

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

**PROGESTERON' UN BİYOANALİTİK YÖNTEM
VALİDASYONU**

Uzm. Mevlüt ALBAYRAK

**TEZ YÖNETİCİSİ
Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU**

**Yüksek Lisans Tezi
ERZURUM-2009**

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Analitik Kimya Programında Bilim Uzmanlığı Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih :24.06.2009

Tezin Sözlü Savunma Tarihi :06.07.2009

Tez Danışmanı:

: Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU

(Atatürk Üniversitesi)

Üye:

: Doç. Dr. Zühal GÜVENALP

Üye:

: Doç. Dr. Zekai HALICI

Üye:

: Yrd. Doç. Dr. Fehmi ODABAŞOĞLU

Üye

: Yrd.Doç. Dr. Meltem ÇETİN

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. İsmail CEYLAN

Yüksek Lisans Tezi

ERZURUM-2009

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	I
TEŞEKKÜR	VII
ÖZET.....	VIII
SUMMARY.....	IX
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Hormonlar.....	4
2.1.1. Hormon Tanımı Ve Önemi.....	4
2.1.2. Hormonların Etki Mekanizmaları.....	5
2.1.3. Hormonların Sınıflandırılması.....	6
2.1.4. Hormonların Sentezi Ve Depolanması.....	6
2.1.5. Hormonların Fizyolojik Fonksiyonları.....	7
2.1.6. Hormonların Salgılanmasının Düzenlenmesi.....	8
2.2. Steran Çekirdeği.....	8
2.3. Progesteronun Kimyasal Yapısı.....	9
2.3.1. Progesteronun Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	9
2.3.2. Progesteronun Fizyolojik Fonksiyonları.....	9
2.3.3. Progesteronun Hamilelikteki Rolü.....	10
2.3.4. Progesteronun Sentezi, Depolanması ve Yıkımı.....	11
2.3.5. Progesteronun Ticari Şekilleri.....	12
2.3.6. Etkileri, Kullanım Şekli Ve Dozu.....	12
2.3.7. Progesteron İle Yapılan Çalışmalar.....	13
2.4. Spektroskopik Yöntemler.....	20
2.4.1. Işının Absorplanması.....	21

II

2.4.2. Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi.....	22
2.4.3. Moleküler Absorpsiyon Spektroskopisi.....	23
2.4.4. Lambert Beer Kanunu.....	24
2.4.5. Ultraviyole-Görünür Bölge Spektrofotometreleri.....	24
2.4.6. UV-Görünür Bölge Spektrofotometre Cihazının Kullanım Amaçları.....	25
2.4.6.1. Kalitatif Analiz.....	25
2.4.6.2. Kantitatif Analiz.....	26
2.5. Türev Spektrofotometri Yöntemi.....	27
2.5.1. Türev Spektroskopisi Yönteminin Avantajları ve Dezavantajları.....	29
2.6. Kromatografik Yöntemler.....	30
2.6.1. Kromatografik Yöntemlerinin Sınıflandırılması.....	31
2.6.2. Kromatografide Temel Olan Fiziksel ve Kimyasal Olaylar.....	32
2.6.2.1. Dağılma Kromatografisi.....	32
2.6.2.2. Adsorpsiyon Kromatografisi.....	33
2.6.2.3. İyon Değişirme Kromatografisi.....	33
2.6.2.4. Boyut-Elleme Kromatografisi.....	34
2.7. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) Cihazı.....	34
2.7.1. Pompalar.....	35
2.7.2. Örnek Giriş Sistemi (Enjeksiyon Bloğu).....	36
2.7.3. Kolonlar.....	36
2.7.4. Dedektörler.....	38
2.7.4.1. UV Dedektörler	38
2.7.4.2. Diyod Array Dedektörler	39
2.8. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisinin Uygulama Alanları.....	40

III

2.8.1. Kimyasal Ayırma.....	40
2.8.2. Saflaştırma.....	40
2.8.3. Kalitatif Analiz.....	40
2.8.4. Kantitatif Analiz.....	40
2.9. Analitik Yöntem Validasyonu.....	41
2.9.1. Stabilité.....	41
2.9.2. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi.....	42
2.9.3. Doğruluk ve Kesinlik.....	42
2.9.4. Duyarlılık.....	42
2.9.5. Tutarlılık.....	43
3. MATERYAL VE METOD.....	44
3.1. Kimyasal Maddeler ve Cam Malzemeler.....	44
3.2. Cihazlar.....	44
3.3. Yöntemler.....	45
3.3.1. Spektrofotometri Yöntem Şartları.....	45
3.3.1.1. UV Görünür Bölge Spektrofotometri Şartları.....	45
3.3.1.2. Türev Spektrofotometri Yöntem Şartları.....	46
3.3.2. Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	46
3.4. Kromatografik Yöntem Şartları.....	46
3.4.1. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi (HPLC-DAD) Yöntem Şartları.....	46
3.4.2. Standart Çözeltilerinin Hazırlanması.....	47
3.5. Progesteronun Plazmadan Ekstraksiyon Prosesi.....	47
4. BULGULAR.....	49
4.1. Stabilité (Kararlılık).....	49

4.1.1. Progesteronun Standart Çözeltilerinin Stabilitesi.....	49
4.2. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri Yöntemi.....	51
4.2.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	51
4.2.2. Yöntem Validasyonu.....	52
4.2.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi.....	52
4.2.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ).....	54
4.2.2.3. Doğruluk ve Kesinlik.....	54
4.2.2.4. Farmasötik Preparatlarda Progesteronun Geri Kazanımı.....	55
4.2.2.5. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması.....	55
4.2.3. Plazma Çalışması.....	56
4.2.3.1. Plazma Çözeltilerinin Hazırlanması.....	56
4.2.4. Yöntem Validasyonu.....	57
4.2.4.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi.....	57
4.2.4.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ).....	59
4.2.4.3. Doğruluk ve Kesinlik.....	59
4.2.4.4. Plazmadan Geri Kazanım.....	60
4.3. Birinci Derece Türev Spektrofotometri Yöntemi.....	60
4.3.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	60
4.3.1.2. Yöntem Validasyonu.....	61
4.3.1.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrileri.....	61
4.3.1.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ).....	63
4.3.1.2.3. Doğruluk ve Kesinlik.....	64
4.3.1.2.4. Farmasötik Preparatlarda Progesteronun Geri Kazanımı.....	65
4.3.1.2.5. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması.....	66

4.4. Kromatografik Yöntemler.....	67
4.4.1. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi (HPLC-DAD) Yöntemi.....	67
4.4.1.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	67
4.4.1.2. Yöntem Validasyonu.....	68
4.4.1.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi.....	68
4.4.1.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ).....	70
4.4.1.2.3. Doğruluk ve Kesinlik.....	70
4.4.1.2.4. Farmasötik Preparatlarda Progesteronun Geri Kazanımı.....	71
4.4.1.2.5. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması.....	71
4.5. HPLC-DAD Plazma Çalışması.....	72
4.5.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	72
4.5.2. Yöntem Validasyonu.....	74
4.5.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi.....	74
4.5.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ).....	75
4.5.2.3. Doğruluk ve Kesinlik.....	75
4.5.2.4. Geri Kazanım.....	76
4.6. Geliştirilen Yöntemlerin Gerçek Numunelere Uygulanması.....	76
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	79
6. KAYNAKLAR.....	86

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim sonucunda yaptığım çalışmaların ürünü olan bu tezin hazırlanmasında katkıları olan;

Çalışmalarımın başından sonuna kadar ilgisini, fikirlerini, yardımlarını ve anlayışını esirgemeyen Sayın Danışman Hocam Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU' na, anlayışından ve desteğinden dolayı Sayın Hocam Prof. Dr. Cemal GÜNDOĞDU' ya, analitik kimya laboratuvarında yaptığım çalışmalar esnasında yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Arkadaşlarım Sayın Fatma DEMİRKAYA, Sayın Murat ÖZTÜRK, Sayın Alptuğ ATİLA ve Sayın Onur ŞENOL' a, anlayışları ve fedakarlıklarından dolayı mesai arkadaşlarım Kim. Müh. Sayın Ufuk KUŞKUN ve Sağlık Teknikeri Sayın Esra ZEREN' e, laboratuvar çalışmalarımı kimyasal madde ve malzeme yönünden destekleyen Atatürk Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fonu Saymanlığı' na,

Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi tüm imkânları sunan ve bu günlere getiren anneme, babama ve tüm aile fertlerine, çalışmalarım süresince birçok fedakârlıklar 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.

ÖZET

Progesteron' un Biyoanalitik Yöntem Validasyonu

Steroid bir hormon olan progesteronun miktar analizi için spektrofotometrik (UV-Görünür Bölge ve Birinci- Türev Spektrofotometri) ve kromatografik (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi- diyote Array Dedektör) yöntemler geliştirildi, valide edildi ve insan plazması ile progesteron içeren farmasötik preparatlara uygulandı. Spektrofotometrik yöntemlerde, progesteronun 240 nm dalga boyunda UV-Görünür Bölge absorbans değerleri ile 230 nm ve 255 nm dalga boyunda birinci türev absorbans değerleri ölçüldü.

UV- Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminde, gözlenebilme sınırı (LOD) plazma çözeltilerinde 0,5 µg/mL ve standart çözeltilerinde 0,4 µg/mL' dir. Bağlı standart sapma (% BSS) olarak belirtilen gün içi ve günler arası kesinlik plazmada % 0.04 ile % 5,67 arasında ve standart çözeltilerde % 0,2 ile % 2,03 arasındadır. Plazmadan ve farmasötik preparatlardan progesteronun geri kazanım değerleri ise sırasıyla % 76,2 ve % 98,2' den daha büyüktür.

Birinci-Türev Spektrofotometri yönteminde, LOD standart çözeltilerinde 0,4 µg/mL' dir. Gün içi ve günler arası kesinlik standart çözeltilerde % 0,9 ile % 11,6 arasındadır. Farmasötik preparatlardan progesteronun geri kazanım değeri ise % 91,2' den daha büyüktür.

Kromatografik olarak progesteron, asetonitril-su (70-30 h/h) mobil fazı kullanılarak ters faz C-18 kolonda ve 240 nm' de DAD dedektör ile belirlendi. LOD, hem plazma hem de standart çözeltilerinde 0,08 µg/mL' dir. Gün-içi ve günler-arası kesinlik plazmada % 2,07 ile % 7,70 arasında ve standart çözeltilerde % 0,59 ile % 2,37 arasındadır. Plazmadan ve farmasötik preparatlardan progesteronun geri kazanım değerleri ise sırasıyla % 91,08 ve % 96,6' dan daha büyüktür.

Geliştirilen ve valide edilen bütün yöntemler ile farmasötik preparatta herhangi bir ön hazırlama veya ön ayırma işlemi gerektirmeden progesteron belirlendi. Ayrıca geliştirilen kromatografik yöntem, 30 ile 41. haftalar arası hamile insanlardan elde edilen plazma örneklerinde progesteron analizi başarı ile uygulandı.

Anahtar Kelimeler: Progesteron, Spektrofotometrik yöntem, Türev Spektrofotometrik yöntemi, HPLC yöntem

SUMMARY

Bioanalytical Method Validation of Progesterone

For quantitative determination of progesterone which is a steroid hormone, both spectrophotometric (UV-Visible and First-Derivative) and chromatographic (high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled with diode array detector (DAD)) methods were developed, validated and applied on pharmaceutical preparation containing progesterone and human plasma. Spectrophotometrically, progesterone was determined by means of UV-Visible absorbance values measured at 240 nm and first-derivative values measured at 230 nm and 255 nm.

In UV-Visible Spectrophotometric method, the limits of detection (LOD) were 0,5 µg/mL in plasma and 0,4 µg/mL in standard solution. The within and between day precision, expressed as the relative standard deviation (RSD %) ranged from 0.04 to 5,67 % in plasma and 0,2 to 2,03 % in standard solution. The recovery of progesterone from plasma and pharmaceutical preparation were also higher 76,2 % and 98,2 %, respectively.

In First-Derivative Spectrophotometric method, the limits of detection were 0,4 µg/mL in standard solution. The within and between day precision (RSD %) ranged from 0,9 to 11,6 % in standard solution. The recovery of progesterone from pharmaceutical preparation were also higher 91,2 %.

Chromatographically, determination of progesterone was achieved with acetonitrile-water (70:30, v/v) as mobile phase, a reversed phase C-18 column and DAD detection at 240 nm. The LOD were 0,08 µg/mL both in plasma and in standard solution. The within and between day precision, ranged from 2,07 to 7,70 % in plasma and 0,59 to 2,37 % in standard solution. The recovery of progesterone from plasma and pharmaceutical preparation were also higher 91,08 % and 96,6 %, respectively.

All methods that developed and validated were successfully applied for determination of progesterone at pharmaceutical preparation which do not require any preliminary separation or pretreatment of the samples. Furthermore, proposed chromatographic method for progesterone has been successfully applied to the analysis of human plasma samples collected from pregnant human between 30th and 41st weeks.

Key Words: Progesterone, Spectrophotometric method, Derivative Spectrophotometric method, HPLC method

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Vücudun belli bölgelerinde sentezlenip, organizmanın belirli fonksiyonlarını başlatan ya da düzenleyen kimyasal maddelere hormon denir. Hormonlar kimyasal yapılarına göre dörde ayrılırlar. Amin yapısındaki hormonlar, aminoasit yapısındaki hormonlar, peptit hormonlar ve steroid hormonlardır. Steran çekirdeği taşıyan hormonlara steroid hormonlar denir. Progesteron da steran çekirdeği taşıdığından dolayı bir steroid hormondur ve 21 karbonludur. Progesteronun molekül ağırlığı 314,47 g/mol diğer bir adı ise Pregn-4-en-3,20-dion dur. Progesteron kadınlarda normal dönemlerde ve menstrüel siklusun ikinci yarısında, yumurtalıklarda, corpus luteumda, hamilelik döneminde plasentada, erkeklerde az miktarda testislerde ve ayrıca her iki cinsten adrenal kortekste sentezlenir. Adrenal kortekste sentezlenen hormonun önemli miktarı dolaşıma verilmeyip diğer steroidlerin sentezi için prekürsör olarak kullanılır¹.

Progesteronun biyosentezi kolesterolden başlar¹. Başlıca metaboliti pregnandiol (5 β -pregnandiol) dır. Progesteronun yaklaşık % 30' u bu maddeye dönüşür. Diğer metabolitleri ise 5 α -pregnandion ve 20 α -dihidroksiprogesteron' dur. Bunlar zayıf progesteron benzeri etkinlik gösterir. Vücutta progesteron sentez hızının ölçüsü günde idrarla çıkarılan pregnandiol miktarıdır. Bu miktar güne ve kişiye göre farklılık gösterir². Progesteron plazmada bir transport proteini olan transkortine kısmen bağlanmış olarak bulunur³. Progesteronun başlıca 3 fizyolojik işlevi vardır: i) ovumun döllenmesi ile ilgili olayları kolaylaştırır, ii) döllenmiş ovumun uterusu endometriyum üzerine implantasyonunu yani nidasyonu sağlar, iii) gebeliğin sürdürülmesini sağlar.²

Ayrıca progesteron gelişme çağında alveoler meme dokusunun oluşumunu hızlandırır. Yetişkinlerde menstrüel siklusu düzenler; corpus luteum' dan progesteron

salgılanması durunca mens başlar. Uterus üzerindeki etkileri nedeni ile progesteron, döllenmiş ovumun uterusu yerleşmesi ve gebeliğin devamı için gereklidir.

Hamile olmayan bayanlarda çoğunlukla corpus luteum tarafından salgılanır. Hamilelik boyunca bu hormonun ana kaynağı plasentadır. Serumdaki progesteron derişimi kadınlarda yaklaşık olarak 0,15-25 ng/mL' dir. Fakat bu değer hamilelik boyunca yaklaşık 230 ng/mL düzeyine ulaşır⁴. Gebeliğin 10. haftasından sonra primer progesteron kaynağı plasentadır, plasenta çoğu annenin dolaşımına geçen günde 250 mg progesteron üretir⁵. Progesteron büyük ölçüde dolaşımda proteine bağlıdır ve over fonksiyonlarını belirlemede progesteronun kandaki derişimi ölçülür. Çoğu yayınlarda progesteronun prostat, endometrial ve meme kanseri üzerine antitümöral yararı raporlanmıştır⁶⁻⁹. Beyin hasarı sonrası progesteron tedavisinde TNF-alfa, IL-1beta, mRNA ve proteinlerini düşürdüğü kanıtlanmıştır^{10,11}. Sentetik progesteron çeşitli jinekolojik problemlerde çok yaygın olarak kullanılırken, doğal progesteron çoğu androjenik aktivitelerden yoksundur. Bu yüzden uzun zaman periyodlarında üremeye yardımcı olarak kullanılır¹². Progesteronla ilgili birçok tayin yöntemlerine rastlanmıştır. Bu yöntemler; GC-MS (Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi), HPLC (Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi), LC-MS (Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektroskopisi), Spektrofotometrik ve immunoassay yöntemleri olarak sıralanabilir. Çalışmamızla ilgili literatür taramasında progesteronun analizinde LC-MS yöntemi^{5,13-16}, LC-MS/MS yöntemi^{5,14,17,18}, HPLC yöntemi^{16,19-31}, GC-MS yöntemi^{14,32,33}, UV-Görünür Bölge ve Türev Spektrofotometri yöntemleri³⁴ ile immunoassay yöntemlerine^{21,29-31} ulaşılmıştır. Çalışmamız bu yöntemler ışığında yürütülmüştür. Çalışmamızın amacı, farmasötik preparatlarda ve insan plazmasında progesteron miktar tayini için literatürdeki yöntemlere alternatif olarak UV-Görünür Bölge Spektrofotometre, Türev

Spektrofotometri ve Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi yöntemlerinin geliştirilip validasyonlarının yapılması amaçlanmıştır. Geliştirilip validasyonları yapılan yöntemlerin uygulaması olarak farmasötik preparatlarda progesteron miktar tayininin yapılması ve hamilelikte son derece büyük bir öneme sahip olan progesteronun hamile insanların (30-41. haftalar arası hamilelerin) plazmalarında miktar tayininin yapılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hormonlar

2.1.1. Hormon Tanımı Ve Önemi

Hormon, vücudun belli bölgelerinde sentezlenip, organizmanın belirli fonksiyonlarını başlatan ya da düzenleyen kimyasal maddelere denir. Hormon terimi, yunanca kökenden gelmektedir; uyarmak, canlandırmak anlamındadır. Hormonlar çoğunlukla sentezlendiği yerlerden, dolaşım sistemi ile (kan veya lenf) etki bölgelerine taşınarak, buradaki hedef hücreler üzerine etkirler; bu tip etkiye endokrin etki, böyle hormonlara endokrin hormonlar denir. Bazı hormonlar ise sentezlendikleri yerlerden uzağa taşınmaksızın, komşu hücreler üzerine etki gösterirler; bu etki tarzına parakrin etki, bu tip hormonlara parakrin hormonlar yada doku hormonları veya lokal hormonlar denir. Bazı hormonlar hem endokrin hem de parakrin etki gösterirler¹.

Hormonlar, metabolizmanın, büyüme ve gelişmenin, su ve elektrolit alış verişinin, üremenin, seksüel gelişimin ve seksüel fonksiyonların regülâtörleri olarak hayati öneme sahiptirler. Hormonların kimyasal yapıları heterojendir. Hormonların, biyolojik etkinlikleri için düşük derişimleri yeterlidir; serumda nmol ve pmol düzeylerinde bulunurlar; serum düzeyleri ancak çok hassas yöntemlerle ölçülebilir.³⁵. Hormonların yokluk, azlık ve fazlalıkları çeşitli hastalık belirtilerine yol açar; bazılarının yokluğu ölüme neden olur³⁵. Örneğin, büyüme hormonu olmadığında kişi cüce olarak kalır, troksin ve triiyodotironin yokluğu, vücuttaki hemen hemen tüm kimyasal reaksiyonları yavaşlatır ve kişi yavaşlar. İnsülin yokluğunda, hücreler enerji için karbonhidratları ya çok az kullanabilir veya hiç kullanamaz. Seks hormonları olmadan cinsel gelişme ve cinsel fonksiyonlar olamaz³⁶. Bu nedenle hekimlikte bir

endokrin organın hipofonksiyonunu veya bir hormonun eksikliğini zamanında saptayarak eksik hormonu yerine koymak önemlidir³⁵.

2.1.2. Hormonların Etki Mekanizmaları

Hücre içinde ya da üzerinde hormon, ilaç, virüs v.b. nin özel olarak bağlandığı yer veya yapıya reseptör denir. Hormonların etkileri, reseptör düzeyinde iki farklı mekanizma ile açıklanmaktadır¹.

a- Katekolaminler ve bazı peptit hormonlar; etkilerini hedef hücre membranı yüzeyinde bulunan reseptörlere bağlanarak gösterirler. Membranda oluşan hormon-reseptör kompleksi, hücre içinde adenil siklaz enziminin aktivitesini artırır; bu da ATP (adenozin trifosfat) cAMP' ye (3',5'-siklo-AMP, siklik adenosin monofosfat) dönüşmesini sağlar. Hücre içi cAMP ve bazen Ca^{+2} iyonları derişimlerini yükseltir. İkinci haberci olarak nitelendirilen cAMP, ilgili enzim ve transport işlemlerini aktive eder.

b- Steroid hormonlar ve tiroid hormonları; hedef hücre membranından içeriye girerek, sitoplazmada bulunan reseptörlerle birleşirler ve hormon-reseptör kompleksini oluştururlar. Bu kompleks, hücre çekirdeğine girer (traslokasyon), DNA (deoksiribonükleik asit) kromatin ağı ile birleşir, RNA (ribonükleik asit) polimeraz etkisi ile DNA zincirinin kopmasına ve mRNA çıkışına neden olur (transkripsiyon); mRNA sitoplazmada, ribozomlarda özel proteinlerin sentezini sağlar (translasyon). Hücre dışına salgılanan bu proteinler, hormonun sorumlu olduğu fizyolojik etkiyi meydana getirir¹.

