmiş ve geçerlilik testleri yapılmış LC-MS yöntemi, şizofreni tanısı almış hastaların plazmalarından olanzapin seviyesini belirlemek için kullanıldı. Hasta plazmaları Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği'nden sağlandı. Kliniğe şizofreni ve bipolar affektif bozukluk tanıları ile yatan toplam 6 hastaya 3 gün boyunca sabah saat 09:00'da günlük tek doz IM yolla 10 mg olanzapin içeren (Zyprexa, Lilly, Almanya) flakon enjekte edildi. Hastalardan 3 gün boyunca enjeksiyondan hemen önce ve enjeksiyondan 1 saat sonra, 4. günde ise enjeksiyondan 1 gün sonra yine saat 09:00'da olmak üzere toplam 7 kan alındı. Alınan kan numuneleri 4000 rpm de 5 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen plazmadan 0.5 mL alındı ve Bölüm 3.4'de verilen ektraksiyon prosesi uygulanıp olanzapin ekstrakte edildi ve LC-MS yöntemi ile 2. kandan itibaren (ilk enjeksiyondan sonraki kan) olanzapin miktar tayinleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar ve hasta özellikler Tablo 4.24'de, hasta kanlarındaki olanzapin derişimini gösteren grafik Şekil 4.34'de ve L.D. isimli hastanın 4. gününe ait kanına ait LC-MS kromatogramı ise Şekil 4.35'de verildi.

Tablo 4.24. Şizofreni ve bipolar affektif bozukluk tanısı alan hastaların özellikleri ile bu hastaların kan örneklerindeki olanzapin derişimleri

Hasta Adı	Yaşı	Cinsiyeti	Sigara Alışkanlığı	Olanzapin Derişimleri (ng/mL)					
				2.Kan	3.Kan	4.Kan	5.Kan	6.Kan	7.Kan
A.S.	33	K	YOK	26.79	16.37	39.03	31.61	53.14	34.50
Y.A.	40	K	YOK	32.80	21.43	46.86	35.65	49.11	27.50
H.Ş.	28	K	YOK	42.72	31.60	49.21	28.64	49.69	34.42
S.K.	29	E	YOK	39.52	21.79	48.92	25.70	42.75	30.96
L.D.	29	E	YOK	37.66	18.20	35.26	22.98	49.40	25.62
G.Y	40	K	YOK	38.87	23.65	39.19	17.09	45.89	21.71



Şekil 4.34. Hasta kanlarındaki olanzapin derişimleri



Şekil 4.35. LC-MS yöntemi ile ölçülen L.D. isimli hastanın 2. gününde alınan 4. kan örneğinin LC-MS kromatogramı

5. TARTIŞMA

Validasyon, bir analitik uygulamada, bir analiz yönteminin performans özelliklerinin, tasarlanmış amaçlara uygun olduğunu göstermek için yapılan işlemlerin tümüdür. Yöntem geliştirme ve validasyonda 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 tam bir validasyon deneylerini (geçerlilik testleri) yapmaktır. Deneylerden elde edilen analitiksel verilerin niteliği, yöntem geliştirme ve validasyon deneylerinin 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. Analitik yöntem seçimi yapıldıktan sonra da bu yöntemin uygulanabilir olduğunu göstermek için yöntemin geçerlilik testlerinin yapılması ve seçilen yöntemin bir değer ifade edebilmesi için de, yöntemin doğruluk, kesinlik, tekrarlanabilirlik, seçicilik, spesifiklik, hassaslık ve analiz süresinin kısa olması gibi geçerlilik test parametrelerinin incelenmesi gerekmektedir. Bu parametreler çalışılırken de bileşimi güvenilir bir şekilde bilinen bir veya daha fazla standart numune kullanılır. Kullanılan standart numunelerin hem bileşim bakımından hem de analit derişimi bakımından analizi yapılacak numune ile benzer olması gerekir.

İlaç analizlerinde, analizin yapılacağı ortama (farmasötik preparat veya biyolojik sıvılar) göre literatür bilgilerine de dayanarak analitik yöntem seçiminin yapılması gerekmektedir. Bu bilgiler ışığında yöntem seçimini gerçekleştirmeden önce iyi bir literatür taraması yapılmalıdır. Literatür taramasında olanzapinin farmasötik

preparatlarda ve biyolojik sıvılarda miktar analizine yönelik çalışmalara rastlanmış olup, literatür çalışmaları ışığı altında atipik antipsikotik bir ilaç olan olanzapinin hem farmasötik preparatlarda hem de plazmada miktar analizi için UV-Görünür Bölge Spektrofotometri, HPLC ve LC-MS yöntemleri geliştirilip validasyonları yapıldı.

Çalışmada kullanılan olanzapin standart etkin maddesi Dr. F. FRİK İlaç'tan (2011 yılında Recordati İlaç firması tarafından satın alındı) ve tablet başına 10 mg olanzapin içeren Olaxinn (Generica İlaç), Ollafax (Dr.F.Frik İlaç), Ozaprin (Ali Raif İlaç), Rexapin (Abdi İbrahim İlaç), Zyprexa (Lilly İlaç) adlı farmasötik preparatlar da serbest eczanelerden sağlandı.

Ultraviyole-Görünür Bölge Spektrofotmetresi, yüksek duyarlık, orta ve yüksek seçimlilik, yüksek doğruluk, kesinlik, kolaylık ve rahatlık bakımından ilaç endüstrisinde farmasötik preparatlarda ilaç etkin maddelerinin miktar analizinde tercih edilen tekniklerden biri olarak söylenebilir. Bu teknikte, UV-Görünür Bölge spektrumu, madde üzerine gönderilen ışığın dalga boylarına karşı absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile elde edilir. Yani A=f(×) fonksiyonudur. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri çalışmasında, olanzapinin 272 nm dalga boyunda maksimum absorbans verdiği tespit edildikten sonra çalışmanın optimum koşulları belirlendi. Yöntemin doğrusal olduğu 1-30 µg/mL derişim aralığında sekiz farklı derişimde (1, 2, 5, 8, 10, 20, 25, 30 µg/mL) olanzapin standart çalışma çözeltileri hazırlandı ve 272 nm dalga boyunda absorbansları belirlendi. Olanzapin çözeltilerinin derişimine karşı okunan absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edildi. Kalibrasyon eğrisinin regrasyon analizinden, regrasyon doğrusunun denklemi A_{272nm}=0.0648x+0.0007 (A: Absorbans, x: derişim) ve korelasyon katsayısı (r) 0.9997, LOD değeri 0.33 µg/mL ve LOQ değeri 1 µg/mL olarak belirlendi. Güniçi ve günler arası %BSS ve %BH değerlerinin sırasıyla %2.0 ve %4.0'den küçük olduğu, yöntemin

analitik geri kazanım değeride ortalama %100.8 olarak tespit edildi. Geliştirilip valide edilen yöntem ile 10 mg olanzapin etkin maddesi içeren Olaxinn, Ollafax, Ozaprin, Rexapin ve Zyprexa ticari isimli beş farklı farmasötik preparattan olanzapin miktar tayinleri yapılarak, yöntemin farmasötik preparatlara başarıyla uygulanabileceği gösterildi.