2.1.3. Hormonların Sınıflandırılması

Hormonlar, kimyasal yapılarına göre üç ana sınıfa ayrılırlar:

1- Protein ve polipeptitler yapısındaki hormonlar (peptid hormonlar): Ön ve arka hipofiz bezi hormonları, pankreastan (insülin ve glukagon), paratiroid bezinden (paratiroid hormon) salgılanan hormonlar en başta gelen protein ve polipeptit yapısındaki hormonlardır.

2- Steroidler: Adrenal korteksten (kortizol ve aldosteron), overlerden ve plasentadan (östrojen ve progesteron), testislerden (testosteron) salgılanırlar.

3- Amin yapısındaki hormonlar (Tirozin amino asidi türevleri): Tiroid bezinden (tiroksin ve triiyodotironin) ve adrenal medulladan (epinefrin ve norepinefrin) salgılanırlar³⁶.

Hormonlar ayrıca fizikokimyasal özelliklerine göre de sınıflandırılırlar²;

-Suda çözünür hormonlar (peptidler ve katekolaminler)

-Yağda çözünür hormonlar (steroidler ve tiroid hormonları)

2.1.4. Hormonların Sentezi ve Depolanması

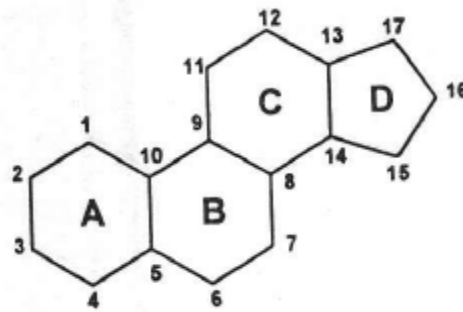
Polipeptit ve protein yapısındaki hormonlar gerektikleri süreye kadar sekretuar veziküllerde depolanırlar. Vücuttaki hormonların çoğu polipeptit ve protein yapısındadır. Bu hormonlar 3 aminoasitten oluşacak kadar küçük (tirotropin) veya 200 aminoasitten oluşabilecek kadar uzun (prolaktin) olabilirler. Genelde 100 veya daha fazla sayıda aminoasitten oluşan polipeptitler protein olarak adlandırılır ve 100 den daha az sayıda aminoasitten oluşanlar peptid olarak bilinirler. Protein ve peptid hormonlar, diğer proteinlerde olduğu gibi endokrin hücrelerin granüllü endoplazmik retikulum tarafından sentezlenir. Steroid hormonlar genelde kolesterolden sentezlenirler ve depolanmazlar. Steroid hormonların kimyasal yapısı kolesterole benzer, lipidde

2.1.6. Hormonların Salgılanmasının Düzenlenmesi

Endokrin bezler stümile edilmemiş durumda veya başka bir değişle istirahat halinde de hormon salgırlar; buna bazal salgılama adı verilir. Endokrin bez stimüle edildiğinde, hormon salgılaması hızı bazal düzeyin üstüne çıkar. Stimülasyonun kesilmesi veya inhibitör bir sistemin aktivasyonu, salgının azalmasına ve duruma göre bazal düzeye dönmesine neden olur³. Hormonlar; bir kalıba bağlı olmaksızın, fakat sabit ve dış uyarı olmadığı takdirde değişmeyen miktarda, günlük ya da aylık bir kalıba uygun olarak, zamana göre değişen miktarda, ihtiyaç halinde; uyarı ile ve belirli bir kalıba bağlı olmaksızın salgılanırlar¹.

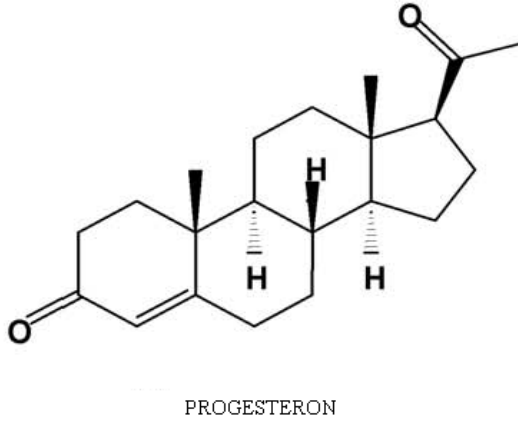
2.2. Steran Çekirdeği

Steroidlerde ana yapıyı, perhidrofenantren halka sistemi ile siklopentan halkasının birleşmesinden meydana gelen steran halka sistemi (steran çekirdeği) oluşturur. Yapıda bulunan dört halka, A, B, C ve D halkaları olarak adlandırılır. Halka sistemi, A halkasının üst köşesinden başlanmak ve halkaların birleşme karbonlarına da numara verilmek suretiyle numaralandırılır¹.



Şekil 2.1: Steran çekirdeğinin yapısı

2.3. Progesteronun Kimyasal Yapısı



Şekil 2.2: Progesteronun Kimyasal Yapısı

2.3.1. Progesteronun Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Progesteronun USP24 farmakopi³⁷ de belirtilen fiziksel ve kimyasal özellikleri:

*Kaba formülü $C_{21}H_{30}O_2$ şeklindedir.

*Molekül ağırlığı 314,47 g/mol, diğer bir adı ise Pregn-4-en-3,20-dion' dur.

*Metanol ve etanol de çözünür.

*Erime noktası 126 - 131 °C arasındadır.

2.3.2. Progesteronun Fizyolojik Fonksiyonları

Progesteronun uterus üzerine etkisi; progesteronun diğer etkileri ile ölçülemeyecek en önemli fonksiyonu, kadın cinsel siklusunun ikinci yarısında uterus endometriyumunda sekresyonla ilgili değişimleri başlatarak, uterusu döllenmiş yumurtanın implantasyonuna hazırlamaktır. Progesteron, endometriyum üzerindeki bu etkisine ek olarak, uterus kontraksiyonlarının şiddetini ve frekansını azaltıcı etkiye sahiptir³⁶.

Progesteronun fallop tüpleri üzerine etkisi; progesteron aynı zamanda, fallop tüplerini döşeyen mukozada, sekresyonla ilgili değişimleri başlatır. Sekresyon sıvısı, döllenmeden sonra bölünmeler geçirerek fallop borusunda ilerleyen ovumun implantasyondan önce beslenmesi için gereklidir³⁶.

Progesteronun meme bezlerine etkisi; progesteron alveol hücrelerinin proliferasyonu ile memelerdeki lobül ve alveollerin gelişimini hızlandırır. Böylece memeler büyüyerek salgılayıcı hal kazanırlar. Progesteron alveollerin süt salgısını sağlamaz. Süt, memeler hazırlandıktan sonra prolaktin hormonuyla salgılanabilir. Progesteron aynı zamanda göğüslerin kabarmasına neden olur. Bu kabarma kısmen lobül ve alveollerin sekretuar gelişmesine, kısmende deri altı dokusundaki sıvının artmasına bağlıdır³⁶.

2.3.3. Progesteronun Hamilelikteki Rolü

Progesteron gebelik için çok önemli ve gerekli bir hormondur. Gebeliğin başlangıcında korpus luteumdan orta miktarda, daha sonra plasenta tarafından aşırı miktarda salgılanır. Progesteronun sekresyon hızı gebelik ilerledikçe yaklaşık 10 kat artış göstermektedir. Progesteronun, gebeliğin normal ilerleyişi yönünden özgün etkileri şöyle sıralanabilir:

*Progesteron uterus endometriyumunda desidüal hücrelerin gelişmesine neden olur. Bu hücreler embriyonun erken evrelerde beslenmesinde önemli rol oynarlar.

*Progesteron gebe uterus kasılabilirliği azaltır. Bu olay spontan düşüklere yol açan uterus kasılmalarını engeller.

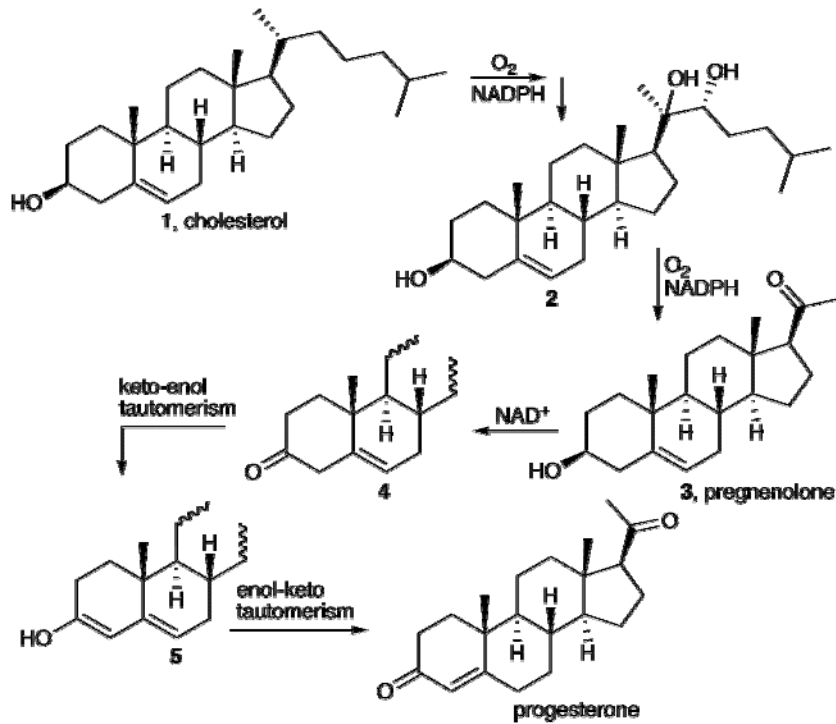
*Progesteron implantasyondan önce, uterus ve fallop kanallarındaki sekresyonları artırarak morula ve blastositlerin gelişmesi için gerekli olan uygun besin

maddelerini sağlar. Ayrıca embriyonun gelişiminin erken döneminde hücre bölünmesini etkilediğine inanılmaktadır.

*Gebelik sırasında salgılanan progesteron, annenin göğüslerini laktasyona hazırlayan östrojene yardım eder³⁶.

2.3.4. Progesteronun Sentezi, Depolanması ve Yıkımı

Progesteronun biyosentezi kolesterolden başlar. Progesteron kadınlarda normal dönemlerde, menstrüel siklusun ikinci yarısında, yumurtalıklarda corpus luteumda, hamilelik döneminde plasentada, erkeklerde az miktarda testislerde ve ayrıca her iki cinsten adrenal kortekste sentezlenir. Adrenal kortekste sentezlenen hormonun önemli miktarı dolaşıma verilmeyip diğer steroidlerin sentezi için prekürsör olarak kullanılır¹.



Şekil 2.3. Progesteronun biyosentezi

Hamile olmayan bayanlarda çoğunlukla corpus luteum tarafından salgılanır. Hamilelik boyunca bu hormonun ana kaynağı plasentadır. Serumdaki progesteron derişimi normal kadınlarda yaklaşık olarak 0,15-25 ng/mL dir. Fakat bu değeri hamilelik boyunca yaklaşık 230 ng/mL düzeyine ulaşır⁴. Placenta çoğu annenin dolaşımına geçen günde 250 mg progesteron üretir³³. Progesteron plazmada bir transport proteini olan transkortine kısmen bağlanmış olarak bulunur³. Steroid hormonlar depolanmazlar, progesteron da bir steroid hormon olduğu için depolanmaz³⁶. Progesteron, yarı ömrü çok kısa (birkaç dakika) olan bir hormondur. İnaktivasyonda en önemli organ karaciğerdir¹. Başlıca metaboliti pregnandiol (5 β -pregnandiol) dır. Progesteronun yaklaşık %30' u bu maddeye dönüşür. Diğer metabolitleri ise 5 α -pregnandion ve 20 α -dihidroksiprogesteron dur. Bunlar zayıf progesteron benzeri etkinlik gösterir. Vücutta progesteron sentez hızının ölçüsü günde idrarla çıkarılan pregnandiol miktarıdır. Bu miktar güne ve kişiye göre farklılık gösterir².

2.3.5. Progesteronun Ticari Şekilleri

*Progestan 100 mg, 200 mg Yumuşak Kapsül	(KOÇAK)
*Progynex 50 mg/mL, 25 mg/mL ampül	(FARMAKO)
*Progynex 100 mg, 200 mg yumuşak kapsül	(FARMAKO)
*Crinone jel %4, %8	(SERONO)

2.3.6. Etkileri, Kullanım Şekli ve Dozu

Progesteron ve onun gibi etki yapan ilaçlara progestajen adı verilir². İnsanlarda tabii olarak bulunan progestajen hormon progesterondur. Progesteron içeren ilaçlar fonksiyonel rahim kanamalarında, Amenore de (adet görememe ve adet gecikmesi), premenstrüel tansiyonda, kısırlık tedavisinde, östrojenlerle birlikte kronik sistik mastitte ve endometrium kanserinde, ayrıca östrojenlerle birlikte oral kontraseptif (doğum

kontrol hapı) olarak kullanılır. Düşük tehlikesini önlemek amacıyla oldukça sık kullanılmalarına rağmen, bu amaçla kullanılmaları fetüsteki bir bozukluk dolayısıyla sakat bebek doğmasına ya da ölü fetüsün gereksiz yere uterusu tutulmasına sebep olabilecekleri için sakıncalıdır. Sentetik bileşiklerden allilestrenol ve didrogesteron hariç, diğer progestajenler gebeliğin ilk dört ayında kullanılmaları kontrendikedir. Progesteronun oral aktivitesi düşüktür¹. Ağızdan alındığında sistemik biyoyararlanımı karaciğerde ilk geçiş eliminasyonuna uğraması nedeniyle düşüktür. Bundan dolayı mikronize şekilde progesteron, ağızdan parantral dozuna göre yüksek miktarda kullanılabilir. Bu oran günde 100-400 mg kadardır. Bitkisel yağ içinde milimetrede 25 mg progesteron içeren steril solüsyon şeklinde intramusküler enjekte edilen müstahzarları da vardır. Progesteron lokal tahriş yapması nedeniyle enjeksiyon yerinde ağrı oluşturur².

2.3.7. Progesteron ile Yapılan Çalışmalar

Tai ve ark.¹⁷ insan serumunda progesteronu belirlemek için LC-MS/MS (Sıvı Kromatografi-Ardışık Kütle Spektroskopisi) yöntemini geliştirmişlerdir. Bu yöntemde, serumda hekzan ile ekstraksiyon yapılarak elde edilen analit ve internal standart olarak kullanılan progesteron-¹³C₂' i, asetonitril-su hareketli fazı ile gradient elüsyon yaparak 0,25 mL/dak akış hızında ve 30 °C kolon sıcaklığında ayırmışlardır. Sonuç olarak bu yöntem de geri kazanım değerini % 100,1- % 100,9 arasında ve tayin alt sınırı 1,8 pg/g olarak belirtmişlerdir.

Guo ve ark.⁵ eş zamanlı olarak LC-APPI-MS/MS sistemi kullanılarak insan serumundan progesteron ve 11 steroidi belirlemede yöntem geliştirmişlerdir. 200 µl serum örneklerine 60 ng kortizol içeren 10 µl asetonitril ve 300 µl internal standart (progesteron için döteryum işaretli progesteron – dg) eklenip karıştırılarak 13000 rpm

de 10 dakika santrifüj ederek 450 µl süpernatant da 900 µl deiyonize su ekleyip LC-APPI-MS/MS sistemine enjekte edilmişlerdir. LC-APPI-MS/MS sisteminde C-8 (3,3 cm×3 mm, 3µm) analitik kolon ve C-8 (3 mm) guard kolon kullanıp, gradient elüsyon yaparak, hareketli faz olarak solvent A=su-metanol (98:2), solvent B=% 100 metanol kullanmışlardır. Akış hızını 0,6 mL/dak olarak ayarlayıp tüm işlemleri oda sıcaklığında gerçekleştirmişlerdir. Pozitif iyon modunda belirtilen şartlar altında en iyi sonuçları almışlardır. Retensiyon zamanını 9,16 dakika, LOD değerini 1,5 pg/mg, r değerini 0,996, geri kazanım değerini ise % 91,4- % 97,4 arasında belirlemişlerdir.

Hill ve ark.³³ methoxyamine-trimetylsilyl ile türevlendirilip daha sonra dietileter ile hamile insan plazmasından ekatraksiyonu yapılmış progesteronu GC-MS yöntemiyle belirlemişlerdir. Analizde iç standart olarak 17α-Estradiol kullanılmıştır. GC-MS sisteminde orta polariteli 2B-50 (15 m×0,25 mm, 15 µm) kapiler kolon kullanarak, sıcaklık dakikada 40 °C artacak şekilde 120 °C den 310 °C ye çıkarılıp, 310 °C de 3 dakika tutmak suretiyle yöntem şartları ayarlanmıştır. Bu şartlar altında progesteronun alıkonma zamanı 11,2 dakika, günler-arası tekrarlanabilirlik değeri % 10'dan küçük, hassasiyet ise 2,09 pg/mL olarak tespit etmişlerdir.

Almeida ve Nogueira²⁰ idrar ve suda progesteronu belirlemede HPLC-DAD yöntemini geliştirmişlerdir. 37 haftalık hamile insanlardan toplanan idrar örnekleri, metanol ve asetonitril ile ekstraksiyon işleminden sonra kalıntıyı %10'luk asetonitril de çözüp HPLC sistemine enjekte etmişlerdir. 240 nm de gerçekleştirilen analiz işleminde, 120 ODS-A (150 mm×4.0 mm, 5 µm) kolon kullanarak, yöntem şartlarını, 25 °C kolon sıcaklığı, 30 µl enjeksiyon hacmi, 200 µl/dak akış hızı ve hareketli faz olarakta asetonitril olacak şekilde belirlemiş ve suya 10 µg/mL progesteron ekleyerek, 11,2 µg/mL olarak progesteron tespit etmişlerdir. 0,3-5 mg/L derişim aralığında yapılan

alışmalar sonucunda alıkonma zamanı 34,40 dakika, LOQ değerini 150 µg/L, LOD değerini 50 µg/L ve R^2 değerini 0,9995 olarak belirlemişlerdir.

Murphy ve Allison²¹ çalışmalarında insan serumundan progesteronu ve A halkası içeren bazı metabolitlerini HPLC sisteminde saflaştırarak radioimmunoassay (RIA) yöntemiyle derişimlerini belirlemişlerdir. Serum rnekleri hekzan ile ekstrakte edilip, azot gazı ile uçurulduktan sonra, metilen diklorit de mş, daha sonra HPLC sisteminde ayırarak miktar analizi için RIA sistemine enjekte etmişlerdir.

Pucci ve ark.³⁴ HPLC ve spektrofotometre yöntemlerini kullanarak ticari preparatlarda progesteron miktar tayinini gerçekleştirmişlerdir. Progesteron içeren ticari preparatlar metanolde zlp, karıştırıldıktan sonra, 15 dakika 3000 rpm de santrifüjü edilerek süpernatantları filtreden geçirilip analiz etmişlerdir. HPLC yöntemi 245 nm de C-8 kolon ve UV dedektör kullanarak, yöntem şartlarını enjeksiyon hacmi 20 µL, akış hızı 1 mL/dak, hareketli faz 2-propanol-fosfat buffer (pH=2.5; 30 mM) (50:50) olacak şekilde ayarlamışlardır. 25-500 ng/mL derişim aralığında gerçekleştirilen analizde progesteronun alıkonma zamanını 6 dakika, LOQ ve LOD değerlerini sırasıyla 20 ng/mL ve 10 ng/mL, geri kazanım değerlerinin ise % 99,3-104,8 arasında olduğunu ifade etmişlerdir. Spektrofotometrik yöntem 240 nm dalga boyunda, türev spektrofotometrik yöntem ise maksimum dalga boyu 253 nm ve minimum dalga boyu 227 nm de absorbens göstermiştir. 2-50 µg/mL derişim aralığında gerçekleştirilen spektrofotometrik çalışmalarda progesteron 2-propanolde zlrek spektrumlar alınmış ve analiz sonucunda LOQ değerini 2 µg/mL, LOD değerini 1,5 µg/mL, geri kazanım değerlerini ise % 98,4-% 100,3 arasında tespit etmişlerdir.

Zarzycki ve ark.²⁷ katı faz ekstraksiyonunu kullanarak insan plazmasından progesteronu belirlemek için HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. LC-18 (5 µm, 25 cm ×

4.6 mm) kolon, Diode Array Detektör, iç standard olarak 7,8 dimethoxyflavone, % 35 (v/v) asetonitril-su-12 mM β -cyclodextrin hareketli faz, 29 °C kolon sıcaklığı, 1 mL/dak akış hızı ve 240 nm dalga boyu çalışma parametrelerini kullanarak geri kazanım değerini % 85,3 olarak belirlemişlerdir.

Shi ve ark.²⁸ çalışmalarında progesteron ve 8 ayrı steroid ilaç kullanarak sahte ilaçları belirlemede HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Çalışmada 245 nm dalga boyu, C-18 (5 μ m, 150 mm $\times$ 4,6 mm) kolon, 1 mL/dak akış hızı, metanol-su (70:30) hareketli faz ve 10 μ L enjeksiyon hacmini kullanmışlardır. 20 mg/mL progesteron ilk önce 20 mL tetrahidrofuran da çözüldükten sonra metanol ile seyreltilerek 0,40-160 μ g/mL derişim aralığında standart çözeltiler hazırlamışlardır. Bu şartlar altında gerçekleştirilen analizde sonucunda geri kazanım değerini % 101,2, LOQ değerini 0,21 μ g/mL, LOD değerini 0,06 μ g/mL, gün-içi ve günler-arası bağıl standart sapma değerlerini sırasıyla % 0,08 ve % 0,40 olarak belirlemişlerdir.

Sheehan ve ark.²⁹ çalışmalarında hamile insan plazmasında progesteronu ve progesteronun metaboliti olan 5 β -Dihidroksiprogesteronu belirlemek için HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Hekzan kullanılarak yapılan ekstraksiyon işleminden sonra elde edilen organik faz uçurulup asetonitrilde çözüldükten sonra HPLC sistemine enjekte etmişlerdir. 260 nm dalga boyunda ve UV dedektör kullanarak gerçekleştirilen yöntemde, C-18 (25 cm $\times$ 4.6 mm) kolon ve hareketli faz olarak asetonitril-su (60-40) kullanılarak, akış hızı 1 mL/dak olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu şartlar altında plazmadan ayrılan progesteronu ve progesteronun metaboliti olan 5 β -Dihidroksiprogesteronun derişimini belirlemede radioimmünoassay yöntemi kullanıp, geri kazanım değerinin % 71,5 olduğunu belirtmişlerdir.

Cruz ve ark.¹⁴ çalışmalarında progesteron ve östrojeni belirlemede kütle spektroskopik (MS) yöntemlerinden GC-MS, LC-MS, LC-MS/MS yöntemlerini geliştirmişlerdir. Farklı çevresel örneklere katı faz ekstraksiyonu yapılarak GC-MS, LC-MS ve LC-MS/MS sistemlerine uygulamışlardır. GC-MS tekniğinde steroidler türevlendirilmiş ve türevlendirmede bis(trimetilsilil) trifloroasetamit (BSTFA), N-metil-N-tent –butildimetil trifosfoasetamit ve pentafloropropiyonik asit anhidrit (PFPA) kullanılmıştır. GC-MS yönteminde progesteron için belirlenen tayin alt sınırı 5 ng/mL olarak belirlemişlerdir. LC-MS yönteminde progesteron için SIM (selected ion monitoring) ve PI (pozitif iyon) modlarında elde edilen değerlerin diğer şartlara göre daha iyi olduğu belirlenmiştir. LC-MS/MS tekniğinde ESI (elektronik sprey iyonizasyon) ve SRM (selected reaction monitoring) mod durumunda en iyi sonuç alındığı ifade edilmiştir. Yapılan bu üç teknikten LC-ESI-MS/MS tekniğinin daha küçük limitleri belirlemede (0,4-10 ng/mL) kullanılabilecek en iyi yöntem olduğu belirtilmiştir.

Ma ve Kim¹⁵ çalışmalarında LC-MS yöntemini geliştirip 29 farklı steroidi belirlemişlerdir. 29 farklı steroid içeren karışım hem APCI (atmosferik basınç kimyasal iyonizasyonu) hemde ESI (Elektrosprey iyonizasyon) modlarıyla analiz edilip en iyi hassasiyet ve düşük tesbit limitleri bulunmaya çalışılmıştır. APCI ve ESI modlarında C-18 kolon (2,1×150 mm,5 m), metanol-su (80-20) hareketli faz kullanılarak, 0,4 mL/dak akış hızında analiz gerçekleştirilmiştir. APCI modunda kapiler sıcaklık 250-290 °C, gaz akışı 20-30 psi, ESI modunda ise gaz akışı 60-70 psi, kapiler sıcaklık ise APCI moduyla aynı ayarlanmıştır. Bu şartlar altında progesteronun ve diğer 28 steroidin belirlenmesinde APCI modunun en hassas ve tayin alt sınırı en düşük (5-15 pg/mL) olduğu belirtilmiştir.

Klima ve ark.³⁰ çalışmalarında 3 farklı çeşit zebra türünün plazmalarındaki progesteron ve 5 α -dihidroksi progesteron miktarlarının, hamile ve hamile olmayan zebралarda nasıl değiştiğini HPLC ve EIA (enzim immünoassy) yöntemlerini geliştirerek belirlemeye çalışmışlardır. Plazma örnekleri 2 mL petrol eter ile ekstrakte edilip, organik fazlar alınarak uçurulmuş, daha sonra 1mL % 40 lık metanolde çözülerek ayrılmak üzere HPLC sistemine enjekte edilmiştir. HPLC sistemi 25 °C de ultracept ES100 RP-18 (6 μ m, 250 mm $\times$ 4 mm) kolon kullanılarak, akış hızı 1mL/dak hareketli faz izokratik elüsyonla iki sistemde gerçekleştirmişlerdir. Birinci sistemde asetonitril-20 mM trisasetat pH=7,2 (75:25), ikinci sistem de ise metanol-20 mM trisasetat pH 7,2 (82:18) olarak gerçekleştirilmiştir. Ayrılan fraksiyonlarda progesteron ve 5 α -dihidroksiprogesteron belirlenmek üzere EIA sistemine enjekte edilmiştir. Belirlenen progesteron miktarları hamileliğin ikinci haftasında en yüksek seviyede (55 ng/mL) olduğu, hamile olmayan zebралarda ise farklı 3 tür zebra arasından en yüksek seviyenin 24 ng/mL olduğu belirtilmiştir. 5 α -dihidroksiprogesteron ise hamileliğin yedinci ayında en yüksek seviyede (368 ng/mL), hamile olmayanlarda ise 45 ng/mL değerinde olduğu ifade edilmiştir.

Murphy ve ark.³¹ hamile insan plazmasında HPLC yöntemini geliştirerek hamilelik haftalarındaki plazma progesteron derişimlerinin farkını bulmuşlardır. 0,5 mL plazma örnekleri tolue ile ekstrakte edildikten sonra metilen klorit ile çözüp HPLC sisteminde ayırım yapmışlardır. Daha sonra ayrılan fraksiyonlar RIA (radioimmunoassay) yönteminde gerçekleştirilen analiz sonucunda 36-38. haftalar arasında plazmadaki progesteron miktarının (718 nmol/L) en yüksek olduğu belirtilmiştir.

Orsi ve ark¹⁶ çalışmalarında bazı kozmetik krem ve losyonlardan progesteron belirlemede HPLC ve HPLC-MS yöntemlerini geliştirmişlerdir. 1 mL veya 1 g kozmetik ürün (losyon ve krem) 1:1000 oranında metanol ile seyreltildikten sonra, 10 dakika 40 °C de ultrasonic banyoda muamele edilerek santrifüjlenip süpernatant kısım ayrılmıştır. Analizde iç standart olarak benzoik asit kullanılmış olup standart progesteron çözeltilerini metanol de hazırlayarak +4 °C de saklamışlardır. HPLC-DAD yönteminde Zorbax SB-CN (250mm×4.6mm; 5 m) kolon ve hareketli faz olarak su-asetonitril kullanılarak gerçekleştirilen analizde, akış hızı 1,2 mL/dak, kolon sıcaklığı 30 °C, enjeksiyon hacmi 10 µL olacak şekilde ayarlanmıştır. HPLC-MS sisteminde yöntem koşulları hareketli faz ve kolon HPLC-DAD sistemi ile aynı, akış hızı 10,0 mL/dak, scan modu SIM, iyonizasyon modu; pozitif ESI mod, 40 psi basınç, 4000 V kapiler voltaj olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu şartlar altında progesteronun HPLC-DAD sisteminde LOQ değeri 1,9 µg/mL, LOD değeri 0,6 µg/mL, R² değeri 0,9993, geri kazanım değeri % 91,7-97,1 arasında olduğunu, HPLC-MS sisteminde ise LOQ değeri 52 ng/mL, LOD 17 ng/mL, R² değeri 0,9902, geri kazanım değerinin ise 92,1-96,5 arasında olduğunu belirtmişlerdir.

Wu ve ark.¹⁸ çalışmalarında insan serumunda norgestrel ve progesteronu belirlemede HPLC-MS/MS-APCI yöntemini geliştirmişlerdir. 1 mL serum numunesine 1 mL metanol ve iç standart olarak 25 µL norethisterone ekleyerek 2 mL dietil eter ile ekstrakte etmişlerdir. Santrifüj edildikten sonra organik faz uçurulmuş ve 200 µL hareketli fazda (metanol-su, 80:20) çözüldükten sonra 20 mL HPLC-MS/MS-APCI sistemine enjekte etmişlerdir. C-18 kolon kullanarak gerçekleştirilen analizde akış hızını 1mL/dak olarak ayarlamışlardır. Bu şartlar altında LOQ değerini 0,2 ng/mL, geri kazanım değerini % 80,4– % 93,5 arasında belirlemişlerdir.

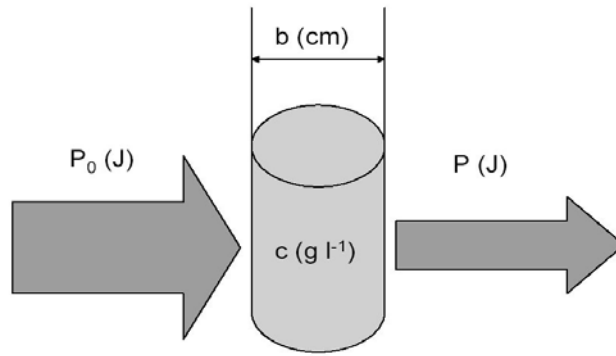
2.4. Spektroskopik Yöntemler

Elektromagnetik ışınının 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. 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^{38,39}.

2.4.1. Işının Absorplanması

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



Şekil 2.4: Absorblayan bir çözeltiye giren P_0 şiddetindeki ışın demetinin P şiddetine düşmüş olarak çıkması

Çözeltiye P_0 şiddetinde giren ışın çözeltiyi P şiddetinde terk eder. Fotonlarla ışın absorblayan atom veya moleküller arasındaki etkileşimin sonucu olarak ışının gücü P_0 'dan P 'ye düşmüş olur. Buna göre ışın demetinin ortamdan geçme oranına geçirgenlik (T) adı verilir³⁸⁻⁴⁰.

$$T = P / P_o$$

şeklinde gösterilir. Geçirgenliğin eksi logaritması absorbands (A) olarak adlandırılır ve absorbands

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

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

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

olarak ifade edilir.

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 ayrılır⁴⁰.

2.4.2. 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

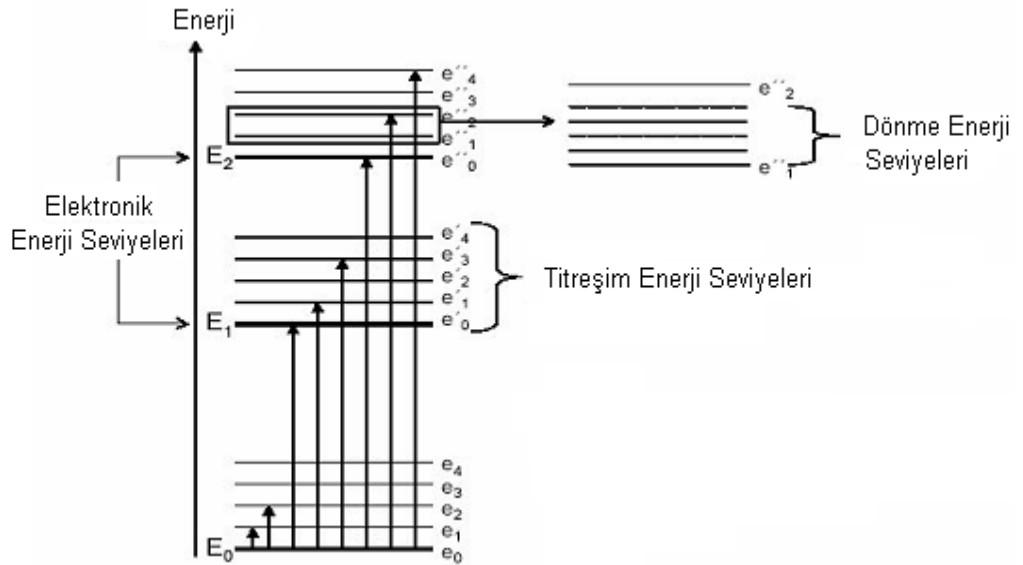
elektronlarının uyarılması üzerine kurulmuş olan spektroskopi dalına ise X-ışınları spektroskopisi denir.

2.4.3. 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. Bir molekülün toplam enerjisi E_T ;

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

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.^{39,40}



Şekil 2.5: 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.

2.4.4. Lambert Beer Kanunu

Aynı cins moleküllerin bulunduğu homojen bir ortamda monokromatik bir ışık geçirildiğinde, ortamın her kesri ışığı aynı oranda absorblar. Monokromatik bir ışın için; absorbans (A), ışının absorblayıcı ortamda katettiği yol (b) ve absorblayıcı türün derişimi (C) ile doğru orantılıdır.

$$A = \epsilon \times b \times C \quad \epsilon : \text{Absorbivite Katsayısı}$$

2.4.5. Ultraviyole-Görünür Bölge Spektrofotometreleri

Spektrofotometre, elektromanyetik ışının dalga boyunun bir fonksiyonu olarak numunenin absorbans veya geçirgenliğini ölçmek için kullanılan bir cihazdır. 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. 160-400 nm aralığında

ışın üretmek için döteryum lambası, 400-2500 nm arasında ışın üretmek için tungsten lambası kullanılmaktadır³⁸⁻⁴⁰.

Ultraviyole-Görünür Bölge spektrofotometreleri yapılarına göre iki kısma ayrılır;

1- Tek ışınlı spektrofotometreler

2- Çift ışınlı spektrofotometreler

2.4.6. UV-Görünür Bölge Spektrofotometre Cihazının Kullanım Amaçları

2.4.6.1. 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 yapıli 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, ultraviyole

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 etkileşimleri 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 olurlar³⁹.

2.4.6.2. Kantitatif Analiz

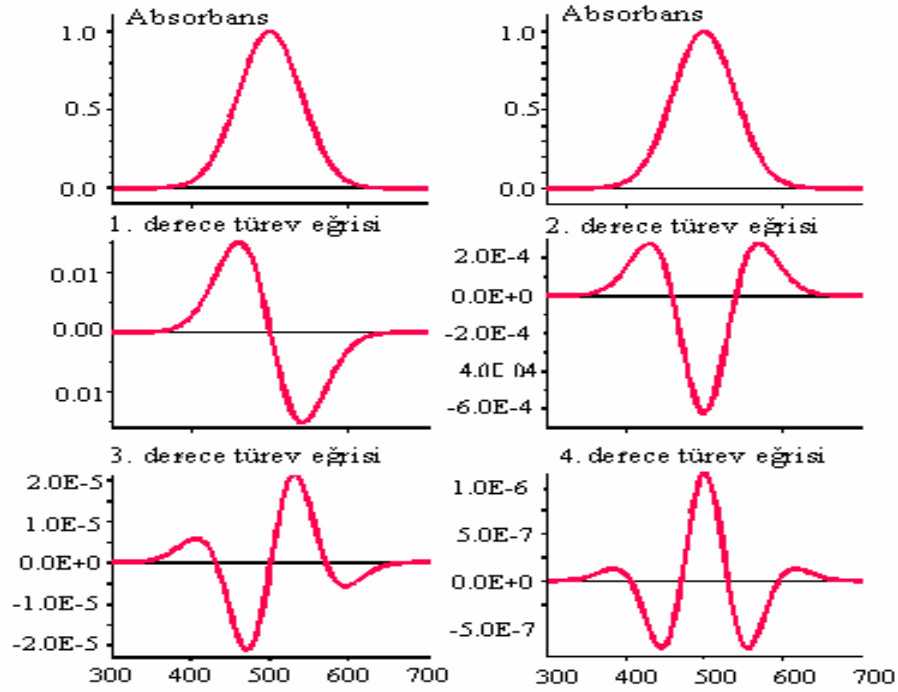
Ultraviyole ve Görünür Bölge absorpsiyon spektroskopisi, kimyacıların kantitatif analizlerde en çok faydalandıkları tekniklerden biridir. Kantitatif analizde, ilk önce analizi yapılacak maddenin en iyi absorbands yaptığı dalga boyu bulunur ve bu dalga boyunda spektrumu alınır. Belirlenen dalga boyu sabit tutularak, artan derişimlerde hazırlanan çözeltilerin absorbandsları okunur. Derişime karşı absorbands 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.

2.5. Türev Spektrofotometri Yöntemi

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

Türev tekniği orijinal spektrumun eğimleri hakkında bilgi vererek bunun omuz noktaları ile dönüm noktalarının daha belirgin hale gelmesine neden olur. Böylece bir bileşik daha kolay ve daha kesin olarak tanımlanabilir. Orijinal spektrumlarda üst üste binen çakışan bantlar varsa, bu spektrumların bantları alınarak bantların belli oranda birbirinden ayrılması sağlanır. Bu yöntemle karışımların analizleri de yapılabilmektedir. Spektrofotometrede bulanık çözeltiler ile çalışırken çökme hızı tanecik büyüklüğü gibi etkenlere bağlı olarak büyük oranda hata yapılırken türev alınarak bulanıklığın oluşturduğu bu etki ortadan kaldırılabilir.

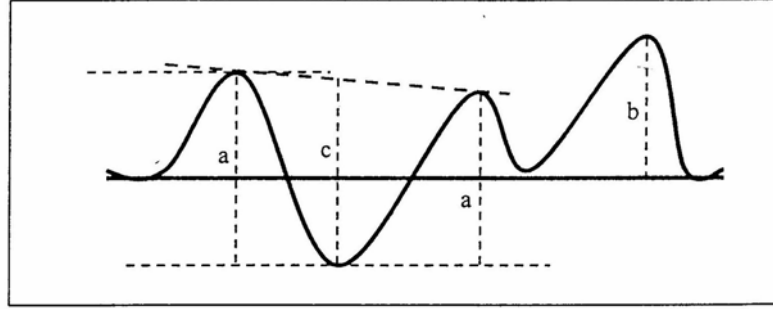
Şekil 2.6' da görüldüğü gibi bir çan eğrisinin 1. derece türev eğrisi orijinal spektrumdaki eğrinin teğetlerinin eğimini göstermektedir. Böylece türevlendirme ile spektrum daha ayrıntılı ve net bir görünüm kazanır ¹⁷.



Şekil 2.6: Absorbans ve Türev Spektrumları

Türev spektrumlarıyla karışım içerisinde herhangi bir ayırma işlemi gerekmeksizin bazı maddelerin diğerleri yanında miktar tayinlerinin yapılabilmesi mümkündür. Bu da özellikle karışım halinde maddeleri; etken maddeler olarak içeren farmasötik preparatların analizi için yöntemin çok etkili ve kolay bir miktar tayini yöntemi olmasını sağlar.

Türev spektrumlarının değerlendirilmesinde üç yöntem vardır. Bunlar, pikten pike ölçüm, pikten sıfıra ölçüm ve teğet ile ölçümdür⁴¹.



Şekil 2.7: Türev spektrumlarının değerlendirilmesi; a) Pikten pike ölçüm, b) Pikten sıfıra ölçüm, c) Teğet ile ölçüm

Türev Spektroskopisi Yönteminin Uygulamaları;

- İlaç analizlerinde
- Aynı spektral bölgede absorpsiyon yapan ilaç karışımlarının tayininde
- Etken maddenin bozunma ürün varlığı tayininde
- Bozucu etki yapan matriks bileşenlerinin varlığında etken maddenin tayininde

uygulanmaktadır.

2.5.1. Türev Spektroskopisi Yönteminin Avantajları ve Dezavantajları

Avantajları:

1. Türev çalışması orijinal spektrumun eğimleri hakkında bilgi verir ve bunun omuz noktaları ile dönüm noktalarının daha belirgin hale gelmesine neden olur. Böylece bir bileşik daha kolay ve kesin olarak tanınabilir.

2. Çoğunlukla orijinal spektrumda elde edilen bu eğriler birçok pikin üst üste gelmesiyle meydana gelmiştir. Türev alma ile bu absorpsiyon eğrileri daha ayrıntılı şekle girer ve böylece bir anda bulunan piklerin tek tek görünmesi sağlanır.

3. Bilindiği gibi spektrofotometride bulanık çözeltiler ile çalışırken çökme hızı tanecik büyüklüğü gibi faktörlere bağlı olarak büyük oranda hata yapılabilir. Türev

eğrilerinin hazırlanması ile bulanıklığın oluşturduğu bu olumsuz etki ortadan kaldırılabilir.