Olanzapin etkin maddesinin plazmalarda miktar tayini için UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yöntemi geliştirilip geçerlilik testleri yapıldı. Plazma çalışmasında, 2, 5, 8, 10, 20, 25 ve 30 μg/mL derişimlerde hazırlanan olanzapin standart çalışma çözeltileri 0.5 mL plazma üzerine eklenip (spike edilip) karıştırıldı ve Bölüm 3.4'de belirtildiği şekilde sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemiyle olanzapin plazmadan ekstraksiyonu yapıldı. Ekstraksiyon işlemi sonucunda elde edilen çözeltilerin UV-Görünür Bölge Spektrofotometre de 272 nm dalga boyunda spektrumları alındı ve absorbansları tespit edildi. Her bir çözeltinin derişimine karşı okunan absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edildi. Kalibrasyon eğrisinin regresyon analizinden, regresyon doğrusunun denklemi A_{272nm}=0.0694x-0.0057 ve korelasyon katsayısı (r) 0.9996, LOD değeri 0.7 μg/mL ve LOQ değeri 2.0 μg/mL olarak belirlendi. Güniçi ve günler arası %BSS ve %BH değerlerinin sırasıyla %1.0 ve %3.5'den küçük ve plazmadan olanzapinin ortalama geri kazanım değerinin ise %97.9 olduğu tespit edildi. Literatürdeki olanzapinin farmasötik preparatlarda miktar tayininde kullanılan UV-Görünür Bölge Spektrofotometri çalışmalarının birinde 292 nm dalga boyunda çalışılmış yöntemin 5–17.5 μg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu[70] ve ikinci yöntem de ise 258 nm dalga boyunda çalışılmış yöntemin 10–100 μg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu[71] tespit edilmiştir.

Kromatografi, karmaşık karışımlardaki kimyasal bileşimlerin ayrılması, tanınması ve tayininde çok yaygın olarak kullanılan bir yöntemler topluluğudur. Bu

yöntemler topluluğundan Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) ve Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (LC-MS) yöntemi doğruluk, kesinlik, tekrarlanabilirlik, seçicilik, duyarlılık ve sonuçların hızlı elde edilmesi gibi diğer yöntemlere göre birçok üstün yanlara sahiptirler. Ayrıca, HPLC ile LC-MS yönteminde nanogram seviyesinde bile miktar analizi yapılabilmektedir. Biyolojik sıvılarda farmakokinetik çalışmalarda düşük derişimlere inebilmek oldukça önemlidir. Bundan dolayı da ilaç endüstrisinde hem farmasötik preparatlarda hem de biyolojik sıvılarda ilaç analizlerinde HPLC ve LC-MS yöntemi oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. HPLC ve LC-MS çalışmalarında, sabit fazın özellikleri ve hareketli fazın bileşimi ayrılan maddenin kromatografik davranışına etki etmektedir. Bundan dolayı ayrımın iyileştirilmesi ve kabul edilebilir sonuçların alınabilmesi için kromatografik koşulların optimizasyonuna gerek duyulmaktadır.

Olanzapinin plazmadan ve beş farklı farmasötik preparatta miktar tayini için HPLC yöntemi geliştirildi ve valide edildi. HPLC çalışmasında, C_{18} (5 µm, 150 mm x 4.6 mm) ters faz kolon, metanol-asetonitril-%0.1'lik TFA içeren sudan (40:30:30, h/h/h) oluşan hareketli faz, 1 mL/dk akış hızı, UV dedektör ve 10 µL enjeksiyon hacmi çalışma parametreleri kullanıldı. Optimum koşullar belirlendikten sonra 0.25-40 µg/mL derişim aralığında internal standart eklenmiş olarak bir seri olanzapin standart çalışma çözeltileri (0.25, 0,5, 2,5, 5, 15, 20, 30 ve 40 µg/mL) hazırlandı ve HPLC sistemine enjekte edilerek kromatogramları alındı ve yöntemin bu derişim aralığında doğrusal olduğu belirlendi. HPLC çalışmasında 5 µg/mL derişiminde irbesertan internal standart (IS) olarak kullanıldı. Olanzapin derişimlerine karşı, IS ve olanzapin pik alan oranlarının grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon eğrisi elde edildi. Regrasyon doğrusunun denklemi y=0.0962x +0.0053 (y: pik alanı, ×: derişim), korelasyon katsayısı (r) ise 0.9990 olarak belirlendi. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.08 µg/mL ve 0.25 µg/mL

olarak tespit edildi. Yöntemin güniçi ve günler arası %BSS ve %BH değerlerinin sırasıyla %1.0 ve %5.0'den küçük olduğu tespit edildi. Farmasötik preparatlarda olanzapinin analitik geri kazanım çalışmaları standart ekleme yöntemine göre ortalama %101.1 olduğu tespit edildi. Yöntem geliştirilip valide edildikten sonra uygulaması olarak 10 mg/tablet olanzapin etkin maddesi içeren beş farklı farmasötik preparatta (rexapin, olaxinn, ozaprin, ollafax, zyprexa) olanzapin miktar tayinleri yapıldı.

Olanzapin etkin maddesinin plazmada miktar tayini için HPLC yöntemi geliştirilip geçerlilik testleri yapıldı. 0.25-40 μg/mL derişim aralığında hazırlanan olanzapin standart çalışma çözeltileri ve 5 μg/mL derişimde IS uygun miktarlarda 0.5 mL boş insan plazmasına eklendi ve Bölüm 3.4'de verilen ekstraksiyon yöntemiyle ekstrakte edildi. Elde edilen çözeltiler HPLC sistemine enjekte edilerek kromatogramları alındı pik alan oranları belirlendi. Olanzapin plazma çözeltilerinin derişimine karşı, IS (5 μg/mL) ve olanzapin pik alan oranlarının grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon eğrisi elde edildi. Yöntemin 0.25-40 μg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu tespit edildi. Elde edilen regrasyon doğrusunun denklemi y=0.0814x+0.0027 (x:olanzapin derişimi ve y:IS ve olanzapin pik alan oranı), korelasyon katsayısı (r) ise 0.9976 olarak belirlendi. LOD ve LOQ değerleri 0.10 μg/mL ve 0.25 μg/mL olarak; güniçi ve günler arası %BSS ve %BH değerlerinin sırasıyla %1.5 ve %2.5'den küçük olduğu, olanzapinin plazmadan ortalama geri kazanım değerinin %99.2 olduğu belirlendi.

Olanzapinin plazmada ve farmasötik preparatlarda miktar tayini için LC-MS yöntemi de geliştirilip validasyonları yapıldı. LC-MS çalışmasında Bölüm 3.3.3. de belirtilen çalışma parametreleri kullanıldı. Optimum koşullar belirlendikten sonra standart LC-MS yönteminin 2-300 ng/mL derişim aralığında doğrusal olduğu belirlendi. Bu derişim aralığında bir seri standart (2, 10, 25, 75, 100, 150, 250 ve 300 ng/mL)

olanzapin çözeltileri hazırlandı ve bu çözeltilere 50 ng/mL derişiminde IS eklendi. Elde edilen çözeltiler LC-MS sistemine enjekte edilerek kromatogramları alındı ve olanzapin çözeltilerinin derişimine karşı, IS ve olanzapin pik alan oranlarının grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon eğrisi elde edildi. Regrasyon doğrusunun denklemi y=0.0365x+0.2235 (y: pik alanı, ×: derişim), korelasyon katsayısı (r) ise 0.9995 olarak belirlendi. Yöntemin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.7 ng/mL ve 2.0 ng/mL, güniçi ve günler arası %BSS ve %BH değerlerinin sırasıyla %4.5 ve %2.0'den küçük olduğu, standart ekleme yöntemine göre belirlenen ortalama analitik geri kazanım değerinin %100.2 olduğu tespit edildi. Geliştirlen ve valide edilen yöntem olanzapine içeren beş farklı tablette (rexapin, olaxinn, ozaprin, ollafax, zyprexa) miktar tayini için başarıyla uygulandı.

Plazma çalışmasında LC-MS yönteminin 2-300 ng/mL derişim aralığında doğrusal olduğu tespit edildi. 50 ng/mL derişimde IS içeren bir seri hazırlanan olanzapin plazma çözeltileri LC-MS sistemine enjekte edilerek kromatogramları alındı ve pik alan oranları belirlendi. Olanzapin plazma çözeltilerinin derişimine karşı, IS ve olanzapin pik alan oranlarının grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon eğrisi elde edildi ve elde edilen regrasyon doğrusunun denklemi y=0.035x+0.2696, korelasyon katsayısı (r) ise 0.9993 olarak belirlendi. Yöntemin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.9 ng/mL ve 2.0 ng/mL, güniçi ve günler arası %BSS ve %BH değerlerinin sırasıyla %3.5 ve %1.5'den küçük ve plazmadan ortalama geri kazanım değerinin %99.8 olduğu belirlendi.

Farklı kan merkezlerinden [Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Alma merkezinden (1.plazma), Erzurum Kızılay Kan Alma Merkezinden (2.plazma) ve Erzurum BölgeEğitim ve Araştırma Hastanesi Kan Alma Merkezinden (3.plazma)] temin edilen plazmalarda yöntemin matriks etkisi incelendi ve sonuçlar yüzde geri

kazanım olarak verildi. Çalışma sonucunda herhangi bir matriks etkisinin olmadığı sonucuna varıldı.

Olanzapin etkin maddesinin plazma çözeltilesinde analiz boyunca hangi ortamlarda ne kadar süre ile bozunmadan stabil kaldığını belirlemek amacıyla stabilite hem HPLC çalışmasında hem de LC-MS yöntemleri ile stabilite çalışmaları yapıldı. Elde edilen sonuçlar FDA rehberinde belirtilen kurallara göre (ortalamanın ± %10) değerlendirildi. HPLC çalışmasında 1 µg/mL derişimdeki olanzapinin plazma çözeltisi oda sıcaklığında 24 saat stabil kaldığını, diğer derişimlerde ki olanzapin plazma çözeltilerinin tüm ortamlarda ve bekletilme sürelerinde stabilitesini koruduğu ve 3 kez plazmaların donma-çözme işleminin yapılabileceği gözlenmiştir. LC-MS çalışmasında, 200 ng/mL derişimdeki olanzapin plazma çözeltisinin oda sıcaklığında 24 saat stabil kalırken, diğer çözeltilerin (5 ve 50 ng/mL) stabilitesini oda sıcaklığında kaybettiği, bunun yanında tüm plazma çözeltilerinin belirtilen ortam ve zamanlarda stabil kaldığı ayrıca tüm çözeltilere 3 kez donma-çözme işleminin yapılabileceği sonucuna varıldı. Yapılan literatür taramasında Olesen OV ve arkadaşları[22] olanzapinin düşük derişimlerinin (4.69, 15.62 ve 46.9 ng/mL) %0.25 askorbik asit eklenerek oda sıcaklığında 24 saat, +4 °C'de ise 1-2 hafta stabil olduğunu fakat askorbik asit eklemeden geri kazanım değerlerinin %40-45 oranında düştüğünü belirtmiştir. Zhoua ve arkadaşları[34] da askorbik asitin olanzapinin stabilitesini arttırdığını savunurken Dusci ve arkadaşları[27] askorbik asidin koruyucu özelliğinin olmadığını aksine geri kazanım değerini düşürdüğünü belirtmişlerdir ve 33 ile 90 ng/mL derişimdeki olanzapin içeren plazma numunelerinin 14 gün +4 °C'de, -20 °C'de ise 3 ay stabil olduğunu belirtmişlerdir. Zhoua ve ark.[34] yaptıkları stabilite çalışmalarında C vitamin eklendiğinde 0.99, 14.8 ve 49.5 ng/mL derişimdeki olanzapin çözeltilerinin +20 °C'de 24 saat, -20 °C'de de 1 ay stabil olduğu fakat C vitamini eklenmeden stabilitenin düşük

olduğunu belirtmiştir. Saracino ve arkadaşları[40] da olanzapinin plazmadaki 0.1, 25, 50 ng/mL derişimdeki çözeltilerinin oda sıcaklığında 5 saat, -80 °C'de 12 ay stabil olduğunu belirtmişlerdir. Nirogi ve ark.[47] olanzapinin 1 mg/mL stok solüsyonunun +4 °C'de 4 ay süre ile stabil olduğunu, 0.3 ile 25 ng/mL derişimdeki olanzapin içeren plazma çözeltilerinin 3 defa dondurup-çözme yapıldığında, 24 saat oda sıcaklığında, 24 saat oto örnekleyicide ve 21 gün -50 °C'de stabil olduğunu belirtmişlerdir. Titier ve ark.[54] olanzapinin 30, 200 ve 600 ng/mL derişimlerdeki ilaç çözeltilerinin stabilitesine bakmışlar ve +4 °C'de 72 saat, -20 °C'de 30 gün, +20 decede 24 saat stabil olduğunu ve 3 kere donma-çözme yapılabileceğini belirtmişlerdir. Choong ve ark.[55] olanzapinin plazmadaki düşük derişimin (6 ng/mL) oda sıcaklığında 24 saat stabil olduğunu fakat 72 saat sonra oda sıcaklığında ve +4 °C'de stabilitesini kaybettiğini, 1 kez donma-çözme yapılabileceğini belirtmişler. Yüksek derişimdeki ise (170 ng/mL) olanzapin plazma çözeltilerinin oda sıcaklığında ve +4 °C'de 72 saat boyunca stabilitesini koruduğunu, 3 kez donma-çözme yapılabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca her iki çözeltinin -20 °C'de 2 ay stabil olduğunu belirtmişlerdir. Ravinder ve ark.[63] olanzapinin 0.15 ve 20 ng/mL derişimdeki plazma çözeltilerinin 5 saat 22 dakika oda sıcaklığında, 24 saat -10 °C'deki oto örnekleyicide, 22 gün -70 °C'de saklanabileceğini ve 3 kez donma-çözme yapılabileceğini belirtmişlerdir. Bonde ve ark.[64] olanzapinin 0.3 ve 15 ng/mL derişimdeki plazma çözeltilerinin 21 gün -20 °C'de, 58 saat oto örnekleyicide, 6 gün -80 °C'de, 7 saat oda sıcaklığında stabil olduğunu ve 5 kez donma-çözme yapılabileceğini belirtmişlerdir. Ansermot ve ark.[65] olanzapinin 1.5 ve 160 ng/mL derişimdeki plazma çözeltilerinin oda sıcaklığında ve +4 decede 72 saat, -20 °C'de 3 ay stabil olduğunu ve 3 defa donma çözme yapıldığında stabilitesinin bozulmadığını belirtmişlerdir. Bu veriler doğrultusunda olanzapin içeren düşük derişimlerdeki (50 ng/mL ve altı) plazma çözeltilerinin oda sıcaklığında stabilitesinin azaldığı[22,34,40,63,64] ve olanzapin içeren

plazma çözeltilerine 3 kez donma-çözme işleminin yapıldığında stabilitesinin kaybolmadığı[24,55,63-65] sonucuna varılmıştır.