4. Birden fazla maddenin karışım halinde bulunduğu ortamlarda ekstraksiyon ve kromatografi ile herhangi bir ayırma işlemine başvurmaksızın tek tek miktarları tayin edilebilir.

5. Reaksiyon ortamından kaynaklanan gürültü piklerinin yok edilmesi sağlanır.

Dezavantajları:

1. Kullanımı çok kolay olmasına karşılık pahalı spektrofotometrelerde bulunur ve oldukça karmaşık bir elektronik yapıya ihtiyaç vardır.

2. Türev spektrumlarında çok sayıda uyduruk piklerde görülür. Bu pikler bir karışım ile çalışırken başka bileşenlerinde varlığına bizi götürür. Türev derecesi arttıkça bu cins piklerin sayısı da artacağı için karışıklık daha da artacaktır.

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 topluluğudur³⁸⁻⁴². 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 ayırmalarda; 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 elenme özelliklerine bağlı olarak, sabit ortamdan ayrılma yöntemlerine kromatografi denir.

2.6.1. Kromatografik Yöntemlerinin Sınıflandırılması

Kolon kromatografide sabit faz dar bir kolonda tutulur ve hareketli faz basınç altında iken bu sabit faz arasından geçmeye zorlanır. Düzlemsel kromatografide ise, sabit faz düz bir plaka üzerine veya bir kâğıdın gözenekleri arasına tutturulur ve bu durumda hareketli faz durgun faz arasından kapiler etkisiyle veya yer çekimi etkisiyle hareket eder. Bunun dışında kromatografik yöntemler ayırma işlemlerinin farklılığına göre çok daha değişik şekillerde sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırmalar aşağıdaki şekilde verilebilir.

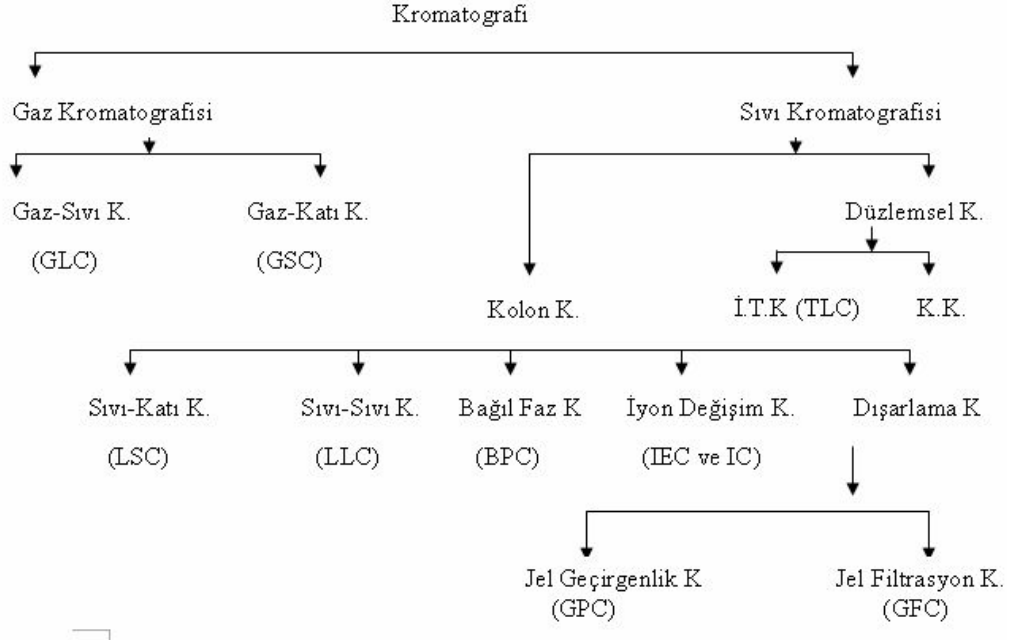
1. Teorik Sınıflandırma

- a-** Paylaşım Kromatografisi
- b-** Adsorpsiyon Kromatografisi
- c-** Boyut Eleme Kromatografisi
- d-** İyon Değişim Kromatografisi

2. Pratik Sınıflandırma

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

3. Hareketli ve Durgun Fazlara Göre Sınıflandırma



2.6.2. Kromatografide Temel Olan Fiziksel ve Kimyasal Olaylar

Kromatografik yöntemlerde maddelerin ayrılmasında etkin olan dört ayrı mekanizma mevcuttur. Bunlar aşağıda özetlenmiştir^{38, 39, 42}.

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 kromatografisi 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 bağl 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.

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.

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; $\text{Na}_2\text{Al}_2\text{Si}_4\text{O}_{12}$ formülündedir.

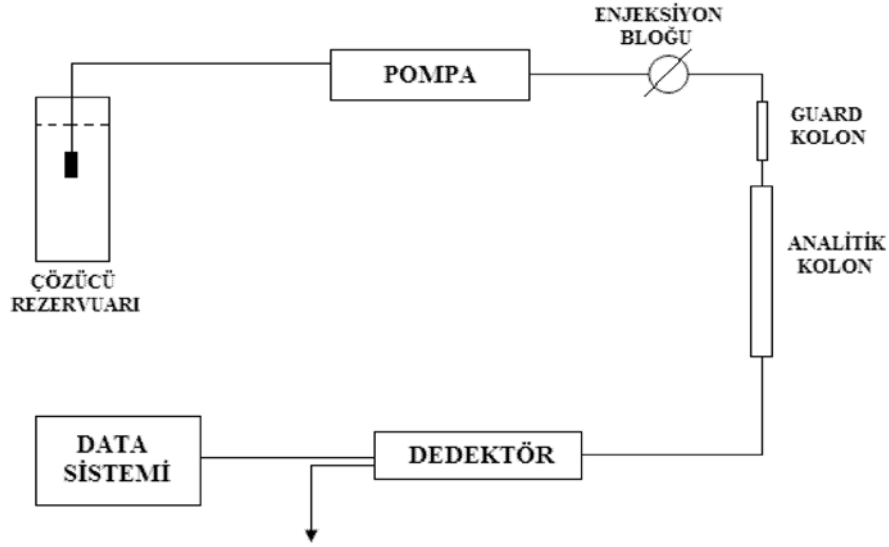
İyon değiştirme kromatografisi, ilaçlar ve bunların metabolitleri, serumlar, gıda koruyucu maddeler, vitamin karışımları, şekerler ve farmasötik preparatlar gibi birçok farklı organik ve biyokimyasal sistemlere uygulanabilmektedir.

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.

2.7. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Küçük dolgu maddeleri ile doldurulup yüksek basınç altında bir kolonda yapılan kromatografi türlerine yüksek performans sıvı kromatografisi denir³⁹. 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 ayrılır³⁹. 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. 8: Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (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 viskozitesi değişirse oluşan iç basınç değişikliği, motorla sağlanan basınç değişikliği ile kapatılır.

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

- 1- 6000 psi ye kadar basınç üretmek
- 2- Pulse-free çıkış vermek

3- 0,1-10 mL/dak 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.

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 1-8 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 olabilmektedir. 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)	Akış Hızı (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 çalışması 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.

2.7.4. Dedektörler

Dedektörler, kolondan çıkan elüatın içindeki maddeleri saptamaya yarayan aletler olup temelde universal ve seçici olmak üzere ikiye ayrılmakta, seçici dedektörler arasında floresans dedektörler, elektrokimyasal dedektörler, UV-visible dedektörler, diod array dedektörler, universal dedektörlerdende reflaktif indeks dedektörleri uygulamada çok kullanılan dedektörlerdir. Universal 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, kütle spektrometre, radyoaktivite, fotokondüktivite, IR ve kütle dedektörleri gibi dedektörler bulunmakla birlikte bunların yaygın kullanım alanları yoktur.

2.7.4.1. UV Dedektörler

Çoğu ilaç analizlerinde kullanılabilen UV dedektörler, fotometrelerden farklı olarak, küçük bir akış hücresi (flow-cell) taşıyan ve bu hücrenin içinden geçerken maddeler tarafından absorblanan UV ya da görünen ışını saptayabilen dedektörlerdir. Bu dedektörler, sabit ve değişken dalga boylu dedektörler olmak üzere ikiye ayrılırlar.

Sabit dalga boylu dedektörler (FWD): Basit bir dedektör olup, dalga boyunun seçimi için farklı interferanslı filtreler kullanılır. Bu dedektörlerde genellikle UV

kaynağı olarak cıva lambası kullanılır. Bunun dışında alternatif ışık kaynakları ile daha değişik dalga boylarını gözlemek de mümkündür.

Değişken dalga boylu dedektörler (VWD): 108-400 nm arasında sürekli radyasyon verebilen döteryum lambaya veya 400-800 nm arasında ışık veren bir tungsten lambaya sahip bulunan istenilen dalga boyunu seçmek için de bir monokromatör taşıyan fotometrelerdir. Maddenin maksimum absorpsiyonun bulunduğu dalga boyunda çalışma olanağı sağlayan bu dedektörler, hassasiyeti artırdığı için ve düşük dalga boyunda çalışabildiği için son derece değerlidir.

2.7.4.2. Diyod Array Dedektörler

Değişken dalga boylu UV dedektörlerdir. Hem sabit hemde taramalı dalga boylarında incelemeye müsait olan dedektörlerdir. Diyod array dedektör seçimlilik ve hassasiyet açısından değişken dalga boylu UV dedektör ile aynı avantajlara sahiptir. Buna ek olarak;

1. Aynı anda spektrumun bütün dalga boylarında piklerin ölçümü yapılabilir.
2. Tek bir enjeksiyonla maksimum dalga boyu saptanabilir.
3. Birden fazla dalga boyunda kromatogramların ve kromatogramlardaki piklerin UV-Görünür Bölge spektrumları alınabilir.
4. Kromatografik olarak ayırlanmamış piklerin nicel analizi yapılabilir.
5. Spektrumların karşılaştırılması yöntemi ile pik saflığının tespiti yapılabilir.
6. Pikin kimliğinin doğrulanması yapılabilir.

2.8. Yüksek Basıncılı 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 bileşikler 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. Analitik Yöntem Validasyonu

USP XXIII/NF’de verilen tanıma göre 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. Saklanan örneklerin stabilitesi (stability)
2. Doğrusallık (Linearity)
3. Doğruluk (Accuracy)
4. Kesinlik (Precision)
5. Tekrarlanabilirlik (reproducibility)
6. Seçicilik (selectivity)
7. Duyarlılık Limiti (Sensitivity Limit)
8. Tutarlık (Ruggedness)

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.

2.9.1. Stabilité

Saklanan örneklerde analiz süresince analitin stabil kaldığından emin olmak için, yöntem geliştirirken stabilite testlerinin yapılması gereklidir. Normal laboratuvar şartlarında nem, sıcaklık, ışık ve hava gibi etkilere saf analit ve/veya analit çözeltisinin stabilitesi yayınlanmış literatürlerle ve laboratuvar testleri ile incelenmelidir.

Stabilite için bilinen miktarlarda ilaç içeren biyolojik sıvılar kullanılabilir. Örneklerin dondurulması ve eritilmesi durumları da stabilite dönemi içinde tutulmalıdır.

2.9.2. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi

Standart çözeltiler, deneydeki en yüksek ve en düşük konsantrasyondaki örnekleri içermelidir. Bu aralıkta 6 noktadan az standart bulunmamalıdır. Ağırlıklı ve ağırlıksız en küçük kareler yöntemi esas alınarak yapılan regresyon analizi ile standart eğrinin doğru denklemi bulunmalıdır. Regresyon doğrusunun eğimi, doğrusallığın matematik ölçüsüdür.

2.9.3. Doğruluk ve Kesinlik

Doğruluk, gerçek değere olan yakınlığı olarak ifade edilir ve bağıl mutlak hata ile ilgilidir. Yüksek duyarlılıkta bir tayin, düşük duyarlılık limiti ve kesinlik ile geliştirilebilir. Kesinlik, deney sonucu elde edilen değerlerin birbirine olan yakınlığını ifade eder ve % BSS, % CV ile verilir. Yeniden yapılabilirlik, farklı koşullarda aynı yöntemle hazırlanan örneklerden elde edilen sonuçların uyumu, tekrarlanabilirlik ise aynı örnekten kısa zaman aralıkları ile elde edilen sonuçların uyumunu ifade eder. Kesinlik çalışma sonuçları tekrarlanabilirlik için kullanılabilir.

2.9.4. Duyarlılık

Analitik yöntemin düşük derişimleri saptayabilme yeteneğidir.

Tayin Alt Sınırı (Limit of Quantitation: LOQ): Belirlenen deney koşulları altında, örnek içinde kabul edilebilir doğruluk ve kesinlik ölçülebilen en düşük madde derişimidir. Kromatografik çalışmalarda tayin alt sınırı pik alanının gürültü alanına oranının 10 olduğu derişim olarak belirlenir.

Gözlenebilme Sınırı (Limit of Dedection: LOD): Belirlenen deney koşullarında saptanabilen en düşük derişimdir. Bir sınır değeri olup, madde derişiminin belirli bir

derişim altında veya üstünde olup olmadığı saptanır. Genellikle kromatografik cevapta sinyal /gürültü (S/G) oranının 2:1 veya 3:1 olması kabul edilebilir cevaptır. Bu sınır, saptama sınırında hazırlanmış uygun sayıda örneğın analizi ile gerçekleşir.

2.9.5. Tutarlılık

Yöntemin farklı deney koşullarında, farklı alet, farklı analist, farklı laboratuvar, farklı koşullarda hazırlanan reaktiflerle ve farklı günlerde gerçekleştirilmesi ile elde edilen bulguların tekrarlanabilme derecesidir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kimyasal Maddeler ve Cam Malzemeler

Asetonitril HPLC grade (Merk, Almanya)

Etanol (Riedel-de hean)

Sodyum Hidroksit (Merck, Almanya)

Hekzan (Riedel-de hean)

Progesterone (Riedel de hean)

Dietil Eter

Deiyonize Su

Deney tüpü

Vial ve insert

Otomatik pipetler (10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl ve 1000-5000 µl)

Kuvartz Küvet

3.2. Cihazlar

Santrifüj (Hettich, RPM x 100)

Terazi (Bosch S 2000)

Karıştırıcı Vorteks (IKA)

Su banyosu (GFL)

Etüv (Memmert)

Vakum pompası (Phenomenex)

Spektrofotometre sistemi:

Spektrofotometre (Thermospectronic, HeλIOS β)

Bilgisayar (Vestel)

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) Sistemi:

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (Thermoquest)

DAD (Diyod Array Dedektör) dedektör (Thermoquest UV 6000 LP)

Degazer (Thermoquest SCM 1000)

Pompa (Thermoquest SCM 1000)

Kolon (C₁₈, 5 µm, 150 mm x 4,6 mm) (Agilent, USA)

Otoörnekleyici (Thermoquest AS 3000)

Bilgisayar (Vestel)/ Software (Thermoquest)/Printer (HP))

3.3. Yöntemler

3.3.1. Spektrofotometri Yöntem Şartları

3.3.1.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri Şartları

Progesteron için UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yöntem şartları Tablo 3.1’de verildi.

Tablo 3.1: UV-Görünür Bölge Spektrofotometri şartları

Yöntem Şartları	Progesteron
Data modu	Absorbans
Start Lamba (nm)	210
Stop Lamba (nm)	280
Lamba Değişimi (nm)	325
Tarama Hızı	600 nm/dak
Bant Genişliği	2 nm
Düzgünlük	Yüksek

3.3.1.2. Türev Spektrofotometri Yöntem Şartları

Progesteron için Birinci-Türev Spektrofotometri yöntem şartları Tablo 3.2’ de verildi.

Tablo 3.2: Progesteronun Birinci-Türev Spektrofotometri yöntem şartları

Yöntem Şartları	Progesteron
Data modu	1.Türev (1D)
Start Lamba (nm)	210
Stop Lamba (nm)	280
Lamba Değişimi (nm)	325
Tarama Hızı	600 nm/dak.
Bant Genişliği	2 nm
Türetim aralığı ($\Delta\lambda$)	21,0
Düzensizlik	Yüksek

3.3.2. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

10 mg progesteron 100 mL etanolde çözülerek 100 µg/mL’lik stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltilerden standart ve türev için 0,5-15 µg/mL’ lik derişim aralığında çalışma çözeltileri, plazma için 0,5 mL boş plazmalar kullanılarak, hazırlanan çalışma çözeltileri eklenip (spike edilip) ekstraksiyon prosesi uygulanarak 1-15 µg/mL’ lik derişim aralığında çalışma çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan bütün çözeltiler -20 °C de saklandı.

3.4. Kromatografik Yöntem Şartları

3.4.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC-DAD) Yöntem Şartları

HPLC-DAD çalışmasında, progesterone için uygulanan kromatografik yöntem şartları Tablo 3.3’ de verildi.

Tablo 3.3: Progesteron için HPLC-DAD yöntem şartları

Yöntem Şartları	Progesteron	
	Standart	Plazma
Kolon	C ₁₈ (5 µm, 150 x 4,6 mm)	C ₁₈ (5 µm, 150 x 4,6 mm)
Dedektör	DAD	DAD
Dalga boyu	240 nm	240 nm
Hareketli faz	Asetonitril/Su (70/30)	Asetonitril/Su (70/30)
Kolon sıcaklığı	-	-
Kolon akış hızı	1mL/dak	1mL/dak
Enjeksiyon hacmi	10µL	10µL

3.4.2. Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

100 µg/mL'lik stok çözeltiden 0,25-5 µg/mL' lik derişim aralığında standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Plazma için 0,5 mL boş plazmalar kullanılarak, hazırlanan çalışma çözeltileri eklenip ekstraksiyon prosesi uygulanarak 0,1-3 µg/mL' lik derişim aralığında çalışma çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan bütün çözeltiler -20 °C de saklandı.

3.5. Progesteronun Plazmadan Ekstraksiyon Prosesi

- 0.5 mL boş insan plazması santrifüj tüplerine koyuldu
- Uygun derişimlerde progesteron çözeltisi eklenerek 30 saniye karıştırıldı
- Tüplerin herbirine 1 mL 1 M NaOH eklendi.
- 30 saniye karıştırıldı
- 5 mL dietil eter- hekzan (%50-50) karışımı eklendi
- Tüplerin ağzı kapatılarak 1 dakika karıştırıldı
- Santrifüjlendi (4000 rpm, 8 dakika)
- Organik faz alındı
- Oda koşullarında azot gazı altında uçuruldu.

HPLC-DAD Yöntemi İçin

- Kalıntı 1 mL etanolde çözüldü
- 30 saniye karıştırıldı
- 45 µm gözenek büyüklüğüne sahip filtreden süzüldü
- Otomatik pipetle viallere koyuldu
- 10 µl HPLC sistemine enjekte edildi

UV-Görünür Bölge Spektrofotometri Yöntemi için

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

4. BULGULAR

4.1. Stabilite (Kararlılık)

Stabilite çalışması, progesteronun standart çözeltileri UV-Görünür Bölge spektrofotometri yöntemi ve 1. türev spektrofotometri yöntemleri kullanılarak, analiz boyunca hangi ortamlarda ne kadar süre ile bozunmadan stabil kaldığını belirlemek amacıyla yapıldı. FDA (Food and Drug Administration) rehberinde belirtilen kurallara göre (ortalamanın $\pm$ % 10) analitlerin stabilite şartları belirlendi ve analiz sonuçları değerlendirildi.

4.1.1. Progesteronun Standart Çözeltilerinin Stabilesi

Progesteronun (1, 6 ve 12 $\mu\text{g/mL}$), düşük, orta ve yüksek derişimlerde hazırlanan kalite kontrol çözeltileri 24, 48, 72, 96 ve 120 saat, +20 °C’de (oda sıcaklığı), 4 °C (buzdolabı) ve -20 °C’ de (derin dondurucu) bekletildikten sonra UV-Görünür Bölge spektrofotometri yöntemi ve 1. türev spektrofotometri yöntemi ile analizleri yapıldı. Bulunan değerler, yeni hazırlanıp analiz edilen standart çözeltilerin analiz sonuçları ile kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.1’ de verildi.

Tablo 4.1: Progesteronun standart kalite kontrol çözeltilerin stabilitesi

Derişim ($\mu\text{g/mL}$)	24 saat	48 saat	72 saat	96 saat	120 saat
Stabilite -20°C (derin dondurucu) (%GK $\pm$ SS)					
1	125,7 $\pm$ 0,700	149,2 $\pm$ 0,323	129,1 $\pm$ 0,312	134,3 $\pm$ 0,498	140,6 $\pm$ 0,429
6	108,6 $\pm$ 0,039	108,0 $\pm$ 0,166	108,1 $\pm$ 0,041	108,3 $\pm$ 0,163	109,3 $\pm$ 0,140
12	101,2 $\pm$ 0,111	104,0 $\pm$ 0,084	102,1 $\pm$ 0,041	102,9 $\pm$ 0,050	104,0 $\pm$ 0,046
Stabilite $+4^{\circ}\text{C}$ (buzdolabı) (%GK $\pm$ SD)					
1	148,1 $\pm$ 0,869	133,3 $\pm$ 0,655	137,7 $\pm$ 0,439	135,4 $\pm$ 0,707	141,0 $\pm$ 0,514
6	106,6 $\pm$ 0,073	106,7 $\pm$ 0,184	103,8 $\pm$ 0,159	103,0 $\pm$ 0,151	102,5 $\pm$ 0,080
12	104,1 $\pm$ 0,151	104,9 $\pm$ 0,038	102,9 $\pm$ 0,051	102,8 $\pm$ 0,112	102,9 $\pm$ 0,034
Stabilite $+20^{\circ}\text{C}$ (oda sıcaklığı) (%GK $\pm$ SS)					
1	132,7 $\pm$ 0,164	97,0 $\pm$ 1,337	121,3 $\pm$ 0,372	122,8 $\pm$ 0,842	125,3 $\pm$ 0,565
6	108,3 $\pm$ 0,114	104,7 $\pm$ 0,116	103,3 $\pm$ 0,088	105,9 $\pm$ 0,193	105,1 $\pm$ 0,469
12	101,7 $\pm$ 0,076	101,1 $\pm$ 0,111	100,6 $\pm$ 0,091	102,1 $\pm$ 0,171	101,4 $\pm$ 0,078

SS: standart sapma (n=3), %GK: yüzde geri kazanım

Birinci türev spektrumunda maksimum 230 nm’de, minimum 255 nm’ de olmak üzere iki pik gözlenmiş olup kalite kontrol çözeltilerle yapılan stabilite değerleri Tablo 4.2 ve Tablo 4.3’ de verildi.

Tablo 4.2: Progesteronun 230 nm de alınan 1.Türev kalite kontrol çözeltilerin stabilitesi

Derişim ($\mu\text{g/mL}$)	24 saat	48 saat	72 saat	96 saat	120 saat
Stabilite -20°C (derin dondurucu) (%GK $\pm$ SS)					
1	73,4 $\pm$ 2,160	102,7 $\pm$ 3,675	76,2 $\pm$ 2,489	78,4 $\pm$ 4,194	71,0 $\pm$ 2,970
6	99,9 $\pm$ 0,121	104,9 $\pm$ 0,460	100,4 $\pm$ 0,768	102,7 $\pm$ 0,375	101,6 $\pm$ 0,292
12	98,1 $\pm$ 0,315	99,7 $\pm$ 0,363	98,0 $\pm$ 0,167	99,1 $\pm$ 0,281	97,6 $\pm$ 0,440
Stabilite $+4^{\circ}\text{C}$ (buzdolabı) (%GK $\pm$ SS)					
1	88,6 $\pm$ 3,128	72,6 $\pm$ 4,300	71,4 $\pm$ 2,547	67,1 $\pm$ 2,983	69,4 $\pm$ 3,370
6	96,9 $\pm$ 0,599	97,0 $\pm$ 0,361	95,9 $\pm$ 0,499	95,2 $\pm$ 0,441	92,8 $\pm$ 0,981
12	100,3 $\pm$ 0,263	101,5 $\pm$ 0,268	99,3 $\pm$ 0,257	100,5 $\pm$ 0,361	99,1 $\pm$ 0,556
Stabilite $+20^{\circ}\text{C}$ (oda sıcaklığı) (%GK $\pm$ SS)					
1	98,5 $\pm$ 2,937	84,0 $\pm$ 3,010	75,5 $\pm$ 1,961	71,6 $\pm$ 3,484	87,4 $\pm$ 1,824
6	101,5 $\pm$ 0,559	99,1 $\pm$ 0,738	93,3 $\pm$ 0,603	96,9 $\pm$ 0,407	94,3 $\pm$ 0,506
12	98,1 $\pm$ 0,282	98,8 $\pm$ 0,601	97,5 $\pm$ 0,162	98,4 $\pm$ 0,480	96,4 $\pm$ 0,305

SS: standart sapma (n=3), %GK: yüzde geri kazanım

Tablo 4.3: Progesteronun 255 nm de alınan 1.Türev kalite kontrol çözeltilerin stabilitesi

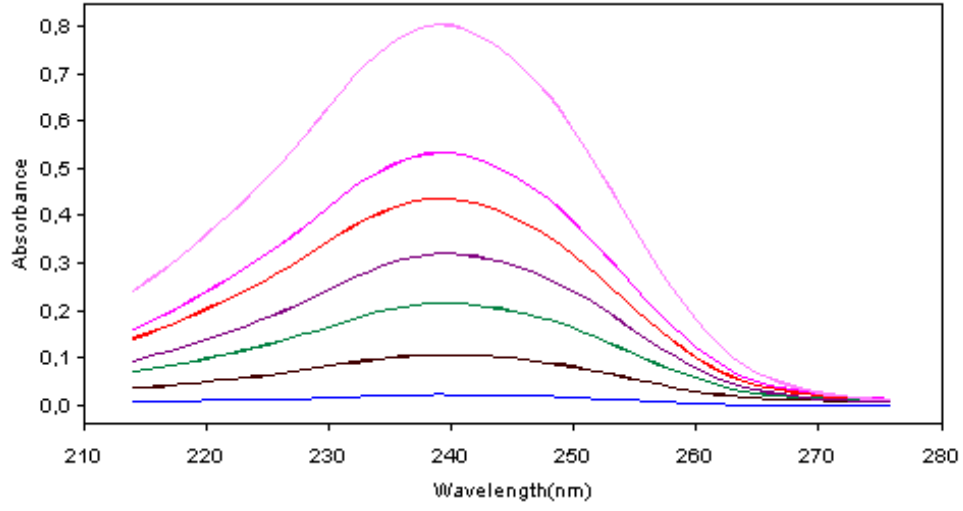
Derişim ($\mu\text{g/mL}$)	24 saat	48 saat	72 saat	96 saat	120 saat
Stabilite -20°C (derin dondurucu) (%GK $\pm$ SS)					
1	113,7 $\pm$ 1,396	111,1 $\pm$ 1,825	98,7 $\pm$ 2,091	117,1 $\pm$ 2,841	115,2 $\pm$ 2,361
6	109,1 $\pm$ 0,619	108,6 $\pm$ 0,442	104,6 $\pm$ 0,393	108,3 $\pm$ 0,611	109,5 $\pm$ 0,690
12	104,1 $\pm$ 0,085	103,8 $\pm$ 0,168	103,8 $\pm$ 0,168	104,5 $\pm$ 0,137	106,4 $\pm$ 0,209
Stabilite $+4^{\circ}\text{C}$ (buzdolabı) (%GK $\pm$ SS)					
1	111,0 $\pm$ 1,723	115,0 $\pm$ 1,521	117,6 $\pm$ 2,139	121,0 $\pm$ 2,708	121,4 $\pm$ 1,36
6	105,7 $\pm$ 0,483	105,5 $\pm$ 0,421	101,3 $\pm$ 0,525	102,4 $\pm$ 0,493	106,0 $\pm$ 0,300
12	105,9 $\pm$ 0,302	105,8 $\pm$ 0,237	102,4 $\pm$ 0,175	105,6 $\pm$ 0,164	107,2 $\pm$ 0,147
Stabilite $+20^{\circ}\text{C}$ (oda sıcaklığı) (%GK $\pm$ SS)					
1	116,4 $\pm$ 1,662	117,5 $\pm$ 2,343	112,7 $\pm$ 2,148	111,3 $\pm$ 2,331	119,9 $\pm$ 2,831
6	107,8 $\pm$ 0,459	106,5 $\pm$ 0,577	106,3 $\pm$ 0,680	105,6 $\pm$ 0,462	103,6 $\pm$ 0,476
12	104,0 $\pm$ 0,179	104,3 $\pm$ 0,307	101,1 $\pm$ 0,192	104,0 $\pm$ 0,296	101,4 $\pm$ 0,275

SS: standart sapma (n=3), %GK: yüzde geri kazanım

4.2. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri Yöntemi

4.2.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Progesteronun 100 $\mu\text{g/mL}$ derişimde stok çözeltisinden belirli hacimler alınıp analitik grade etanol ile seyreltildi ve 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 $\mu\text{g/mL}$ derişimlerinde standart çalışma çözeltileri hazırlanarak 240 nm' de UV-Görünür Bölge absorbansları alındı (Şekil 4.1).

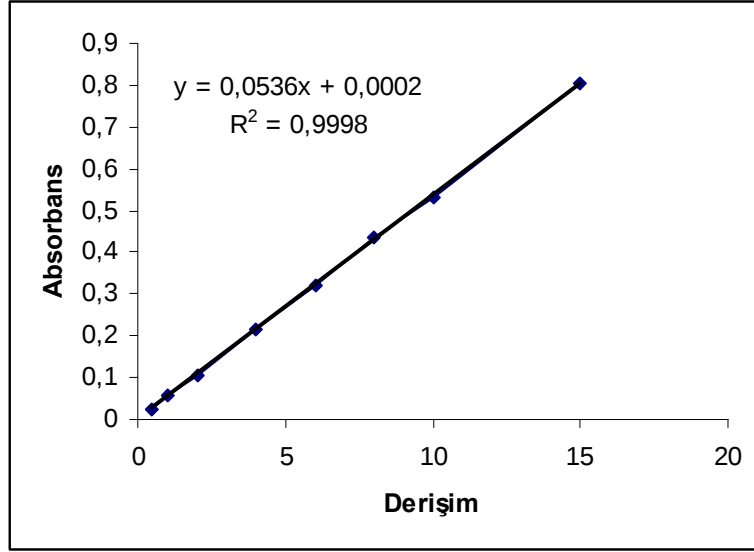


Şekil 4.1: UV-Görünür Bölge spektrofotometrik çalışmasında progesteronun 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 ve 15 µg/mL derişimlerinde standart çalışma çözeltilerinin absorbsiyon spektrumu.

4.2.2. Yöntem Validasyonu

4.2.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi

0,5-15 µg/mL derişim aralığında hazırlanan bir seri progesteron çözeltilerine karşı okunan absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile kalibrasyon eğrisi elde edildi ve Şekil 4.2' de verildi.



Şekil 4.2: UV-Görünür Bölge spektrofotometrik yöntemde 0,5-15 µg/mL derişim aralığında progesteronun kalibrasyon eğrisi

UV-Görünür Bölge spektrofotometrik çalışmada progesteron için elde edilen kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.4’de verildi.

Tablo 4.4: UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yöntemi ile elde edilen standart çözeltilerin kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri

ÇA (µg/mL)	LR ^a	Sa	Sb	R
0,5-15	$A_{240nm}=0,0536x+0,0002$	0,0002	6,32E-5	0,9999

ÇA: çalışma aralığı, ^a:6 kalibasyon eğrisi, 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 Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Progesteronun standart çözeltileri ile elde edilen kalibrasyon eğrisinin en küçük derişiminden daha küçük derişimlere inilerek bir seri standart çözeltileri hazırlandı ve altı kez absorbanları okundu. Okunan değerlerin yüzde bağıl standart sapmaları (%BSS) belirlendi. Yüzde bağıl standart sapma değeri % 20' den küçük olan derişim gözlenebilme sınırı (LOD) olarak belirlendi ve bu değeri 0,4 µg/mL olarak bulundu. Yüzde bağıl standart sapma değeri %10' dan küçük olan derişim de tayin alt sınırı (LOQ) olarak belirlendi ve bu değeri 0,5 µg/mL olarak bulundu.

4.2.2.3. Doğruluk ve Kesinlik

Yöntemin doğruluğu ve kesinliği gün-içi ve günler-arası değişkenlerle belirlendi. Kalibrasyon eğrisi içine düşen üç farklı derişimde hazırlanan progesteron çözeltileri gün-içi (aynı yöntem ve aynı laboratuvar şartlarında 1 günde 6 kez) ve günler-arası (aynı yöntemle 6 farklı günde 6 kez) deneyleri yapıldıktan sonra elde edilen deney sonuçlarının ortalaması, standart sapması, Doğruluk (bağıl hata) ve bağıl standart sapması değerleri Tablo 4.5' de verildi.

Tablo 4.5: Progesteronun standart çözeltilerinin gün-içi, günler-arası doğruluk ve kesinlik değerleri.

λ (nm)	Eklenen ($\mu\text{g/mL}$)	Gün-içi			Günler-arası		
		Bulunan $\pm$ SS ($\mu\text{g/mL}$)	Doğruluk	% BSS	Bulunan $\pm$ SS ($\mu\text{g/mL}$)	Doğruluk	% BSS
240	2,5	2,523 $\pm$ 0,003	0,933	0,102	2,720 $\pm$ 0,154	8,804	5,674
	7,5	7,466 $\pm$ 0,003	-0,452	0,040	7,718 $\pm$ 0,191	2,908	2,471
	12,5	12,799 $\pm$ 0,005	2,388	0,040	13,021 $\pm$ 0,175	4,169	1,342

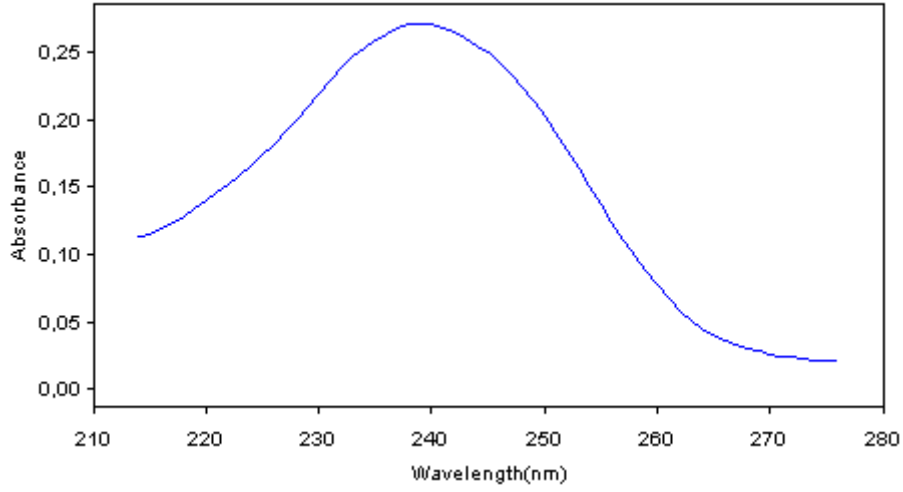
λ : dalga boyu, SS: standart sapma (n=6), doğruluk (%Bağıl hata): (bulunan-eklenen)/eklenen $\times$ 100, % BSS (bağıl standart sapma): (SS/ortalama $\times$ 100)

4.2.2.4. Farmasötik Preparatlarda Progesteronun Geri Kazanımı

UV-Görünür Bölge spektrofotometri yöntemi ile farmasötik preparatlarda progesteronun geri kazanım çalışmaları yapılırken 0,5 $\mu\text{g/mL}$ progesteron ilaç çözeltisine standart ekleme yöntemine göre sırası ile 2,5 -7,5 ve 12,5 $\mu\text{g/mL}$ standart progesteron çözeltisi eklendi ve geri kazanım değerleri sırasıyla % 109,97 $\pm$ 0,161, % 98,39 $\pm$ 0,033, % 99,76 $\pm$ 1,217 olarak belirlendi.

4.2.2.5. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

100 mg progesteron içeren Progesteron yumuşak kapsül içeriği etanolde çözüldü. Hazırlanan çözelti etanol ile seyreltilerek 5 $\mu\text{g/mL}$ derişimde çözelti hazırlandı ve UV-Görünür Bölge spektrumu alındı (Şekil 4.3) ve okunan absorban değerleri kalibrasyon eğrisine konularak miktar analizi gerçekleştirildi (Tablo 4.6).



Şekil 4.3: UV-Görünür Bölge spektrofotometrik çalışmalarda progesteron içeren progestan yumuşak kapsülün 240 nm’ de 5 µg/mL derişimindeki çözeltisinin absorpsiyon spektrumu

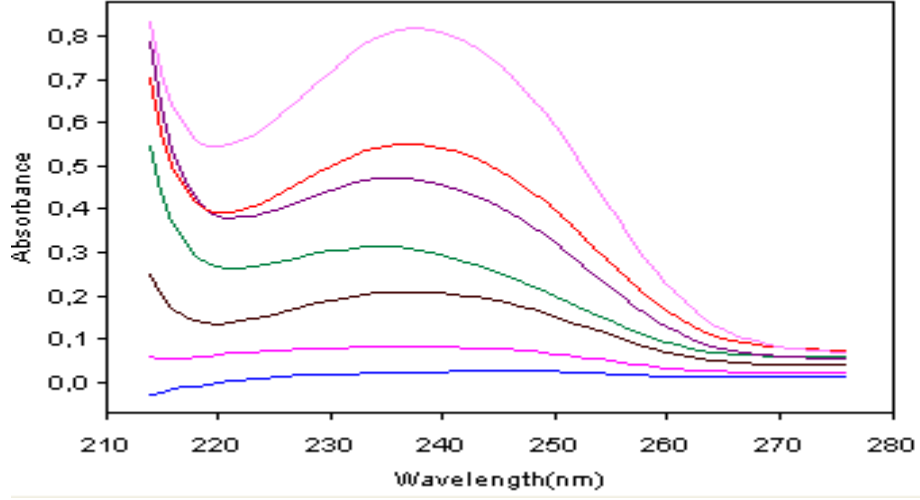
Tablo 4.6: Progesteron içeren (100 mg) progestan yumuşak kapsülün miktar analizi

Ticari Preparat	λ (nm)	n	Bulunan $\pm$ SS (mg)	%Geri kazanım	%BSS	Güven Aralığı
Progestan yumuşak kapsül	240	6	101,1 $\pm$ 0.05	101,1	0,05	101,04-101,19

4.2.3. Plazma Çalışması

4.2.3.1. Plazma Çözeltilerinin Hazırlanması

Atatürk Üniversitesi Yakutiye Araştırma Hastanesi kan merkezinden temin edilen boş plazmanın 0,5 mL’ sine kalibrasyon eğrisini elde edebileceğimiz 1, 2, 4, 6, 8, 10 ve 15 µg/mL derişimlerde hazırlanan progesteron çözeltilerinden uygun miktarlarda eklendi. Bölüm 3.5’ de belirtildiği şekilde ekstraksiyon yapıldı ve her bir çözeltinin absorpsiyon spektrumları alındı ve spektrumlar Şekil 4.4’de verildi.

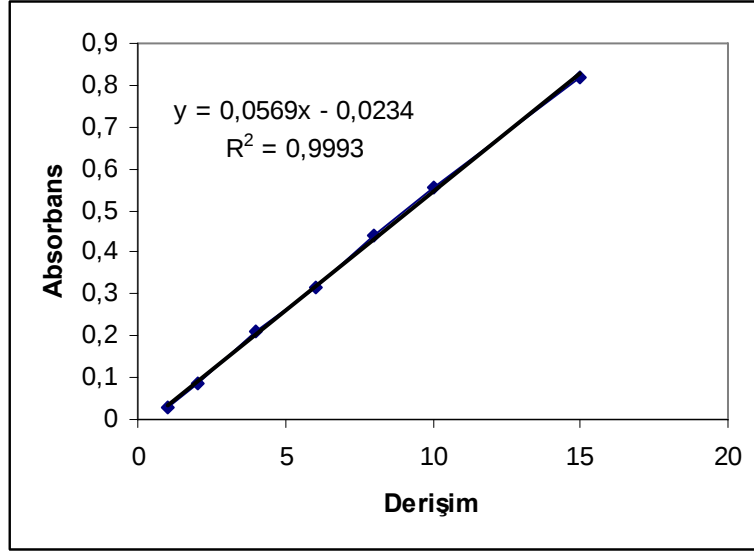


Şekil 4.4: UV-Görünür Bölge spektrofotometrik çalışmalarında progesteronun plazmadan geri kazanımla elde edilen çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları

4.2.4. Yöntem Validasyonu

4.2.4.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi

Progesteronun plazmadan ekstraksiyonu ile elde edilen 1-15 $\mu\text{g/mL}$ derişim aralığında 240 nm de okunan absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edildi ve Şekil 4.5' de verildi.



Şekil 4.5: UV-Görünür Bölge spektrofotometrik yöntemde Progesteronun plazma kalibrasyon eğrisi

UV-Görünür Bölge spektrofotometrik plazma çalışmasında progesteron için elde edilen regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.7' de verildi.

Tablo 4.7: UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yöntemi ile elde edilen plazma çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri

Matrix	ÇA (µg/mL)	LR ^a	Sa	Sb	R
plazma	1-15	$A_{240nm}=0,0569x-0,0234$	0,0013	0,0001	0,9996

ÇA: çalışma aralığı, ^a:6 kalibrasyon eğrisi, LR: lineer regrasyon, Sa: regrasyon eğrisindeki kaymanın standart sapması Sb: regrasyon eğrisindeki eğimin standart sapması, R: korelasyon katsayısı

4.2.4.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Progesteronun plazma çalışma çözeltileri ile elde edilen kalibrasyon eğrisinin en küçük derişiminden daha küçük derişimlere inilerek bir seri standart çözeltileri hazırlandı ve altı kez absorbansları okundu. Okunan değerlerin yüzde bağıl standart sapmaları (%BSS) belirlendi. Yüzde bağıl standart sapma değeri % 20' den küçük olan derişim gözlenebilme sınırı (LOD) olarak belirlendi ve bu değeri 0,5 µg/mL olarak bulundu. Yüzde bağıl standart sapma değeri %10' dan küçük olan derişim de tayin alt sınırı (LOQ) olarak belirlendi ve bu değeri 1 µg/mL olarak bulundu.