Şizofreni hastaları olanzapin etkin maddesini içeren ilaçları kulanmaları esnasında çeşitli ağrı kesici, ateş düşürücü, antibiyotik, diğer antidepresan ve antipsikotik ilaçlarıda kullanabilmektedirler. Hasta kanlarında olanzapin miktar analizi yapılması esnasında bu ilaçların interfere etkiya sahip olup olmadıkları hem HPLC yöntemiyle hem de LC-MS yöntemiyle belirlenmeye çalışıldı. Deneysel kısımda belirtilen ilaçların herhangi bir interfere etkiye sahip olmadığı belirlendi.

LC-MS yönteminin gerçek numunelere uygulanması çalışmalarında, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği'nde şizofreni ve bipolar affektif bozukluk tanıları ile yatan toplam 6 hastaya, 3 gün boyunca sabah saat 09:00'da günlük tek doz IM yolla 10 mg olanzapin içeren (Zyprexa, Lilly, Almanya) flakon enjekte edildi. Hastalardan 3 gün boyunca enjeksiyondan hemen önce ve enjeksiyondan 1 saat sonra, 4. günde ise enjeksiyonda 1 gün sonra yine saat 09:00'da olmak üzere toplam 7 kez kan alındı. Alınan kan numuneleri 4000 rpm de 5 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen plazmadan 0.5 mL alındı ve Bölüm 3.4'de verilen ektraksiyon prosesi uygulanıp olanzapin ekstrakte edilerek LC-MS yöntemi ile miktar tayini yapıldı ve olanzapin plazma derişim değerlerinin 16.37 ile 49.69 ng/mL arasında olduğu bulundu. Araştırılan literatür bilgisine göre günlük 5-40 mg oral olanzapin alan hastaların plazma olanzapin derişimlerinin 1.86-110.89 ng/mL arasında olduğu[45] ve 7 gün sonra plazma olanzapin derişiminin sabit hale geldiğini[37], 5 mg oral olanzapinin alan hastalarda ortalama plazma olanzapin C_{max} değeri 4.54±1.43 ng/mL iken 5 mg IM olanzapin alan hastalarda ortalama plazma olanzapin C_{max} değeri 23.7 ng/mL olduğu belirtmişlerdir.[88] Olanzapinin plazma derişim seviyesinin sigara kullanımında azaldığını[44,46] buna karşın Bachmann ve arkadaşları[45] ise sigara kullanımının plazma

olanzapin seviyesine etki etmediğini sadece alınan dozla ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Olesen ve ark.[22] günlük 5-22.5 mg olanzapin kullanan hastaların plazmalarındaki olanzapin miktarının 4-55 ng/mL arasında olduğunu, Dusci ve ark.[27] günlük 5-40 mg olanzapin alan hastaların plazmalarında ölçülen olanzapin derişimlerinin 3-122 ng/mL arasında olduğunu, Mauri ve ark.[31] günlük 5 ile 20 mg olanzapin alan hastaların plazma olanzapin seviyelerinin 5 ile 120 ng/mL arasında olduğunu, Zhu ve ark.[32] gönüllü kişilere tek doz ağızdan 20 mg olanzapin verdikten sonra plazmalarındaki ortalama olanzapin derişiminin 113.7±33.1 ng/mL olduğunu, Boulton ve ark.[33] 25 yaşında, 72 kg ağırlığındaki sağlıklı gönüllüye ağızdan verilen tek doz 5 mg olanzapinin plazmadaki derişiminin 6.8 ng/mL olduğunu, Zhoua ve ark.[34] 2 şizofreni hastasına 10 mg ağızdan verilen olanzapinin 5 saat sonraki plazma derişimlerinin 22 ve 18.3 ng/mL olduğunu, 24 saat sonraki olanzapin plazma derişimlerini ise 8.2 ve 4.8 ng/mL olduğunu, Bergemann ve ark.[37] günlük ortalama 17.5 mg oral olanzapin alan hastaların plazma olanzapin derişiminin 54.2 ng/mL, günlük 5 ile 40 mg arasında olanzapin alan hastaların plazma olanzapin derişiminin ise 1.2 ile 208 ng/mL arasında olduğunu, Gervasini ve ark.[38] günlük 5 mg ve 10 mg oral olanzapin alan 17 şizofreni hastasının plazmalarındaki olanzapin derişiminin 0.8-71 ng/mL arasında olduğunu, D'Arrigo ve ark.[39] 10 mg olanzapin kullanan 86 hastanın plazmalarında ölçülen ortalama olanzapin derişiminin 21 ng/mL olduğunu, Saracino ve ark.[40] günlük 20 mg olanzapin alan hastanın plazmasındaki olanzapin derişiminin 26.8 ng/mL olduğunu, Theisen ve ark.[44] günlük ortalama 12.5 mg olanzapin kullanan şizofreni hastalarının serumlarındaki ortalama olanzapin derişiminin 37.7 ng/mL, günlük ortalama 7.5 mg olanzapin kullanan anorexia nevroza hastalarının serum olanzapin derişimlerinin ise ortalama 18.7 ng/mL olduğunu, Wu ve ark.[46] günlük tek doz 10 mg oral olanzapin kullanan hastaların plazmalarındaki C_{max} değerinin sigara

içenler de 9.3±4.3 ng/mL, sigara içmeyenler de 26.7±13.7 ng/mL olduğunu, Eishafeey ve ark.[48] 24 sağlıklı gönüllü erkeğe 10 mg olanzapin içeren 2 ayrı ticari preparat verildikten olanzapin plazma C_{max} değerlerinin 11.60±4.08 ng/mL ve 13.07±4.47 ng/mL olduğunu, Markowitz ve ark.[49] 5 mg olanzapin içeren 3 farklı ticari ilaç 7 gönüllü erkeğe verildikten sonra olanzapin plazma Cmax değerlerinin 7.09± 2.15 ng/mL, 7.10±2.97 ng/mL ve 6.82±1.54 ng/mL olduğunu, Sachse J ve ark.[56] 20 mg olanzapin alan 120 şizofreni hastasının serumlarında ortalama 48±27 ng/mL derişiminde olanzapin olduğunu, Lu ve ark.[67] günlük 5-20 mg olanzapin kullanan 48 şizofreni hastalasının plazmalarındaki ortalama olanzapin derişiminin 35.46±24.12 ng/mL olduğunu, Urinovska ve ark.[68] günlük 7.5 ile 30 mg arasında olanzapin alan hastaların serumlarında 6 saat sonra ölçülen olanzapin derişiminin 4.9 ile 46.6 ng/mL arasında olduğunu belirtmişlerdir. Olanzapinin plazmadaki derişiminin tayini için yapılan bu çalışmaların hepsi olanzapinin oral formu üzerine yapılmış olup IM formu üzerine yapılan sadece bir çalışmaya rastlanmış olup, o çalışmada ilacı üreten firma tarafından yapılan test çalışmasıdır.[88]