4.2.4.3. Doğruluk ve Kesinlik

Plazma çalışmasında, yöntemin doğruluğu ve kesinliği gün-içi ve günler-arası değişkenlerle belirlendi. Gün-içi ve günler-arası değişken sonuçları, kalibrasyon eğrisi içine düşen üç farklı derişimde (2,5, 7,5 ve 12,5 µg/mL) hazırlanan progesteron çözeltileri için bulunan değerlerin ortalaması, doğruluk (bağıl hata), standart sapması ve bağıl standart sapması Tablo 4.8' de verildi.

Tablo 4.8: Progesteronun plazma çözeltilerinin gün-içi, günler-arası doğruluk ve kesinlik değerleri.

λ (nm)	Eklenen (µg/mL)	Gün-içi			Günler-arası		
		Bulunan $\pm$ SS (µg/mL)	Doğruluk	% BSS	Bulunan $\pm$ SS (µg/mL)	Doğruluk	% BSS
240	2,5	2,379 $\pm$ 0,016	-4,827	0,661	2,361 $\pm$ 0,048	-5,546	2,035
	7,5	7,871 $\pm$ 0,016	4,940	0,200	7,864 $\pm$ 0,136	4,858	1,731
	12,5	11,717 $\pm$ 0,072	-6,264	0,617	11,723 $\pm$ 0,200	-6,215	1,704

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

4.2.4.4. Plazmadan Geri Kazanım

Geri kazanım çalışması, belirli derişimlerde progesteronun plazmaya eklenip sonra ekstraksiyonun yapılması sonucunda elde edilen değerler standart progesteron çözeltileriyle elde edilen değerler ile ilişkilendirilerek yüzde geri kazanım değerleri elde edildi ve Tablo 4.9’ da verildi.

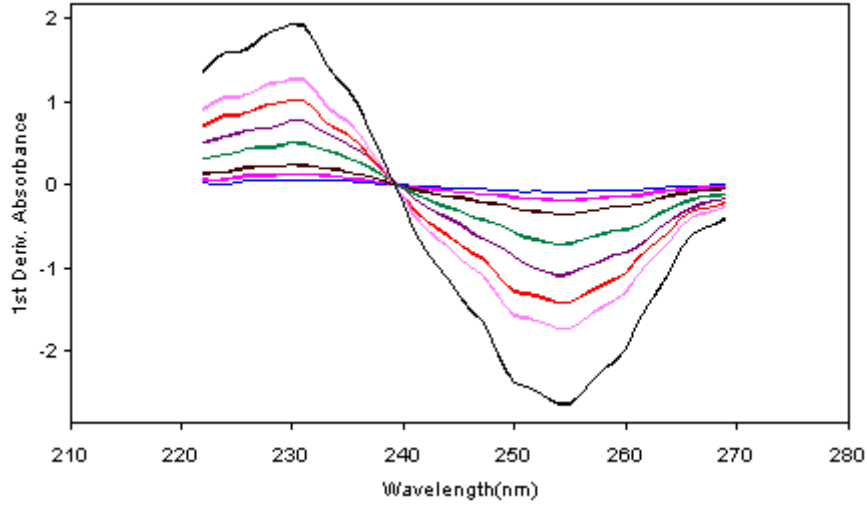
Tablo 4.9: Plazma çalışmasında Progesteron’a ait geri kazanım değerleri (n=6)

Eklenen ($\mu\text{g/mL}$)	Bulunan ($\mu\text{g/mL}$)	Geri Kazanım (%)
2,5	2,379	95,2
7,5	7,871	104,9
12,5	11,717	93,7

4.3. Birinci Derece Türev Spektrofotometri Yöntemi

4.3.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Progesteronun 100 $\mu\text{g/mL}$ derişimindeki stok çözeltisi analitik grade etanolde hazırlandı. Bu stok çözeltiden belirli hacimlerde alınıp analitik grade etanol ile seyreltilerek 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 ve 15 $\mu\text{g/mL}$ derişimlerinde standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Birinci türev spektrumunda maksimum 230 nm’ de, minimum 255 nm’de olmak üzere iki pik gözlemlendi. Birinci türev absorbans spektrumu Şekil 4.6’ da verildi.

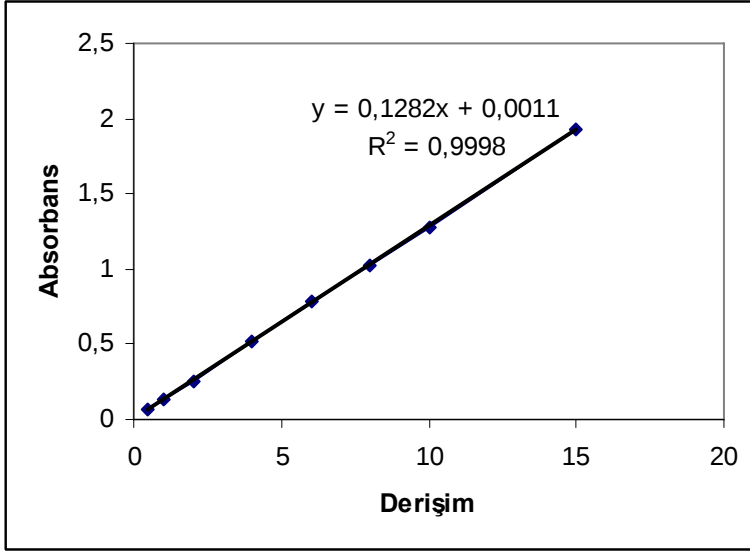


Şekil 4.6: Progesteronun birinci türev spektrofotometrik absorpsiyon spektrumu.

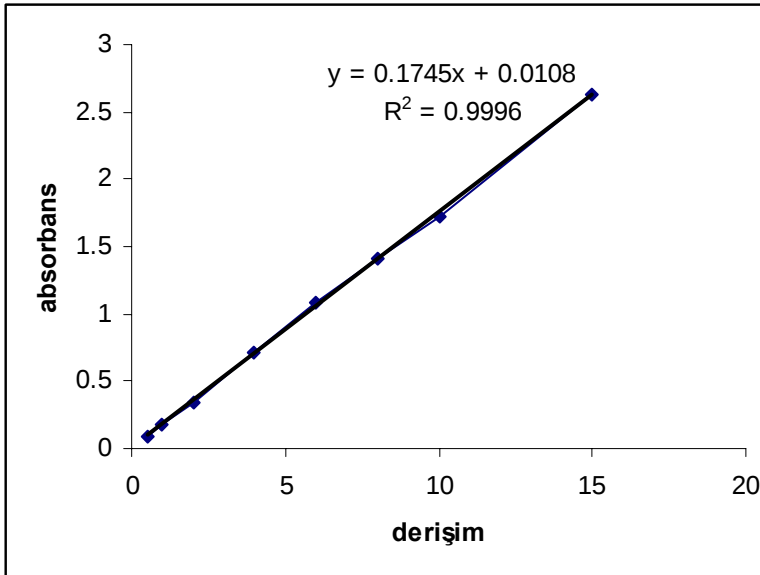
4.3.1.2.Yöntem Validasyonu

4.3.1.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrileri

0,5-15 $\mu\text{g/mL}$ derişim aralığında hazırlanan bir seri progesteron çözeltilerinin derişimine karşılık 230 nm ve 255 nm dalga boylarında okunan absorbans değerlerine karşı grafiğe geçirilmesiyle iki kalibrasyon eğrisi elde edildi. Elde edilen kalibrasyon eğrileri Şekil 4.7 ve 4.8' de verildi.



Şekil 4.7: Birinci türev spektrofotometresi yönteminde 230 nm dalga boyunda elde edilen kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.8: Birinci türev spektrofotometresi yönteminde 255 nm dalga boyunda elde edilen kalibrasyon eğrisi

Birinci türev spektrofotometresi çalışmalarında progesteron için 230 nm maksimum ve 255 nm minimum dalga boylarında kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.10' da verildi.

Tablo 4.10: Progesterona ait 230 ve 255 nm dalga boyundaki kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel bilgileri.

Parametreler	Birinci Türev Spektrofotometre Maksimum Pik Değerleri	Birinci Türev Spektrofotometre Pik Değerleri
Dalga Boyu (λ : nm)	230	255
Doğrusal Aralık ($\mu\text{g/mL}$)	0,5-15	0,5-15
Regrasyon Doğrusu Denklemi	$y=0,1282x+0.0011$	$y=0.1745x+0,0108$
S_a	0,0011	0,0028
S_b	8,37E-05	0,0005
Korelasyon katsayısı (r)	0,9999	0.9998

S_a: Kaymanın standart sapması, **S_b**: Eğimin standart sapması

4.3.1.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Progesteronun standart çözeltileri ile elde edilen kalibrasyon eğrilerinin en küçük derişiminden daha küçük derişimlere inilerek bir seri standart çözeltileri hazırlandı ve altı kez absorbansları okundu. Okunan değerlerin yüzde bağıl standart sapmaları (%BSS) belirlendi. Yüzde bağıl standart sapma değeri % 20' den küçük olan derişim gözlenebilme sınırı (LOD) olarak belirlendi ve bu değer 0,4 $\mu\text{g/mL}$ olarak

bulundu. Yüzde bağıl standart sapma değeri %10' dan küçük olan derişim de tayin alt sınırı (LOQ) olarak belirlendi ve bu değeri 0,5 µg/mL olarak bulundu.

4.3.1.2.3. Doğruluk ve Kesinlik

Yöntemin doğruluğu ve kesinliği gün-içi ve günler-arası değişkenlerle belirlendi. Gün-içi ve günler-arası çalışma sonuçları, kalibrasyon eğrisi içine düşen üç farklı derişimde hazırlanan progesteron çözeltileri için bulunan değerlerin ortalaması, bağıl hatası, standart sapması ve bağıl standart sapması ile verildi. Progesteronun 230 nm maksimum dalga boyu ve 255 nm minimum dalga boyu gün-içi ve günler-arası doğruluk ve kesinlik sonuçları sırasıyla Tablo 4.11 ve 4.12' de verildi.

Tablo 4.11: Birinci türev spektrofotometri çalışmalarında progesteronun 230 nm maksimum dalga boyunda gün-içi, günler-arası doğruluk ve kesinlik değerleri.

λ (nm)	Eklenen (µg/mL)	Gün-içi			Günler-arası		
		Bulunan±SS (µg/mL)	Doğruluk	% BSS	Bulunan±SS (µg/mL)	Doğruluk	% BSS
230	2,5	2,615±0,017	4,581	0,667	2,366±0,276	-5,346	11,655
	7,5	7,397±0,018	-1,373	0,247	7,367±0,216	-1,775	2,927
	12,5	12,642±0,036	1,140	0,283	12,748±0,261	1,981	2,047

λ : dalga boyu, SS: standart sapma (n=6), doğruluk (%Bağıl hata): (bulunan-eklenen)/eklenenx100, % BSS (bağıl standart sapma): (SS/ortalama x100)

Tablo 4.12: Birinci türev spektrofotometri çalışmalarında progesteronun 255 nm minimum dalga boyunda gün-içi, günler-arası doğruluk ve kesinlik değerleri.

λ (nm)	Eklenen ($\mu\text{g/mL}$)	Gün-içi			Günler-arası		
		Bulunan $\pm$ SS ($\mu\text{g/mL}$)	Doğruluk	% BSS	Bulunan $\pm$ SS ($\mu\text{g/mL}$)	Doğruluk	% BSS
255	2,5	2,520 $\pm$ 0,012	0,791	0,470	2,541 $\pm$ 0,074	1,622	2,924
	7,5	7,467 $\pm$ 0,015	-0,443	0,204	7,667 $\pm$ 0,163	2,223	2,120
	12,5	12,702 $\pm$ 0,024	1,615	0,188	13,132 $\pm$ 0,262	5,060	1,996

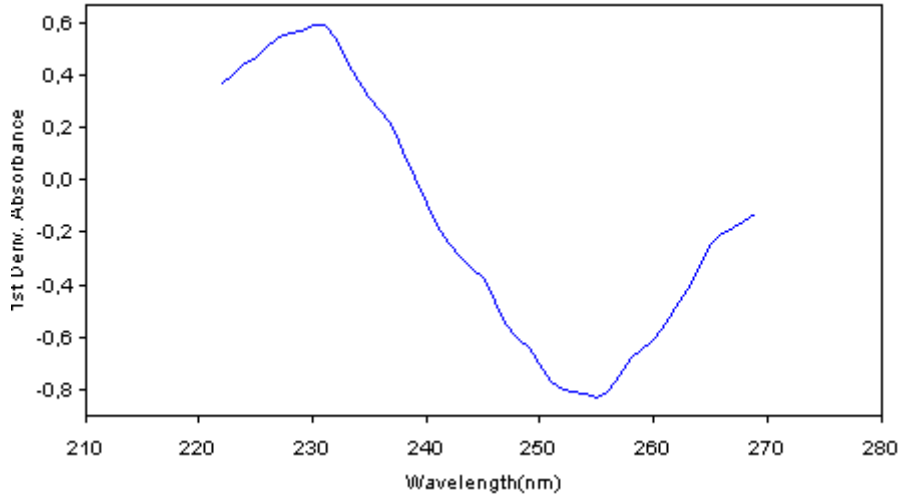
λ : dalga boyu, SS: standart sapma (n=6), doğruluk (%Bağıl hata): (bulunan-eklenen)/eklenen $\times$ 100, % BSS (bağıl standart sapma): (SS/ortalama $\times$ 100)

4.3.1.2.4. Farmasötik Preparatlarda Progesteronun Geri Kazanımı

Birinci türev spektrofotometri yöntemi ile maksimum (230 nm) ve (255 nm) minimum dalga boyunda geri kazanım çalışmaları yapılırken 0,5 $\mu\text{g/mL}$ progestan ilaç çözeltisi standart ekleme yöntemine göre sırası ile 2,5 -7,5 ve 12,5 $\mu\text{g/mL}$ lik standart progesteron çözeltilerinin üzerine ilave edilip % geri kazanım değerleri maksimum dalga boyunda (230 nm) sırasıyla % 95,99 $\pm$ 1,14, % 91,2 $\pm$ 0,28, % 99,82 $\pm$ 1,22, minimum dalga boyunda (255 nm) ise %96,63 $\pm$ 0,74, % 93,58 $\pm$ 0,22, % 95,47 $\pm$ 2,94 olarak belirlendi.

4.3.1.2.5. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

100 mg progesteron içeren Progestan yumuşak kapsül içeriği etanolde çözüldü. Hazırlanan çözelti etanol ile seyreltilerek 5 µg/mL derişimde çözelti hazırlandı ve birinci derece türev spektrumu (Şekil 4.9) ve maksimum ve minimum dalga boylarında okunan absorbans değerleri kalibrasyon eğrisine konularak miktar tayini gerçekleştirildi (Tablo 4.13 ve Tablo 4.14).



Şekil 4.9: Progestan yumuşak kapsül'ün 5 µg/mL derişimindeki çözeltisinin birinci türev spektrofotometrik absorbsiyon spektrumu

Tablo 4.13: 230 nm' deki progesteron içeren (100 mg) progestan yumuşak kapsülün miktar analizi

Ticari Preparat	λ (nm)	n	Bulunan $\pm$ SS (mg)	%Geri kazanım	% BSS	Güven Aralığı
Progestan yumuşak kapsül	230	6	91,66 $\pm$ 0.524	91,66	0,572	91,01-92,54

SS: Standart Sapma, BSS: Bağlı Standart Sapma

Tablo 4.14: 255 nm’ deki progesteron içeren (100 mg) progestan yumuşak kapsülün miktar analizi

Ticari Preparat	λ (nm)	n	Bulunan $\pm$ SS (mg)	%Geri kazanım	% BSS	Güven Aralığı
Progestan yumuşak kapsül	255	6	93,92 $\pm$ 0,336	93,92	0,347	93,4-94,4

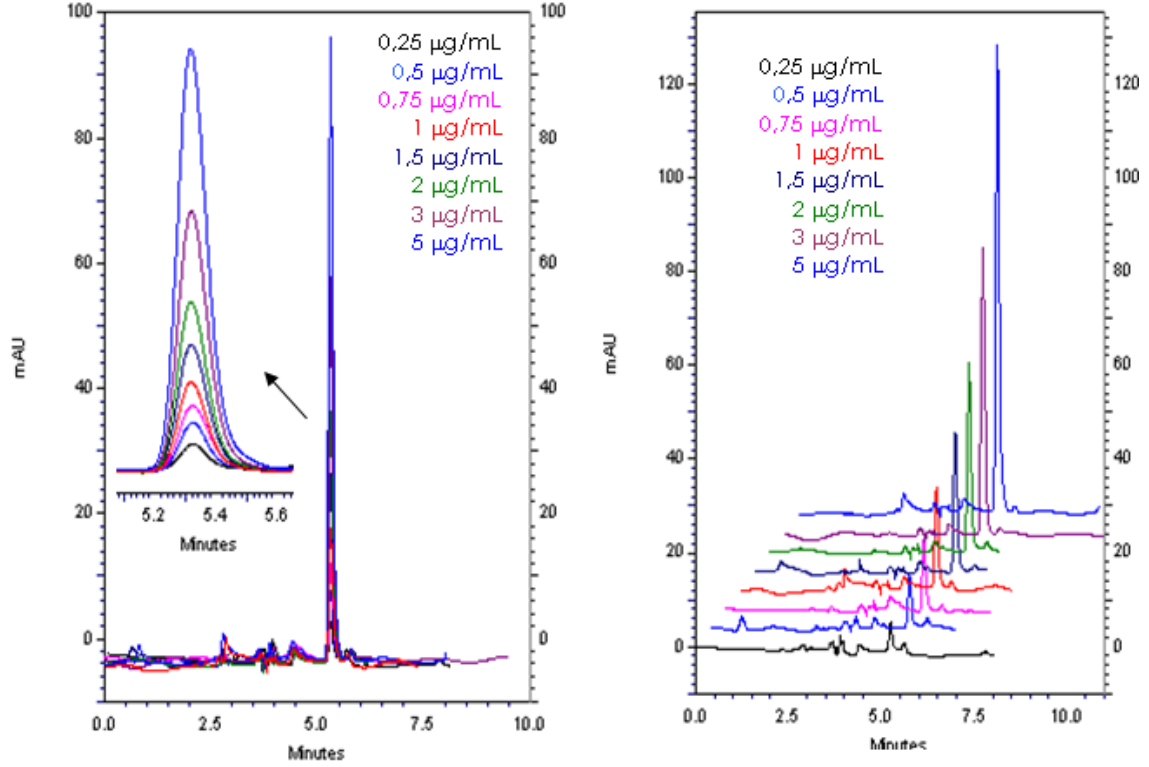
SS: Standart Sapma, BSS: Bağıl Standart Sapma

4.4. Kromatografik Yöntemler

4.4.1.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC-DAD) Yöntemi

4.4.1.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

100 μ g/mL derişimde progesteron stok çözeltisi analitik grade etanolde hazırlandı ve bu çözelti etanol ile seyreltilerek 0,25–5 μ g/mL derişim aralığında standart çalışma çözeltileri hazırlandı ve 240 nm dalga boyunda kromatogramları alındı. Hazırlanan çalışma çözeltilerinin sinyalleri Diyod Array Dedektör (DAD) ile kaydedildi. Elde edilen kromatogramlar Şekil 4.10’ da verildi.

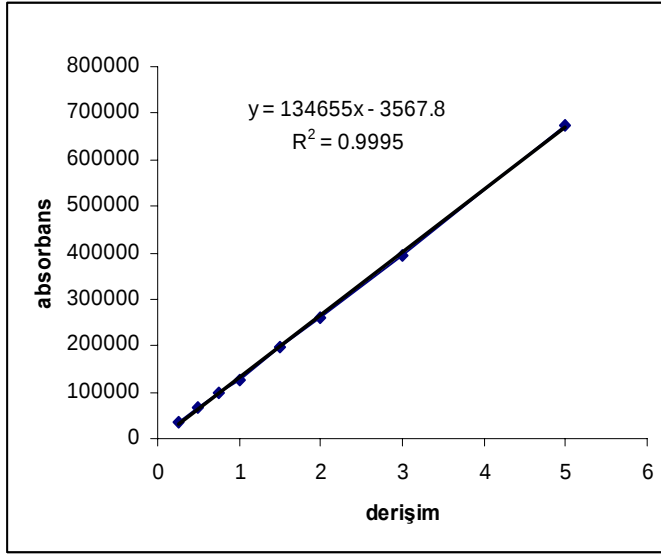


Şekil 4.10: Progesteronun 0,25-5 µg/mL derişim aralığındaki standart çözeltilerinin 240 nm’ deki HPLC-DAD kromatogramları

4.4.1.2. Yöntem Validasyonu

4.4.1.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi

0,25-5 µg/mL derişim aralığında hazırlanan progesteron çözeltilerinin derişime karşı pik alanlarının grafiğe geçirilmesi ile kalibrasyon eğrisi elde edildi ve Şekil 4.11’ de verildi.



Şekil 4.11: HPLC-DAD yöntemi ile elde edilen standart çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi

HPLC-DAD yöntemiyle elde edilen kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz sonuçları sırasıyla Tablo 4.15’ de verildi.

Tablo 4.15: HPLC-DAD yöntemi ile progesteronun standart çalışma çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri.