Yapılan literatür araştırmasında olanzapinin plazmadan, serumdan, idrardan ve farmasötik preparatlardan miktar tayininde HPLC yöntemi[21-27,29,31-33,36,37,39-44,46,50-54,56,62,66,67,69,70], LC-MS yöntemi[34,38,49,55], UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yöntemi[70,71], LC-MS/MS yöntemi[30,35,47,48,57-59,63-65,68,72,73], GC yöntemi[28,60] ve GC-MS/MS yönteminin[61] kullanıldığı bilgisine ulaşılmıştır. HPLC yönteminde dedektör olarak ED dedektör[21,23,29,36,37,46,51,62], UV dedektör[22,24-27,33,39,41-43,50,52,53,56,66,70], DAD dedektör[40], kütle dedektör[30,34,35,38,47,48,49,55,57-59,63-65,68,72,73], kolumetrik dedektör[40,67] kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda hareketli faz olarak olarak metilen klorit-pentan[21], pH:9.9'a 50 mM amonyum asetatla ayarlanmış su ve metanol[22], 5 mM pH:7 sodyum fosfat-metanol-asetonitril[23], 13.5 mM pH:2 fosfat tamponu-asetonitril[24], asetonitril-

tetraetilamonyum[25], asetonitril-su-tetrametiletilendiamin[26], hekzan-diklorometan[27], metanol-asetonitril-7.8 mmol/L trietilamin içeren 8.9 mmol/L fosfat tamponu[29], asetonitril-%0.1 formik asitli su[30], metanol-asetonitril-%65, 50 mM pH:6'da fosfat tamponu[33], (10 mmol/l amonyum asetat, 2.7 mmol/l formik asit) asetonitril[34], metanol-pH:3.9'da 5mM asetat tamponu[35], asetonitril-pH:3.8'de fosfat tamponu[36], su-metanol-asetonitril-trietilamin[37], %1 formik asit içeren su-asetonitril[38], 0.009 M eptansülfonik asit sodyum tuzu ve 0.06 M potasyum fosfat monobazik (pH:2.7) içeren su-asetonitril[39], metanol-pH:3.5'de 50 mM fosfat tamponu[40], fosforik asit ile ph:5.6'ya ayarlanmış 0.05 M fosfat tamponu ve asetonitril[41], pH:2.5'de amonyum fosfat tamponu-metanol[42], pH:6.8'e trietilamin ile ayarlanmış 9.5 mM sodyum dihidrojen fosfat-asetonitril-metanol[43], 10 mM amonyum asetat tamponu- asetonitril[47], %0.1 formik asit ile asitlendirilmiş 0.02 M amonyum asetat tamponu ve asetonitril[48], %0.5 ortofosforik asit ile pH:4'e ayarlanmış 75 mM potasyum dihidrojen fosfat tamponu[50], pH:4.5'e trifloro asetik asit ile ayarlanmış %0.25'lik amonyum asetat tamponu ve asetonitril[52], 0.032 M amonyum asetat tamponu-asetonitril-metanol[53], 50 mM fosfat tamponu ve asetonitril[54], %25 amonyum hidroksit ile pH:8.1'e ayarlanmış 20 mM amonyum asetat tamponu ve asetonitril[55], %95'lik asetik asit ile pH:6.5'e ayarlanmış su-asetonitril-tetrametil etilendiamin[56], metanol ve amonyum asetatın[58], %0.05'lik çinko sülfat bulunan asetonitril-metanol[59], %1'lik trietilamin içeren diklorometan-hekzan[60], fosfat tamponu (pH:7, 75 mM)-metanol-asetonitril[62], amonyum asetat tamponu (pH:5, 5 mM)-asetonitril[63], metanol-2 mM amonyum asetat tamponu[64], 10 mM amonyum format tamponu-asetonitril[65], asetik asit ile pH:3.73'e ayarlanmış %0.3'lük trietil amin içeren su-metanol[66], mM pH:5.7 fosfat tamponu-asetonitril-metanol[67], %5'lik asetonitril içerisinde %1'lik formik asit ve 2 mM amonyum asetat tamponu[68], fosfat tamponu (pH:4.0)-asetonitril-trietilamin[70], asetonitril-10 mM amonyum asetat tamponu[72,73]

kullanılmıştır. Araştırılan literatür bilgisine göre çoğunlukla tampon içeren hareketli fazlar kullanılmış[22,23,24,29,33,34,35,36,39,40,41,42,43,47,48,50,52,53,54,55,58,63,65,67,68,70,72,73] olup tampon kullanılmadan yapılan HPLC ve LC-MS yöntemlerine[21,25,26,27,30,37,38,56,59,60,66,69] de rastlanılmıştır. Tampon kullanmak hem kolona zarar verebileceğinden, hemde kimyasal malzeme ve zaman kaybına yol açacağından bizim çalışmamızın avantajını ortaya koymaktadır. Çalışmamızda HPLC yönteminde olanzapinin alıkonma zamanı 1.28 dakika, IS'ın alıkonma zamanı ise 2.58 dakika olarak bulunmuştur. Araştırılan literatürlere göre hareketli fazda ister tampon kullanılsın[22,24,33,39,43,50,52-54,70], ister kullanılmasın[25,26,27,56,66,69] HPLC çalışmalarında olanzapinin plazmadan ve farmasötik praparatlardan tayininde alıkonma zamanının en düşük olduğu çalışma bizim çalışmamızdır. Alıkonma zamanının düşük olması hem zaman, hemde kullanılan kimyasal malzemeler açısından tasarruf sağladığından büyük bir öneme sahiptir. LC-MS yönteminde de yine tampon kullanılmadığı ve 3 dakika (1.51 dakika olanzapin, 2.15 dakika IS) gibi çok kısa bir analiz süresine sahip olduğu için çok kullanışlı bir yöntem olduğu ortaya koyulmuştur. Çalışmamızda her üç yöntem (UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yöntemi, HPLC yöntemi ve LC-MS yöntemi) için de plazmadan olanzapini ekstrakte etmek için sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi kullanıldı ve herhangi bir ön hazırlama veya ön ayırma işlemi gerektirmeden olanzapin belirlendi. Çalışmamızda olanzapini plazmadan ekstrakte etmek için kullandığımız diizopropil eter taranan literatürlere[21-73] göre ilk defa bizim çalışmamızda kullanılmış olup yüksek geri kazanım sağladığından dolayı olanzapinin plazmadan ekstaksiyonlarında kullanılabilir olduğu gösterilmiştir. Ayrıca IS olarak kullandığımız irbesartan da taranan literatürlere[21-73] göre yine ilk defa bizim çalışmamızda kullanılmış olup plazmadan ve farmasötik preparattan olanzapin tayininde HPLC ve LC-MS yöntemlerinde literatürlerde kullanılan internal standartlara ek olarak kullanılabileceği gösterilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde psikyatride büyük bir öneme sahip olan ve başta şizofreni olmak üzere şizoaffektif bozukluğun akut alevlenmesinde ve sürdürüm sağaltımında, bipolar bozukluğun manik atağında ve akut sürdürüm sağaltımında, demansta görülen psikotik belirtilerde, Tourette sendromunda ve seçici seratonin geri alım inhibitörleri ile birlikte travma sonrası stres bozukluğunda, otizmde ve anoreksiya nevroza hastalarında kilo artışı sağlamada etkili olduğu belirtilen ve hem serotonin hem de dopamin reseptörleri üzerinde antagonistik etki gösteren olanzapin; hematolojik yan etkilerinin olmaması ve negatif belirtiler üzerinde klasik antipsikotiklere göre daha etkili olması, EPS yan etkilerinin klasik antipsikotiklere göre az olması nedenlerinden dolayı şizofreni ve diğer psikozların tedavisinde kullanılan atipik-antipsikotik bir ilaçtır. Çalışmamızda psikiyatride çok geniş bir kullanım alanına sahip olan olanzapinin beş farklı farmasötik preparattan (rexapin, olaxinn, ozaprin, ollafax, zyprexa) ve insan plazmasından miktar tayininde UV-Görünür Bölge Spektrofotometri, HPLC ve LC-MS yöntemleri geliştirilmiş ve daha sonra geliştirilip geçerlilik testleri yapılan yöntemlerden LC-MS yöntemi ile şizofreni tanısı almış hastaların plazmalarından olanzapinin miktar tayini gerçekleştirilmiş ve sonuç olarak geliştirilip geçerlilik testleri yapılan yöntemlerin hassas, basit ve hızlı olduğu, kalite kontrol ve klinik çalışmalarda uygulanabilir olduğu gösterilmiştir. Hastanelerde olanzapin kullanan hastaların plazmalarındaki olanzapin miktarı rütin olarak belirlenmemektedir. Hastanelerde olanzapini tayin edebilecek LC-MS gibi cihazların olması ve varsa da rütin biyokimyasal parametreler gibi olanzapinin belirlenmesi olanzapinin diğer enzim ve hormonlar üzerine olan etkisini, hastanın tedaviye verdiği cevabı, metabolik sendrum ve kilo artışı üzerine olan etkisini ortaya koyabileceğinden yararlı olacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Yüksel N. *Psikofarmakoloji,* 2. Baskı. Ankara, Çizgi Tıp Yayınevi, 2003:1-154.