Etkin Madde	ÇA (µg/mL)	λ(nm)	LR ^a	Sa	Sb	R
Progesteron	0,25-5	240	Y=134655x -3567,8	1720,91	1927,28	0,9997

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

4.4.1.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Progesteronun standart çözeltileri ile elde edilen kalibrasyon eğrisinin en küçük derişiminden daha küçük derişimlere inilerek bir seri standart çözeltileri hazırlandı ve kromatogramlarında sinyal/gürültü (S/G) oranının 3 olduğu derişim gözlenebilme sınırı (LOD) olarak belirlendi ve bu değer 0,08 µg/mL olarak bulundu. Sinyal/gürültü (S/G) oranının 8 olduğu derişim ise tayin alt sınırı (LOQ) olarak belirlendi ve bu değer 0,1 µg/mL olarak bulundu.

4.4.1.2.3. Doğruluk ve Kesinlik

Yöntemin doğruluğu ve kesinliği gün-içi ve günler-arası değişkenlerle belirlendi. Gün-içi ve günler-arası çalışma sonuçları, kalibrasyon eğrisi içine düşen üç farklı derişimde hazırlanan progesteron çözeltileri için bulunan değerlerin ortalaması, bağıl hatası, standart sapması ve bağıl standart sapması ile verildi. Progesteronun 240 nm dalga boyunda gün-içi ve günler-arası doğruluk ve kesinlik sonuçları Tablo 4.16' da verildi.

Tablo 4.16: HPLC-DAD yöntemi ile progesteronun standart çözeltilerinin 240 nm dalga boyunda gün-içi, günler-arası doğruluk ve kesinlik değerleri.

λ(nm)	Eklenen (µg/mL)	Gün-içi			Günler-arası		
		Bulunan±SS (µg/mL)	Doğruluk	% BSS	Bulunan±SS (µg/mL)	Doğruluk	% BSS
240	0,3	0,330±0,004	10,137	1,228	0,332±0,007	10,614	2,020
	1,25	1,264±0,010	1,082	0,820	1,244±0,019	-0,520	1,558
	4	4,131±0,025	3,269	0,596	4,148±0,098	3,694	2,371

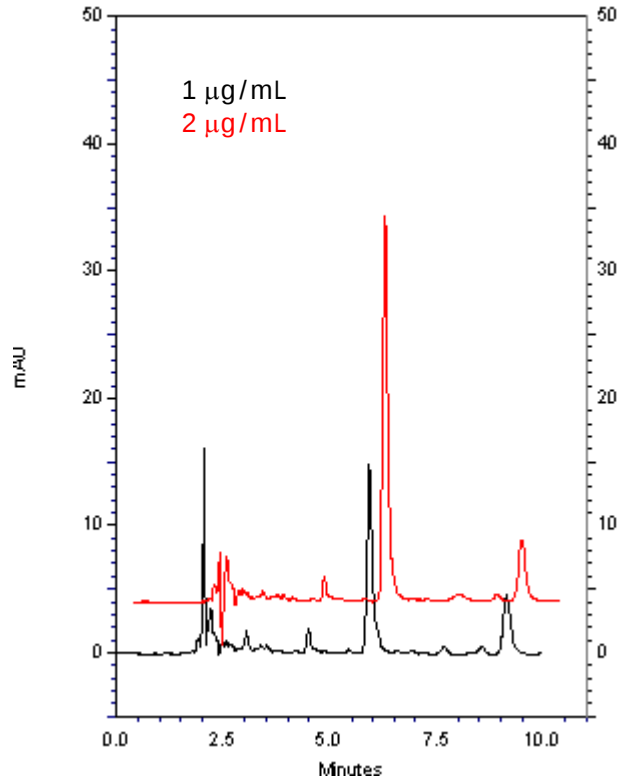
λ: dalga boyu, SS: standart sapma (n=6), doğruluk (%Bağıl hata): (bulunan-eklenen)/eklenenx100, % BSS (bağıl standart sapma): (SS/ortalama x 100)

4.4.1.2.4. Farmasötik Preparatlarda Progesteronun Geri Kazanımı

HPLC-DAD yöntemi ile 240 nm dalga boyunda farmasötik preparatlarda progesteronun geri kazanım çalışmaları yapılırken 1 µg/mL progestan yumuşak kapsül çözeltisi standart ekleme yöntemine göre sırası ile 0,3 -1,25 ve 4 µg/mL' lik standart progesteron çözeltisinin üzerine ilave edilip % geri kazanım değerleri sırasıyla %109,88±3,16, % 98,39±1,56, % 96,80±0,30 olarak bulundu.

4.4.1.2.5. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

100 mg progesteron içeren Progestan yumuşak kapsül içeriği etanolde çözüldü. Hazırlanan bu çözelti etanol ile seyreltilerek 1 ve 2 µg/mL derişiminde çözeltiler hazırlanıp bu çözeltilerin kromatogramları alındı (Şekil 4.12) ve pik alanları kalibrasyon eğrisine konularak miktar tayini gerçekleştirildi (Tablo 4.17)



Şekil 4.12: HPLC-DAD çalışmasında progestan yumuşak kapsül' ün 1 ve 2 µg/mL derişimindeki çözeltisinin kromatogramları.

Tablo 4.17: HPLC-DAD yöntemi ile progesteron içeren (100 mg) progestan yumuşak kapsülün miktar analizi

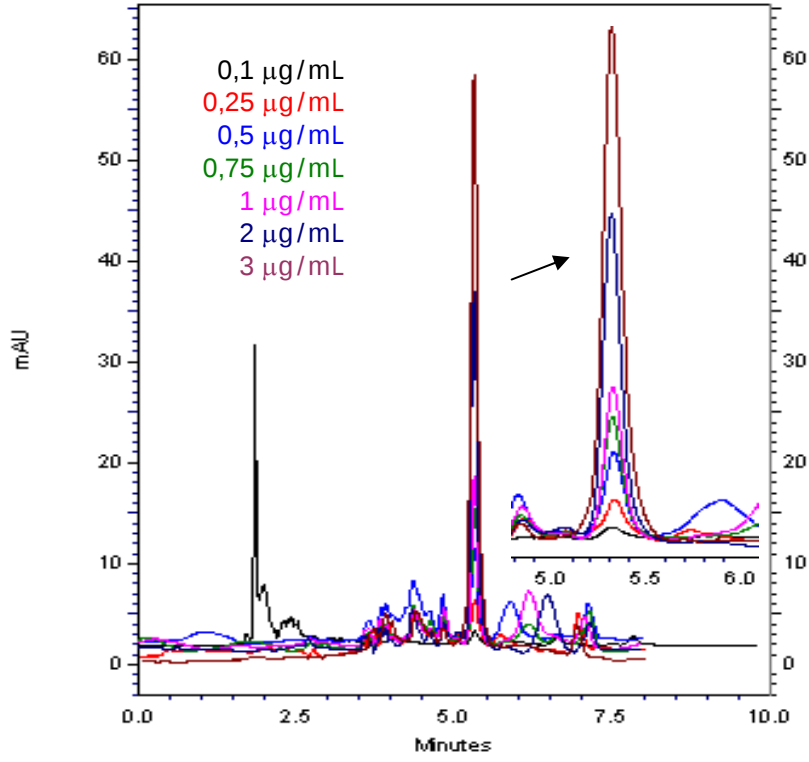
Ticari Preparat	λ (nm)	n	Bulunan $\pm$ SS (mg)	%Geri kazanım	% BSS	Güven Aralığı
Progestan yumuşak kapsül	240	6	98,86 $\pm$ 2,61	98,86	2,647	96,2-102,6

SS: Standart Sapma, BSS: Bağıl Standart Sapma

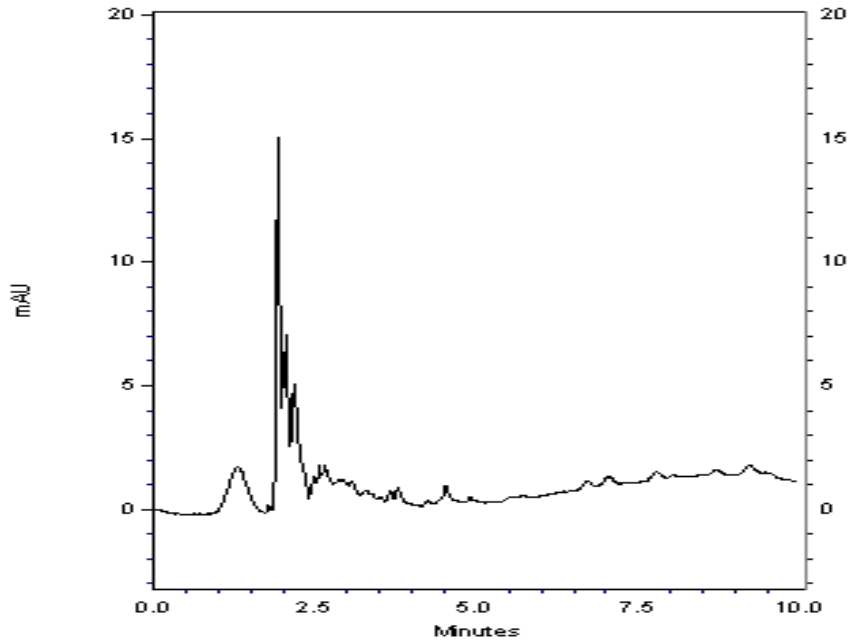
4.5. HPLC-DAD Plazma Çalışması

4.5.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Plazma çalışmasında, standart progesteron çözeltileri plazmaya eklenip Bölüm 3.5’de verilen ekstraksiyon prosesi ile ekstraksiyonu yapılarak 0,1–3 μ g/mL derişim aralığında plazma çözeltileri hazırlanıp 240 nm dalga boyunda kromatogramları alındı ve Şekil 4.13’ de verildi. Plazma çalışmasında boş plazmanın kromatogramı Şekil 4.14’ de verildi.



Şekil 4.13: Progesteronun 0,1-3 $\mu\text{g/mL}$ derişim aralığındaki plazma çözeltilerinin 240 nm’ deki HPLC-DAD kromatogramları

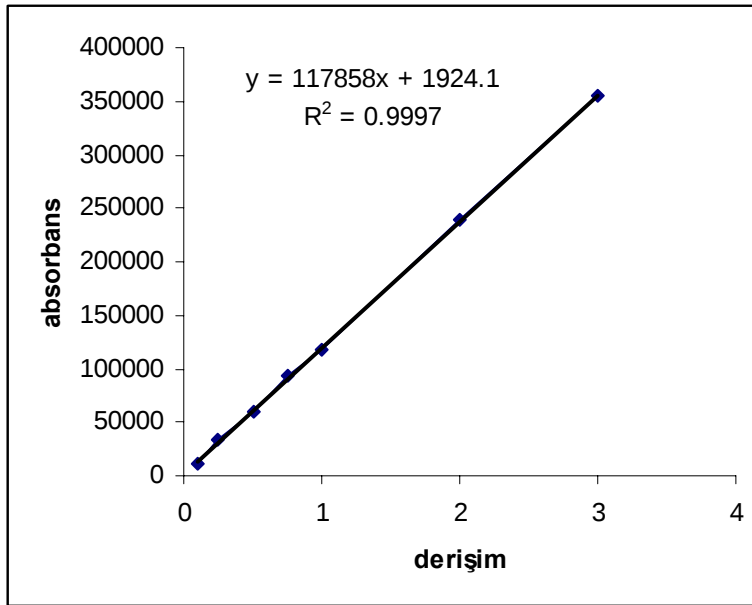


Şekil 4.14: Progesteronun 240 nm deki boş plazmanın HPLC-DAD kromatogramı

4.5.2. Yöntem Validasyonu

4.5.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi

0,1-3 µg/mL derişim aralığında hazırlanan progesteron çözeltilerinin derişime karşı pik alanlarının grafiğe geçirilmesi ile kalibrasyon eğrisi elde edildi ve Şekil 4.15’ de verildi. HPLC-DAD yöntemiyle elde edilen kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz sonuçları ise Tablo 4.18’ de verildi.



Şekil 4.15: HPLC-DAD yöntemi ile elde edilen plazma çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi

Tablo 4.18: HPLC-DAD yöntemi ile progesteronun plazma çalışma çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri.

Etkin Madde	ÇA (µg/mL)	λ(nm)	LR ^a	Sa	Sb	R
Progesteron	0,1-3	240	Y=117858x + 1924,1	1114,31	3176,03	0,9998

λ: dalga boyu, ^a: 6 kalibrasyon eğrisi, 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 Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Progesteronun plazma çalışma çözeltileri ile elde edilen kalibrasyon eğrisinin en küçük derişiminden daha küçük derişimlere inilerek bir seri plazma çalışma çözeltileri hazırlandı ve kromatogramlarında sinyal/gürültü (S/G) oranının 3 olduğu derişim gözlenebilme sınırı (LOD) olarak belirlendi ve bu değer 0,08 µg/mL olarak bulundu. Sinyal/gürültü (S/G) oranının 8 olduğu derişim ise tayin alt sınırı (LOQ) olarak belirlendi ve bu değer 0,1 µg/mL olarak bulundu.

4.5.2.3. Doğruluk ve Kesinlik

Yöntemin doğruluğu ve kesinliği gün-içi ve günler-arası değişkenlerle belirlendi. Gün-içi ve günler-arası çalışma sonuçları, kalibrasyon eğrisi içine düşen üç farklı derişimde hazırlanan progesteron çözeltileri için bulunan değerlerin ortalaması, bağıl hatası, standart sapması ve bağıl standart sapması ile verildi. Progesteronun 240 nm dalga boyunda gün-içi ve günler-arası doğruluk ve kesinlik sonuçları Tablo 4.19' da verildi.

Tablo 4.19: HPLC-DAD yöntemi ile progesteronun plazma çalışma çözeltilerinin 240 nm dalga boyunda gün-içi, günler-arası doğruluk ve kesinlik değerleri.

λ (nm)	Eklenen (µg/mL)	Gün-içi			Günler-arası		
		Bulunan±SS (µg/mL)	Doğruluk	% BSS	Bulunan±SS (µg/mL)	Doğruluk	% BSS
240	0,3	0,333±0,010	10,836	2,986	0,333±0,026	11,081	7,702
	1,25	1,279±0,043	2,326	3,347	1,352±0,048	8,153	3,541
	2	2,007±0,042	0,355	2,075	1,993±0,112	-0,352	5,595

λ : dalga boyu, SS: standart sapma (n=6), doğruluk (%Bağıl hata): (bulunan-eklenen)/eklenenx100, % BSS (bağıl standart sapma): (SS/ortalama)x100

4.5.2.4. Geri Kazanım

Plazmadan geri kazanım çalışmasında, progesteronun üç farklı derişimdeki kalite kontrol çözeltileri plazmaya eklendi, karıştırıldı ve Bölüm 3.5’ de verilen ekstraksiyon yöntemleriyle ekstraksiyonları yapıldı. Ekstraksiyon sonrasında elde edilen çözeltilerin gün-içi ve günler-arası yapılan analizlerinde belirlenen pik alanları, standart çözeltilerden elde edilen pik alanları değerleri ile kıyaslanarak sonuçlar plazmadan yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.20’ de verildi.

Tablo 4.20: HPLC-DAD yöntemiyle 240 nm dalga boyunda elde edilen günüçi ve günler arası plazmadan geri kazanım değerleri

Eklenen (µg/mL)	Günüçi		Günler Arası	
	%Geri kazanım	% BSS	% Geri Kazanım	% BSS
0,3	100,49	3,704	100,26	7,928
1,25	91,65	2,708	98,44	4,299
2	94,22	1,591	91,08	7,722

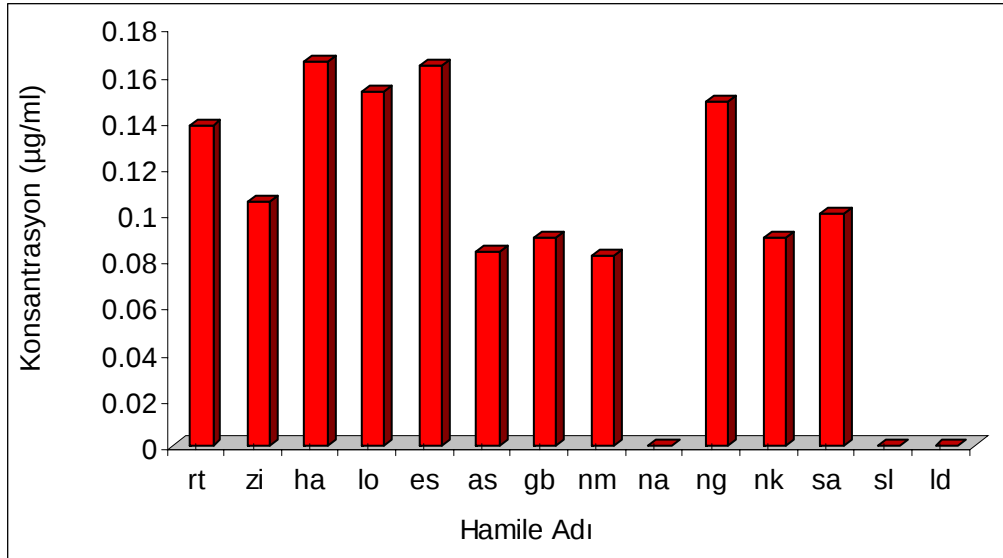
4.6. Geliştirilen Yöntemlerin Gerçek Numunelere Uygulanması

Geliştirilmiş ve geçerlilik testleri yapılmış HPLC-DAD yöntemi, hamile insan plazmasında progesteron seviyesini belirlemek için kullanıldı. Hamile insan kanları Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği’nden sağlandı. Özellikleri Tablo 4.21’de verilen hamilelerden alınan kan numuneleri 4000 rpm de 8 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen plazmadan 0,5 mL alınarak Bölüm 3.5’ de verilen ekstraksiyon prosesi uygulanarak progesteron ekstrakte edildikten sonra HPLC-DAD yöntemi ile miktar tayini yapıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.16’ da, hamileliğin 36. haftasında bulunan N.G. adlı hamileye ait örnek kromatogram Şekil 4.17’ de verildi.

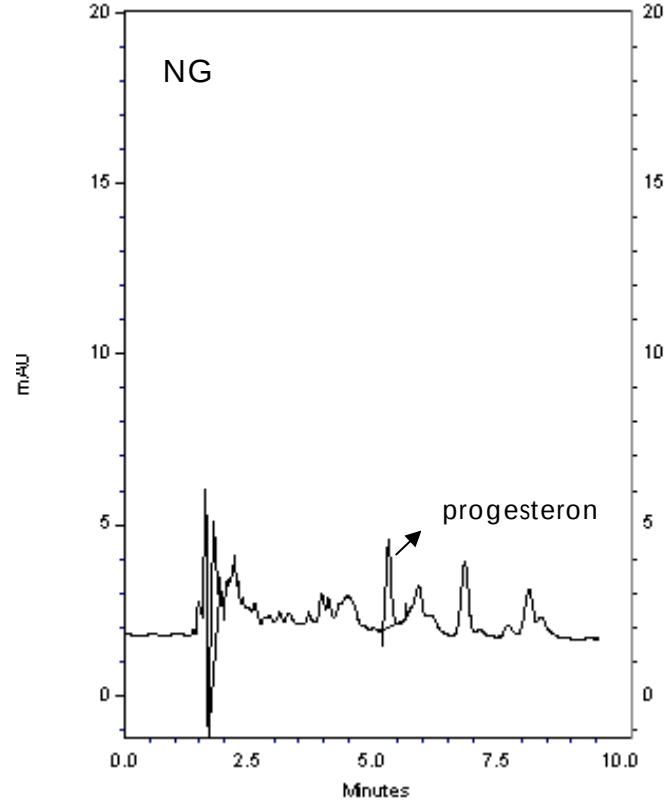
Tablo 4.21: Plazma progesteron miktarları ölçülen hamilelerin özellikleri

Hasta Adı	Yaşı	Hamilelik Haftası	Kan Basıncı (mmHg)	Kilosu (kg)	Kaçıncı Hamileliği	Plazma progesteron miktarı ($\mu\text{g/mL}$)
R.T.	29	36	90/50	66	4	0,138
Z.İ.	32	36	110/70	66	2	0,105
H.A.	45	38	100/50	101	7	0,165
L.Ö.	20	36	130/80	93	1	0,152
E.Ş.	22	38	100/60	63	1	0,164
A.S.	24	32	110/70	65	1	0,083
G.B.	32	37	110/70	69	4	0,089
N.M.	26	41	160/60	77	3	0,082
N.A.	27	33	100/60	75	1	nd
N.G.	35	36	130/90	112	2	0,148
N.K.	31	39	180/100	115	5	0,090
S.A.	27	30	80/50	68	4	0,099
S.L.	23	30	100/60	65	5	nd
L.D.	28	35	90/60	79	3	nd

nd: tayin edilemedi



Şekil: 4.16: HPLC-DAD sistemi ile 30-41. Haftalar arası ölçülen hamile insan plazma progesteron derişimleri.