2. Köroğlu E, Güleç C. *Psikiyatri Temel Kitabı,* 2. Baskı. Ankara, HYB Basım Yayın, 2007:184-654.

3. http://en.wikipedia.org/wiki/Olanzapine (Erişim Tarihi: 16.12.2013)

4. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. *Goodman&Gilman The Pharmacological Basis of Treatment.* Çeviri: Süzer Ö. *Goodman&Gilman Tedavinin Farmakolojik Temeli*, İstanbul. Nobel Tıp Kitabevleri, 2009:461-492.

5. Callaghan JT, Bergstrom RF, Ptak LR, Beasley CM. Olanzapine. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile. *Clinical Pharmacokinetics,* 1999, 37:177–193.

6. Ceylan ME, Çetin M. *Araştırma ve Klinik Uygulamada Biyolojik Psikiyatri Şizofreni*, 4. Baskı. İstanbul, İncekara Kağıt Matbaa, 2009:907-1117.

7. Yazıcı AE, Yazıcı K. *Atipik Antipsikotikler*. Mersin Üni. Tıp Fak. Dergisi, 2001, 2:210-219.

8. Gülseren L, Erol A. Şizofrenide İlaç Sağaltımı. *Klinik Psikofarmokoloji Bülteni,* 2000, 10:213-227.

9. By American Psychiatric Association Dsm IV: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. USA. *American Psychiatric Publisher*, 1994, 152.

10. Evren EC. Olanzapin; yeni atipik antipsikotik. *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni,* 1998, 8:74-80.

11. Beasley CM Jr, Tollefson G, Tran P, Satterlee W, Sanger T, Hamilton S. Olanzapine versus placebo and haloperidol: acute phase results of the North American double-blind olanzapine trial. *Neuropsychopharmacology,* 1996, 14:111-123.

12. Baldwin DS, Montgomery SA. First clinical experience with olanzapine (LY 170053): results of an open-label safety and dose-ranging study in patients with schizophrenia. *International Clinical Psychopharmacology*, 1995, 10:239-44.

13. Beasley CM Jr, Tollefson GD, Tran PV. Efficacy of olanzapine: an overview of pivotal clinical trials. *Journal of Clinical Psychiatry*, 1997, 58:7-12.

14. Beasley CM Jr, Sanger T, Satterlee W, Tollefson G, Tran P, Hamilton S. Olanzapine versus placebo: results of a double-blind, fixed-dose olanzapine trial. *Psychopharmacology*, 1996, 124:159-67.

15. Beasley CM, Hamilton SH, Crawford AM, Dellva MA, Tollefson GD, Tran PV, Blin O, Beuzen JN. Olanzapine versus haloperidol: acute phase results of the international double-blind olanzapine trial. *European Neuropsychopharmacology*, 1997, 7:125-137.

16. Tollefson GD, Beasley CM Jr, Tran PV, Street JS, Krueger JA, Tamura RN, Graffeo KA, Thieme ME. Olanzapine versus haloperidol in the treatment of schizophrenia and schizoaffective and schizophreniform disorders: results of an international collaborative trial. *American Journal of Psychiatry*, 1997, 154:457-465.

17. Casey DE. Clozapine: neuroleptic-induced EPS and tardive dyskinesia. *Psychopharmacology*, 1989, 47-53.

18. Nemeroff CB. Dosing the antipsychotic medication olanzapine. *Journal of Clinical Psychiatry*, 1997, 58:45-49.

19. Fulton B, Goa KL. Olanzapine. A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in the management of schizophrenia and related psychoses. *Drugs*, 1997, 53:281-98.

20. Weiden PJ. Olanzapine: a new atypical antipsychotic. *Journal of Practical Psychiatry&Behavioral Health,* 1997, 49-53.

21. Aravagiri M, Ames D, Wirshing WC, Marder SR. Plasma Level Monitoring of Olanzapine in Patients With Schizophrenia: Determination by High-Performance Liquid Chromatography With Electrochemical Detection. *Therapeutic Drug Monitoring,* 1997, 19:307-313.

22. Olesen OV, Linnet K. Determination of olanzapine in serum by high-performance liquid chromatography using ultraviolet detection considering the easy oxidability of the compound and the presence of other psychotropic drugs. *Journal of Chromatography B,* 1998, 714:309–315.

23. Catlow JT, Barton RD, Clements M, Gillespie TA, Goodwin M ve Swanson SP. Analysis of olanzapine in human plasma utilizing reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography B,* 1995, 668:85–90.

24. Raggi MA, Casamenti G, Mandrioli R, Fanali S, De Ronchi D, Volterra V. Determination of the novel antypsychotic drug olanzapine in human plasma using HPLC with amperometric detection. *Chromatographia*, 2000, 51:562-566.

25. Raggi MA, Casamenti G, Mandrioli R, Izzo G, Kenndler E. Quantitation of olanzapine in tablets by HPLC, CZE, derivative spectrometry and linear voltammetry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2000, 23: 973–981.

26. Weigmann H, Hartter S, Maehrlein S, Kiefer W, Kramer G, Dannhardt G, Hiemke C. Simultaneous determination of olanzapine, clozapine and demethylated metabolites in serum by on-line column-switching high-

performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 2001, 759:63–71.

27. Dusci LJ, Hackett LP, Fellows ML, Ilett KF. Determination of olanzapine in plasma by high-performance liquid chromatography using ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography B*, 2002, 773:191–197.

28. Torre CS, Martınez MA, Almarza E. Determination of several psychiatric drugs in whole blood using capillary gas–liquid chromatography with nitrogen phosphorus detection: comparison of two solid phase extraction procedures. *Forensic Science International*, 2005, 155:193–204.

29. Raggi MA, Mandrioli R, Sabbioni C, Ghedini N, Fanali S, Volterra V. Determination of olanzapine and desmethylolanzapine in the plazma of schizophrenic patients by means of an improved HPLC method with amperometric detection. *Chromatographia*, 2001, 54:203-207.

30. Kollroser M, Schober C. Direct-injection high performance liquid chromatography ion trap mass spectrometry for the quantitative determination of olanzapine, clozapine and N-desmethylclozapine in human plasma. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2002, 13:1266–1272.

31. Mauri MC, Steinhilber CPC, Marino R, Invernizzi E, Fiorentini A, Cerveri G, Baldi ML, Barale F. Clinical outcome and olanzapine plasma levels in acute schizophrenia. *European Psychiatry*, 2005, 20: 55–60.

32. Zhu J, Yang H, Liu WZ. Reversed phase high-performance liquid chromatography for determination of plasma olanzapine and pharmacokinetics of olanzapine in healthy Chinese volunteers. *Journal of Southern Medical University*, 2006, 26:1327-1329.

33. Boulton DW, Markowitz JS, Devane LC. A high-performance liquid chromatography assay with ultraviolet detection for olanzapine in human plasma and urine. *Journal of Chromatography B*, 2001, 759:319–323.

34. Zhou Z, Li X, Li K, Xie Z, Cheng Z, Peng W, Wang F, Zhu R, Li H. Simultaneous determination of clozapine, olanzapine, risperidone and quetiapine in plasma by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2004, 802:257–262.

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

36. Raggi MA, CasamentI C, MandriolI R, Volterra V. A sensitive high performance liquid chromatographic method using electrochemical detection for the analysis of olanzapine and desmethylolanzapine in plasma of schizophrenic patients using a new solid-phase extraction procedure. *Journal of Chromatography B*, 2001, 750:137–146.

37. Bergemann N, Frick A, Parzer P, Kopitz J. Olanzapine plasma concertration, average daily dose, and ınteraction with co-medication in schizophrenic patients. *Pharmacopsychiatry*, 2004, 37:63-68.

38. Gervasini G, Vizcaıno S, Herraiz AG, Benitez J, Carrillo JA. Applicability of an Assay for Routine Monitoring of Highly Variable Concentrations of Olanzapine Based on HPLC with Mass Spectrometric Detection. *Clinical Chemistry*, 2003, 49: 2088-2091.

39. D'Arrigo C, Migliardi G, Santoro V, Spina E. Determination of Olanzapine in Human Plasma by Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography With Ultraviolet Detection. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2006, 28:388–393.

40. Saracino MA, , Koukopoulos A, Sani G, Amore M, Raggi MA. Simultaneous High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Olanzapine and Lamotrigine in Plasma of Bipolar Patients. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2007, 29: 773–780.

41. Shah CR, Shah NJ, Suhagia BN, Patel NM. Simultaneous Assay of Olanzapine and Fluoxetine in Tablets by Column High-Performance Liquid Chromatography and High-Performance Thin-Layer Chromatography. *Journal of AOAC İnternatıonal*, 2007, 6:1573-1578.

42. Prameela RA, Bala SC. Development Of Hplc Method For The Determınatıon Of Olanzapıne In Bulk And Dosage Forms. *International Journal of PharmTech Research*, 2009, 3:654-657.

43. Reddy BV, Reddy KS, Sreeramulu J, Kanumula GV. Simultaneous Determination of Olanzapine and Fluoxetine by HPLC. *Chromatographia*, 2007, 66: 111-114.

44. Theisen FM, Haberhausen M, Schulz E, Fleischhaker C, Clement HW, Heinzel-Gutenbrunner M, Remschmidt H. Serum levels of olanzapine and its N-desmethyl and 2hydroxymethyl metabolites in child and adolescentpsychiatric di sorders: effects of dose, diagnosis, age, sex, smoking and comedication. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2006, 28:750-759.

45. Bachmann CJ, Haberhausen M, Heinzel-Gutenbrunner M, Remschmidt H, Theisen FM. Large Intraindividual Variability of Olanzapine Serum

Concentrations in Adolescent Patients. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2008, 30:108–112.

46. Wu T, Chiu C, Shen W, Lin F, Wang L, Chen H, Lu M. Pharmacokinetics of olanzapine in Chinese male schizophrenic patients with various smoking behaviors. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 2008, 32:1889–1893.

47. Nirogi R, Kandikere VN, Shukla M, Mudigonda K, Maurya S, Boosi R, Yerramilli A. Development and validation of a sensitive liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry assay for the quantification of olanzapine in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, 41:935–942.

48. Eishafeey AH, Eisherbiny MA, Fathallah MM. A Single-Dose, Randomized, Two-Way Crossover Study Comparing Two Olanzapine Tablet Products in Healthy Adult Male Volunteers Under Fasting Conditions. *Clinical Therapeutics*, 2009, 31:600-608.

49. Markowitz JS, DeVane CL, Malcolm RJ, Gefroh HA, Wang J, Zhu H, Donovan JL. Pharmacokinetics of Olanzapine After Single-Dose Oral Administration of Standard Tablet Versus Normal and Sublingual Administration of an Orally Disintegrating Tablet in Normal Volunteers. *Journal of Clinical Pharmacology*, 2006, 46: 164-171.

50. Pathak A, Rajput SJ. Development of a Stability-Indicating HPLC Method for Simultaneous Determination of Olanzapine and Fluoxetine in Combined Dosage Forms. *Journal of Chromatographic Science*, 2009, 47:605-611.

51. Mitchell M, Riesenberg R, Bari MA, Marquez E, Kurtz D, Falk D, Hardy T, Taylor CC, Mitchell CP, Cavazzoni P. A double-blind, randomized trial to evaluate the pharmacokinetics and tolerability of 30 or 40 mg/d oral olanzapine relative to 20 mg/d oral olanzapine in stable psychiatric subjects. *Clinical Therapeutics*, 2006, 28:881-892.

52. Basavaiah K, Rangachar AU, Tharpa K. Quantitative Determination of Olanzapine in Pharmaceutical Preparations by HPLC. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 2008, 52:120-124.

53. Patel S, Patel NJ. Simultaneous RP-HPLC and HPTLC estimation of fluoxetine hydrochloride and olanzapine in tablet dosage forms. *Indian Journal of Pharmaceutical Science*, 2009, 71:477-480.

54. Titier K, Bouchet S, Pe´hourcq F, Moore N, Molimard M. H igh-performance liquid chromatographic method with diode array detection to identify and quantify atypical antipsychotics and haloperidol in plasma after overdose. *Journal of Chromatography B*, 2003, 788:179–185.

55. Choong E, Rudaz S, Kottelat A, Guillarme D, Veuthey J, Eap CB. Therapeutic drug monitoring of seven psychotropic drugs and four metabolites in human plasma by HPLC–MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2009, 50:1000–1008.

56. Sachse J, Köller J, Hartter S, Hiemke C. Automated analysis of quetiapine and other antipsychotic drugs in human blood by high performance-liquid chromatography with column-switching and spectrophotometric detection. *Journal of Chromatography B*, 2006, 830:342–348.

57. Josefsson M, Roman M, Skogh E, Dahl M. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for determination of olanzapine and N-

desmethylolanzapine in human serum and cerebrospinal fluid. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2010, 53:576–582.

58. Fisher DS, Partridge SJ, Handley SA, Couchman L, Morgan PE, Flanagan RJ. LC–MS/MS of some atypical antipsychotics in human plasma, serum, oral fluid and haemolysed whole blood. *Forensic Science International*, 2013, 229:145–150.

59. Urinovska R, Brozmanova H, Sistik P, Silhan P, Kacirova I, Lemr K, Grundmann M. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of five antidepressants and four atypical antipsychotics and their main metabolites in human serum. *Journal of Chromatography B*, 2012, 907:101–107.

60. Ikeda K, Ikawa K, Kozumi T, Yokoshige S,Horikawa S, Morikawa N. Development and validation of a GC-EI-MS method with reduced adsorption loss for the quantification of olanzapine in human plasma. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, 403:1823–1830.

61. Fonseca BM, Moreno IED, Barroso, MS, Queiroz JA, Gallardo E. Determination of seven selected antipsychotic drugsVin human plasma using microextraction in packed sorbent and gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013, 405:3953–3963.

62. Bao J, Potts BD. Quantitative determination of olanzapine in rat brain tissue by highperformance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography B*, 2001, 752:61–67.

63. Ravinder S, Bapuji AT, Mukkanti K, Reddy DC. Sımultaneous determınatıon of olanzapıne and fluoxetıne ın human plasma by lc-ms/ms and ıts applıcatıon to

pharmacokınetıc study. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2013, 36:2651–2668.