Şekil 4.17: 36.haftadaki N.G. adlı hamileye ait kromatogram.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

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 geliştiriciler 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 validasyonunun yapılması ve seçilen yöntemin bir değer ifade edebilmesi için de, yöntemin doğruluk, kesinlik, tekrarlanabilirlik, seçicilik, spesifiklik, hassaslık ve analiz süresinin kısa olması gibi validasyon 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 progesteronun farmasötik preparatlarda ve biyolojik sıvılarda miktar analizine yönelik çalışmalara rastlanmış olup, literatür çalışmaları ışığı altında steroid bir hormon olan Progesteronun hem farmasötik preparatlarda hem de plazmada miktar analizi için UV-Görünür Bölge Spektrofotometri, Birinci-Türev Spektrofotometri ve HPLC-DAD yöntemleri geliştirilip validasyonları yapıldı.

Çalışmada kullanılan Progesteron standart etken maddesi Riedel De Hean den, farmasötik preparat olarak kullanılan ve 100 mg Progesteron içeren Progestan yumuşak kapsül (Koçak) ise piyasa eczanelerinden sağlandı. Ultraviyole-Görünür Bölge Spektrofotometresi, yüksek duyarlık, orta ve yüksek seçimlilik, yüksek doğruluk, kesinlik, kolaylık ve rahatlık bakımından ilaç endüstrisinde farmasötik preparatlarda ilaç etken maddelerinin miktar analizinde tercih edilen tekniklerden biri olarak söylenebilir. Bu teknikte, UV-Görünür Bölge spektrumu, madde üzerine gönderilen ışığın dalga boylarına karşı absorbands değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile elde edilir. Yani $A = f(\lambda)$ fonksiyonudur. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri çalışmasında, Progesteronun 240 nm de maksimum absorbands verdiği tespit edildikten sonra çalışmanın optimum koşulları belirlendi. Yöntemin doğrusal olduğu 0,5-15 µg/mL derişim aralığında bir seri standart (0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 ve 15 µg/mL) Progesteron çözeltisinin derişimine karşı okunan absorbands değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edildi. Kalibrasyon eğrisinin regrasyon analizinden, regrasyon doğrusunun denklemi $A_{240nm} = 0,0536x + 0,0002$ (A: Absorbans, x: derişim) ve korelasyon katsayısı (r) 0,9999, gözlenebilme sınırı (LOD) değeri 0,4 µg/mL ve tayin alt sınırı (LOQ) değeri 0,5 µg/mL olarak belirlendi. Gün-içi ve günler-arası bağıl standart sapması (BSS), % 5,67'den küçük olduğu tespit edildi. Yöntem aynı zamanda Progestan yumuşak

kapsül'deki progesteron analizi için başarıyla uygulandı ve farmasötik preparattan yöntemin geri kazanım değeri % 101,1 olarak belirlendi.

UV-Görünür Bölge Spektrofotometri plazma çalışmasında, 1-15 µg/mL derişim aralığında hazırlanan bir seri progesteron çözeltisinden uygun miktarlarda 0,5 mL plazma üzerine eklenip (spike edilip) karıştırıldı ve bölüm 3.5. de belirtildiği şekilde sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi uygulandı. Ekstraksiyon işlemi sonucunda elde edilen çözeltilerin UV-Görünür Bölge Spektrofotometre spektrumları alındı. Her bir çözeltinin derişimine karşı absorbansı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edildi. Kalibrasyon eğrisinin regresyon analizinden, regresyon doğrusunun denklemi $A_{240nm}=0,0569x-0,0234$ ve korelasyon katsayısı (r) 0,9996, gözlenebilme sınırı (LOD) değeri 0,5 µg/mL ve tayin alt sınırı (LOQ) değeri 1 µg/mL olarak belirlendi. Gün-içi ve günler-arası kesinlik değerlerinin bağıl standart sapması (BSS), % 2,03'den küçük olduğu ve plazmadan progesteronun ortalama geri kazanımı değerini % 97,6 olarak tespit edildi.

Türev spektrofotometresi, türev spektrumlarının kullanılması esasına dayalı bir analiz yöntemidir. UV-Görünür Bölge çalışmalarından çok daha geniş bir uygulama alanı bulmuştur. Bunun nedeni UV-Görünür Bölge spektrumlarında üst üste binen, çakışan bantlar daha çok görünür ve ayırım gücü zayıftır. Türev uygulamaları bu sorunlara belli oranlarda çözüm getirmiş ve karakteristik pikleri az olan ve çözülmemiş bantları içeren spektrumların ayırım gücünü artırmıştır. Birinci Türev Spektrofotometresi çalışmalarında, optimum koşullar belirlendikten sonra standart progesteronun 230 nm' de bir maksimum, 255 nm' de bir minimum olmak üzere iki pik verdiği tespit edildi. 0,5-15 µg/mL derişim aralığında yöntemin doğrusal olduğu belirlendikten sonra, bu derişim aralığında bir seri standart (0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 ve 15

$\mu\text{g/mL}$) progesteron çözeltisi derişimine karşı okunan minimum ve maksimum absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edildi. Kalibrasyon eğrilerinin yapılan regrasyon analizinden, 230 nm maksimum dalga boyu için regrasyon doğrusunun denklemi $y=0,1282x+0,0011$ ve korelasyon katsayısı (r) 0,9999, 255 nm minimum dalga boyu için yapılan regrasyon analizinden, regrasyon doğrusunun denklemi $y=0,1745x+0,0108$ ve korelasyon katsayısı (r) 0,9998 olarak belirlendi. Birinci-Türev spektrofotometri yöntemi için gözlenebilme sınırı (LOD) değeri 0,4 $\mu\text{g/mL}$ ve tayin alt sınırı (LOQ) değeri 0,5 $\mu\text{g/mL}$ olarak tespit edildi. Gün-içi ve günler-arası kesinlik değerlerinin bağıl standart sapması (BSS), 230 nm maksimum dalga boyu için % 11,65' den küçük, 255 nm minimum dalga boyu için de % 2,92'den küçük olduğu belirlendi. Yöntem aynı zamanda Progestan yumuşak kapsül'e progesteron analizi için başarıyla uygulandı. Geri kazanım değerleri 230 nm maksimum dalga boyu için ortalama % 95,6 olarak, 255 nm minimum dalga boyu için % 95,2 olarak bulundu. UV-Görünür Bölge ve Birinci-Türev Spektrofotometri yöntemlerine ait fazla literatür bilgisine rastlanmamıştır. Pucci ve ark³⁴. çalışmalarında LOQ değerini 2-propanol ile hazırlanan çözeltilerden 2 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulurken, bu çalışmada etanol ile hazırlanan çözeltilerden LOQ değerini 0,5 $\mu\text{g/mL}$ olarak daha düşük derişimde bulduk.

Stabilite çalışması, -20 °C, +4 °C ve +20 °C ortamlarında kalite kontrol çözeltileri ile yapıldı ve FDA rehberinde belirtilen kurallara göre (ortalamanın $\pm$ %10), analitlerin stabilite şartları belirlendi ve yapılan çalışmaların sonuçları Tablo 4.1, 4.2 ve 4.3 de verildi. Elde edilen değerler ışığında düşük derişimde (1 $\mu\text{g/mL}$) progesteron standart çözeltilerinin 24 saat sonra belirtilen 3 ortamda da stabilitesinin bozulduğu, orta ve yüksek derişimlerde (6 ve 12 $\mu\text{g/mL}$) ise 120 saat boyunca FDA değerlerine uygun

olarak stabil kaldığı gözlenmiştir. Buradan elde edilen sonuç progesteron standart çözeltilerini saklarken yüksek derişimlerde olmasına dikkat edilmesidir.

Kromatografi, karmaşık karışımlardaki kimyasal bileşimlerin ayrılması, tanınması ve tayininde çok yaygın olarak kullanılan bir yöntemler topluluğudur. Bu yöntemler topluluğundan Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) doğruluk, kesinlik, tekrarlanabilirlik, seçicilik, duyarlılık ve sonuçların hızlı elde edilmesi gibi diğer yöntemlere göre birçok üstün yanlara sahiptir. Ayrıca, HPLC ile nanogram seviyesinde bile miktaranalizi 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 oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. HPLC çalışmalarında, sabit fazın özellikleri ve hareketli fazın bileşimi, ayrılan maddenin kromatografik davranışına etki etmektedir. Bundan dolayı ayırımın iyileştirilmesi ve kabul edilebilir sonuçların alınabilmesi için kromatografik koşulların optimizasyonuna gerek duyulmaktadır.

Progesteronun belirlenmesi için geliştirilen HPLC-DAD yönteminde kromatografik ayırım ters faz C-18 (5 µm, 150 mm x 4,6 mm) kolon, hareketli faz olarak asetonitril-su (70-30) kullanılarak, akış hızı 1 mL/dak, dalga boyu 240 nm ve enjeksiyon hacmi 10 µL olarak çalışma parametreleri belirlendi. Optimum koşullar belirlendikten sonra standart progesteronun 240 nm de absorbans verdiği tespit edildi. Standart çözeltilerin 0,25-5 µg/mL derişim aralığında yöntemin doğrusal olduğu belirlendi. Bu derişim aralığında bir seri standart (0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 3 ve 5 µg/mL) progesteron çözeltileri hazırlanarak HPLC' de kromatogramları alındı ve her bir çözeltinin derişimine karşı HPLC den elde edilen piklerin alanı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edildi ve regrasyon doğrusunun denklemi $y=134655 \times -3567,8$

(y: pik alanı, x: derişim), korelasyon katsayısı (r) ise 0,9997 olarak belirlendi. Gözlenebilme sınırı (LOD) 0,08 µg/mL, tayin alt sınırı (LOQ) ise 0,1 µg/mL olarak tespit edildi. Gün-içi ve günler-arası kesinlik değerlerinin bağıl standart sapması (BSS) % 2,37 den küçük olduğu tespit edildi. Farmasötik preparatlarda progesteronun geri kazanım çalışmaları yapılırken 1 µg/mL Progestan yumuşak kapsül çözeltisi standart ekleme yöntemine göre sırası ile 0,3, 1,25 ve 4 µg/mL' lik standart progesteron çözeltisinin üzerine ilave edilip % geri kazanım değerleri sırasıyla %109,88±3,16, % 98,39±1,56, % 96,80±0,30 olarak ve yöntemin farmasötik preparatta (Progestan yumuşak kapsül) miktar tayini çalışmasında ise geri kazanım değeri % 98,86 olarak belirlendi.

HPLC-DAD yönteminin plazma çalışmasında 0,5 mL plazma numunesinden yola çıkarak Bölüm 3.5'de açıklanan ekstraksiyon prosesi yapıldı ve 0,1- 3 µg/mL derişim aralığında yöntemin doğrusal olduğu belirlendi. Derişimine karşı kromatogramlardan elde edilen piklerin alanı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edildi ve regrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayısı (r) sırasıyla $y=117858x + 1924,1$ ve 0,9998 olarak belirlendi. Gözlenebilme sınırı (LOD) 0,08 µg/mL, tayin alt sınırı (LOQ) ise 0,1 µg/mL olarak tespit edildi. Gün-içi ve günler-arası kesinlik değerlerinin bağıl standart sapması (BSS) % 7,7 den küçük olduğu, progesteronun plazmadan geri kazanım değerinin ise % 91,08- % 100,49 arasında olduğu belirlendi. Yöntem 30-41. haftalar arasındaki hamile plazmalarına uygulandı, Murphy ve ark.³¹ çalışmalarında belirttiği gibi 36-38. haftalar arasında plazma progesteron derişiminin yüksek sevide olduğu belirlendi. HPLC-DAD yöntemi eter-hekzan karışımı ile yapılan tek sıvı-sıvı ekstraksiyon prosesine ve 5,24 dakika gibi çok kısa alıkonma (retensiyon) zamanına sahip bir yöntemdir. Bulunan bu alıkonma zamanı taranan literatürlere göre geliştirilen HPLC-DAD yöntemleri^{17-24,29-31,34-36} arasında

progesteronun tayininde en kısa olanıdır. Ayrıca 120 saate kadar farklı üç ortamda UV-Görünür Bölge Spektrofotometri ve Türev Spektrofotometri yöntemleri ile yapılan stabilite çalışması taranan literatürlere göre bir ildir.

Bu çalışmamızda özellikle hamilelik için son derece büyük bir öneme sahip olan ayrıca prostat, endometrial ve meme kanseri üzerine antitümöral yararı raporlanmış⁶⁻⁹, beyin hasarı sonrası progesteron tedavisinde TNF-alfa, IL-1beta, mRNA ve proteinlerini düşürdüğü kanıtlanmış^{10,11}, uzun zaman periyotların da üremeye yardımcı olarak kullanılan¹² progesteron hormonunu, insan plazmasından ve farmasötik preparatlardan analizi için UV-Görünür Bölge Spektrofotometri, Türev Spektrofotometri ve HPLC-DAD yöntemleri geliştirilmiştir. Farklı, kullanılabilir validasyonunu yaparak, çalışma sonucunda yöntemlerin hızlı, basit ve kullanılabilir, farmasötik preparatların kalite kontrol ve klinik çalışmalarında uygulanabilir olduğu gösterilmiştir.

6. KAYNAKLAR

1. Akgün H, Balkan A, Bilgin A, Çalış Ü, Dalkara S, Erdoğan H, Erol D, Ertan M, Özkanlı F, Palaska E, Saraç E, Şafak C. Farmasötik Kimya 1. cilt, Ankara: Irmak Matbaası, 2000: 607-609, 674-676.
2. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji 2.Cilt Sekizinci Baskı, Ankara: Hacettepe Taş, 1998: 1224, 1393, 1396.
3. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji 3.Cilt Yedinci Baskı Ankara: Hacettepe Taş, 1997: 2331, 2430.
4. Burtis CA, Ashwood ER, Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd Edition, W. B. Saunders, Philadelphia, 1994.
5. Guo T, Taylor R, Singh R, Soldin S. Simultaneous determination of 12 steroids by isotope dilution liquid chromatography-photospray ionization tandem mass spectrometry. Clin Chim Acta 2006; 372: 76-82
6. Podczaski E, Mortel R. Hormonal treatment of endometrial cancer past, present and future. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2001; 15; 469-489.
7. Moyad MA. Complementary/alternative therapies for reducing hot flashes in prostate cancer patients: reevaluating the existing indirect data from studies of breast cancer and postmenopausal women. Urology 2002; 59: 20-33.
8. Dai D, Wolf DM, Litman ES, White MJ, Leslie KK. Progesterone inhibits human endometrial cancer cell growth and invasiveness: down-regulation of cellular adhesion molecules through progesterone B receptors. Cancer Res 2002; 62: 881-886.
9. Horita K, İnase N, Mitake S, Formby B, Toyoda H, Yoshizawa Y. Progesterone induces apoptosis in malignant mesothelioma cells. Anticancer Res 2001; 21: 3871-3874.

10. Xiao G, Wei J, Yan W, Wang W, Lu Z. Improved outcomes from the administration of progesterone for patients with acute severe traumatic brain injury: a randomized controlled trial. *Critical Care* 2008; 12: 2; R61.
11. Pettus E, Wright D, Stein D, Hoffman S. Progesterone Treatment Inhibits The Inflammatory Agents That Accompany Traumatic Brain Injury. *Brain Res* 2005; 1049: 112-119.
12. Levy T, Yairi Y, Bar, Shalev J, Orvito R, Ben-Rafael Z. Pharmacokinetics of the progesterone-containing vaginal tablet and its use in assisted reproduction. *Steroids* 2000; 65: 645-649.
13. Ma YC, Kim H. Determination of steroids by liquid chromatography/mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 1997; 8: 1010-1020.
14. Díaz-Cruz MS, López de Alda MJ, López R, Barceló D. Determination of estrogens and progestogens by mass spectrometric techniques (GS/MS, LC-MS and LC/MS/MS). *J Mass Spectrom* 2003; 38: 917-923.
15. Ma Y, Kim H. Determination of steroids by liquid chromatography/mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrometry* 1997; 8: 1010-1020.
16. Orsi D, Pellegrini M, Pichini S, Mattioli D, Marchei E, Gagliardi L. High-performance liquid chromatography–diode array and electrospray-mass spectrometry analysis of non-allowed substances in cosmetic products for preventing hair loss and other hormone-dependent skin diseases. *J Pharm Biomed Anal* 2008; 48: 641–648.
17. Tai SS, Xu B, Welch MJ. Development and evaluation of a candidate reference measurement procedure for the determination of progesterone in human serum using isotope-dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 2006; 78: 6628-6633.

18. Wu Z, Zhang C, Yang C, Zhang X, Wu E. Simultaneous quantitative determination of norgestrel and progesterone in human serum by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *Analyst* 2000; 125: 2201–2205.
19. Leb CR, Hu F, Beverley E. Metabolism of Progesterone by Human Lymphocytes: Production of Neuroactive Steroids. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 4064-4068.
20. Almeida C, Nogueira JMF. Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection. *J Pharm Biome Analysis* 2006; 41: 1303-1311.
21. Murphy BP, Allison CM. Determination of progesterone and some of its neuroactive ring A-reduced metabolites in human serum. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000; 74: 137-142.
22. Jenab V, Christina A, Minerly E, Niyomchia T, Akahvan A, Jenab S, Frye C. Progesterone and allopregnanolone are induced by cocaine in serum and brain tissues of male and female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2008; 89: 292-297.
23. Katayama M, Nakane R, Matsuda Y, Kaneko S, Harac I, Sato H. Determination of progesterone and 17-hydroxyprogesterone by high performance liquid chromatography after pre-column derivatization with 4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4adiaza-s-indacene-3-propionohydrazide. *The Analyst* 1998; 123: 2339-2342.
24. Stead DA, Reid RG, Taylor RB. Capillary electrochromatography of steroids Increased sensitivity by on-line concentration and comparison with high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1998; 798: 259-267.

25. Mensah C, Kibaly C, Mensah-Nyagan AG. Substance P inhibits progesterone conversion to neuroactive metabolites in spinal sensory circuit: A potential component of nociception. *Proc Nat Acad Sci* 2005; 102: 9044-9049.
26. Morrill GA, Ma G, Kostellow A. Molecular species analysis of 1,2-diacylglycerol released in response to progesterone binding to the amphibian oocyte plasma membrane. *Cell Signal* 2000; 12: 787-796.
27. Zarzycki PK, Kulhanek MK, Smith R, Clifton LV. Determination of steroids in human plasma using temperatur-dependent inclusion chromatography for metabolic investigations. *J Chromatogr A* 2006; 1104: 203-208.
28. Shi Y, Yao J, Liu F, Hu C, Yuan J, Zhang Q, Jin S. Establishment of an HPLC identification system for detection of counterfeit steroidal drugs. *J Pharm Bio Analysis* 2008; 46: 663-669.
29. Sheehan MP, Rice GE, Moses EK, Brennecke SP. 5 β -Dihydroprogesterone and steroid 5 β -reductase decrease in association with human parturition at term. *Mol Hum Reprod* 2005; 11: 495-501.
30. Klima F, Rohleder M, Dehnhard M, Meyer H. Identification of progesterone and 5 α -Dihydroprogesterone (5 α -DHP) in Zebras by two-dimensional high-performance liquid chromatography and their dependence on the state of reproduction. *Zoo Biology* 1999; 18: 325-333.
31. Murphy BP, Steinberg S, Hu F, Allison C. Neuroactive ring A-reduced metabolites of progesterone in human plasma during pregnancy: Elevated levels of 5 α -Dihydroprogesterone in depressed patients during the latter half of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5981-5987.

32. Hartman S, Steinhart H. Simultaneous determination of anabolic and catabolic steroid hormones in meat by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatg B* 1998; 704: 105-117.
33. Hill M, Cibula D, Havlikova H, Kancheva L, Fait T, Kancheva R, Parizek A, Starka L. Circulating levels of pregnanolone isomers during the third trimester of human pregnancy. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 105: 166-175.
34. Pucci V, Bugamelli F, Mandrioli R, Luppi B, Raggi MA. Determination of progesterone in commercial formulation and in non conventional micellar systems. *J Pharm Biomed Analysis* 2003; 30: 1549-1559.
35. Hormonlar (çevrimiçi). Yrd. Doç. Dr. Mustafa Altınışik, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD 1996.
“www.mustafaaltinisik.org.uk/89-1-26.pdf”
36. Guyton AC, Hall EJ. Textbook of Medikal Physiology. Tercüme: Çavuşoğlu H, Çağlayan YB, Aydın Z, Alican İ. Tıbbi Fizyoloji Onuncu Edisyon, İstanbul, Nobel Kitabevleri 2001: 836-840, 936, 949.
37. The United States Pharmacopeia, USP24, Official from January 1, 2000: 1407.
38. Skoog DA, Leary JJ. Principles of Instrumental Analysis, 4th Edition. New York: Harcourt Brace College Publishers, 1998: 116, 134, 135, 139, 674, 679, 705, 706.
39. Gündüz T. İnstrümental Analiz, Altıncı Baskı, Ankara: Gazi Kitapevi, 2002: 101-106, 286-287, 1224-1273.
40. 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](http://www.anchem.su.se/downloads/diss%20pdf) 2004, 6, 8.)

41. Analitik Kimya II Laboratuvar Aletli Analiz Deneyleri, Hacettepe Üniv, Ecz Fak, Analitik Kimya AD, Ankara, 2005.

42. Skoog DA, Holler FJ, Timothy AN. Principles of Instrumental Analysis. Tercüme: Kılıç E, Köseoğlu F, Yılmaz H. Enstrümental Analiz İlkeleri, Ankara. Bilim Yayıncılık, 1998, 299-351, 675-777.