64. Bonde SL, Bhadane RP, Gaikwad A, Gavali SR, Katale DU, Narendiran AS. Simultaneous determination of Olanzapine and Fluoxetine in humanplasma by LC–MS/MS: Its pharmacokinetic applicationS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014, 90:64–71.

65. Ansermot N, Brawand-Amey M, Kottelat A, Eap CB. Fast quantification of ten psychotropic drugs and metabolites in human plasma by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for therapeutic drug monitoring. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1292:160–172.

66. Cui D, Li Y, Lian M, Feng Yang F, Meng Q. Development of a simple and stability-indicating RP-HPLC method for determining olanzapine and related impurities generated in the preparative process. *Analyst*, 2011, 136:3149-3156.

67. Lu M, Lin C, Chen Y, Yang H, Wu T. Determination of Olanzapine and N-desmethylolanzapine in Plasma Using a Reversed-Phase HPLC Coupled with Coulochemical Detection: Correlation of Olanzapine or N-desmethyl-olanzapine Concentration with Metabolic Parameters. *Public Library of Science*, 2013, 8:65719.

68. Urinovska R, Brozmanova H, Sistik P, Silhan P, Kacirova I, Lemr K, Grundmann M. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of five antidepressants and four atypical antipsychotics and their main metabolites in human serum. *Journal of Chromatography B*, 2012, 907:101–107.

69. Zakeri-Milani P, Islambulchilar Z, Ghanbarzadeh S, Valizadeh H. Single dose bioequivalence study of two brands of olanzapine 10 mg tablets in Iranian healthy volunteers. *Drug Research*, 2013, 63:346-350.

70. Tantawy MA, Hassan NY, Elragehy NA, Abdelkawy M. Simultaneous determination of olanzapine and fluoxetine hydrochloride in capsules by spectrophotometry, TLC-spectrodensitometry and HPLC. *Journal of Advanced Research*, 2013, 4:173–180.

71. Rubesh KS, Gayathri P, Duganath N, Kiran CH, Sridhar C, Jayaveera KN. Simultaneous Estimation of Fluoxetine HCl and Olanzapine in Bulk Drug and Pharmaceutical Formulation by Using UV-Visible Spectroscopy Method. International *Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 2011, 3:52-55.

72. Chatsiricharoenkul S, Niyomnaitham S, Pongnarin P, Sathirakul K, Kongpatanakul S. Bioequivalence Study of 10 mg Olanzapine Tablets in Healthy Thai Volunteers. *Journal of Bioequivalence & Bioavailability*, 2011, 3:82-85.

73. Canovas M, Torres F, Domenech G, Cebrecos J, Pelagio P, Manriquez M, Martinez G, Arcabell M, Cabre F. Bioequivalence evaluation of two dosage forms of olanzapine 10 mg formulations in healthy volunteers. *Arzneimittelforschung*, 2011, 61: 75-79.

74. Skoog DA, Leary JJ. *Principles of Instrumental Analysis*, 4th Edition. New York. Harcourt Brace College Publishers, 1998: 116-706.

75. Gündüz T. İnstrümental Analiz, 6. Baskı. Ankara, Gazi Kitapevi, 2002:101-1273.

76. Atila A. Bazı non steroidal antiinflamatuvar ilaçların ratlarda oral uygulama sonrası kan adrenalin düzeyleri üzerine etkisi. Sağlık Bilmleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Doktora tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2011.

77. Wiberg K. Multivariate spectroscopic methods for the analysis of solutions. Department of Analytical Chemistry, Arrhenius Laboratory, Stockholm University, 2004. www.anchem.su.se/downloads/diss pdf 2004. 20.12.2013.

78. Demirkaya F. A, E ve K vitaminlerinin farmasötik preparatlarda, insan plazmasında ve tavşan plazmasında farklı analitik yöntemlerle miktar analizi. Sağlık Bilmleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Doktora tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2009.

79. Analitik Kimya II Laboratuvar Aletli Analiz Deneyleri, Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Ankara, 2005.

80. Skoog DA, Holler FJ, Timothy AN. *Principles of Instrumental Analysis*. Tercüme: Kılıç E, Köseoğlu F, Yılmaz H. *Enstrümental Analiz İlkeleri*, Ankara. Bilim Yayıncılık, 1998, 299-777.

81. Suelter CH, Watson JT. *Practical Aspects of Gas Chromatography-Mass Spectrometery*. New York: John Wiley and Sons Ltd. 1990:2-42.

82. Chapman JR. *Practical Organic Mass Spectrometry*. London: John Wiley and Sons Ltd. 1985: 27-37.

83. Hardey JK. Mass Spectrometry for Chromatographers, The University of Akron copyright (C) 2004. http://ull.chemistry.uakron.edu/gcms. 17.11.2013.

84. Brian M**.** Introduction to Mass Spectrometry (MS), The Chemistry Hypermedia Project, Copyright (C) 2000 by Brian M. http://www.chem.vt.edu/chem-ed. 19.12.2013.

85. Tunçbilek İ. Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi tekniği kullanılarak doping amacıyla kullanılan hidroksietil nişastanın (hes) idrardan analizi üzerine bir çalışma. Sağlık Bilmleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Ankara, Yüksek Lisans tezi, Erzurum: Hacettepe Üniversitesi, 2005.

86. Constantin E, Schnell A. Mass Spectroscopy, Ellis Horwood Ltd. London, 1990: 41.

87. http://en.wikipedia.org/wiki/Liquid chromatography mass spectrometry. 15.12.2013.

88. FDA Psychopharmacological Drugs Advisory Committee, 2001. http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/3685b1_01_lilly.pdf. 23.09.2013.

EKLER

Ek 1. Özgeçmiş

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Mevlüt ALBAYRAK **Doğum Tarihi**: 12.07.1979 **Doğum Yeri**: Erzurum **Medeni Hali**: Evli **Uyruğu**: T.C. **Adres**: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı **Tel**: 0535 315 4280, 0442 344 6573 **E_mail**: m_albayrak25@hotmail.com
Eğitim
Lise: Erzurum Lisesi (1996) **Lisans**: Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü (1997-2001) **Yüksek Lisans**: Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim dalı (2006-2009) **Doktora**: Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim dalı (2009-2014)
Yabancı Dil
İngilizce
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
Kimyagerler Derneği

EK 2. Etik Kurul Onay Formu

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ETİK KOMİTE BAŞKANLIĞI

Bölümü : Dekanlık
Servisi : Etik Komite
Sayı : B.30.2.ATA.0.01.00/ 51
Konu : Etik Komite Kararı Hakkında

27.06.2011

TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

İlgi:16.06.2011 tarih ve 81 sayılı yazınız.

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Komitesi 24.06.2011 tarih ve 6 nolu toplantısında, Uzman Mevlüt ALBAYRAK'ın " **Farmasötik Prepatlarda, Şizofreni ve Bipolar Bozukluğu Olan Hastaların Kanlarında Olanzapin Seviyesinin Kromatografik Yöntemlerle (HPLC, LC-MS, GC), Spektroskopik Yöntemlerle Tayini ve Genotoksik Etkisinin İncelenmesi** " isimli bilimsel çalışma protokolü ve ekli belgeleri gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler ile gönüllü bilgilendirme metni dikkate alınarak incelenmiş ve çalışmanın Etik Kurallara uygun olduğuna mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Metin GÖRGÜNER
Etik Komite Başkanı

Eki :
1 Adet Etik Komite Kararı