

**DEFLAZACORT'UN SÜREKLİ AKIŞ
ENJEKSİYON ANALİZİ İLE
MİKTAR TAYİNİ, VALİDASYONU VE
TABLETLERİNE UYGULANMASI**

DERYA YAPAR
Yüksek Lisans Tezi

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Analitik Kimya Anabilim Dalı
Ekim 2003**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Derya Yapar'ın "DEFLAZACORT'UN SÜREKLİ AKIŞ ENJEKSİYON ANALİZİ İLE MİKTAR TAYİNİ, VALİDASYONU VE TABLETLERİNE UYGULANMASI" başlıklı Analitik Kimya Anabilim Dalı' ndaki Yüksek Lisans Tezi 03.11.2003 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı) : Prof.Dr. Muzaffer TUNÇEL

Üye : Prof.Dr. Sibel ÖZKAN

Üye : Yrd.Doc.Dr. Dilek UYSAL

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu' nun 17.10.2003. tarih ve ...28...sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET
Yüksek Lisans Tezi

**DEFLAZACORT'UN SÜREKLİ AKIŞ ENJEKSİYON ANALİZİ İLE
MİKTAR TAYİNİ, VALİDASYONU VE TABLETLERİNE
UYGULANMASI**

DERYA YAPAR

**Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Analitik Kimya Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Muzaffer Tunçel
2003**

Bu çalışmada Deflazacort (DEF)'un farmasötik tabletlerinde miktar tayini için sürekli akış enjeksiyon analizi yöntemi (FIA) tarif edilmektedir. Taşıyıcı çözelti olarak 0.2 M fosfat tamponu kullanılmıştır ve akış hızı 1.3 mL/dk' dır. DEF sinyalleri UV-spektrofometrik detektör kullanılarak 247 nm'de kaydedilmiştir. Miktar tayini için pik alanı sinyalleri kullanılmıştır. Yöntemin kesinliği ve doğrusallığı bu sinyallerle gösterilmiştir. Sinyal/gürültü oranı 3.3 kriterine göre yöntemin saptama sınırı olarak 3.65×10^{-7} M ve tayin sınırı olarak 1.10×10^{-6} M değerleri hesaplanmıştır. Yöntemin uygulanması ile elde edilen sonuçlar standart bir yöntem olan UV-spektrofotometrik yöntemin sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Pik alanı sinyalleri ile standart yöntem arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı bulunmuştur. Bu çalışmada geliştirilen sürekli akış enjeksiyon analizinin kesin, doğru, duyarlı ve ucuz bir yöntem olduğu söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Deflazacort (DEF), Sürekli Akış Enjeksiyon Analizi, Validasyon, Tablet

ABSTRACT
Master of Science Thesis

**THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF DEFLAZACORT BY
FLOW-INJECTION ANALYSIS, ITS VALIDATION AND APPLICATION
ON THE TABLETS**

DERYA YAPAR

**Anadolu University Institute of Health Sciences Department of Analytical
Chemistry**

**Supervisor: Prof. Dr. Muzaffer Tunçel
2003**

In this study, a flow injection analysis method (FIA) is described for the quantitative determination of deflazacort (DEF) in the tablets. 0.2 M phosphate buffer was used as a carrier solvent at 1.3 mL/min of flow rate. DEF signals were detected at 247 nm using UV- spectrophotometric detector. Peak area signals were used for quantification of DEF. The precision and linearity of the method were shown with these signals. The detection limit and determination limit of the method according to criteria of signal to noise 3.3 were 3.65×10^{-7} M and 1.10×10^{-6} M, respectively. The results, obtained by the application of the method, were compared with those from standard UV spectrophotometric method. It was found that the difference of the standard method and FIA was not statistically significant by using peak area response of FIA. It can be concluded that flow injection analysis method developed with this study is a precise, accurate, sensitive and cheap method.

Keywords: Deflazacort (DEF), Flow-injection analysis, Validation, Tablet

TEŞEKKÜR

Bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan, destekleriyle her zaman yanımda olduklarını hissettiğim sevgili annem Neslihan YAPAR ve babam Ömer YAPAR' a,

Bilgi ve tecrübesiyle çalışmalarımın her aşamasında beni yönlendiren değerli hocam Eczacılık Temel Bilimler Bölümü Başkanı Prof. Dr. Muzaffer TUNÇEL' e,

Tezim süresince beni sabırla yönlendiren, hoşgörü ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Yrd.Doç. Dr. Ülkü Dilek UYSAL' a,

İlgi ve destekleriyle her zaman yanımda olan Analitik Kimya Anabilim Dalı' ndaki değerli arkadaşlarım Asist. Kevser KIRMACI, Asist. Erol ŞENER, ve bu tezde en az benim kadar emeği olan ayrıca bir teşekkürü hakeden Asist. Arın Gül DAL' a,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Deflazacort'un Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	3
2.2. Deflazacort'un Farmakolojik Özellikleri.....	3
2.3. Otomatikleştirilmiş Analiz Yöntemleri.....	4
2.4. Kesiksiz Akış Yönemi (FIA).....	5
2.5. Deflazacort'un Tayini İle İlgili Çalışmalar.....	6
3. DENEYSEL BÖLÜM.....	8
3.1. Kimyasal Maddeler.....	8
3.2. Aletler.....	8
3.3. Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	8
3.4. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanışı.....	9
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	10
4.1. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizi.....	10
4.1.1. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizi Optimizasyonu.....	10
4.1.2. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizinin Kesinliği.....	11
4.1.3. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizinin Doğrusallığı.....	12
4.1.4. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizinin Saptama	

ve Tayin Sınırı.....	14
4.1.5. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizi ile Deflazacort İçeren Tabletlerde Miktar Tayini.....	14
4.2. Deflazacort'un UV Spektrofotometrik Yöntemle Analizi...	15
4.3. Tablet İçerisindeki Deflazacort Miktar Tayini Sonuçlarının Karşılaştırılması.....	16
4.4. Sonuç ve Değerlendirme.....	17
5. KAYNAKLAR.....	19
ÖZGEÇMİŞ.....	21

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.1. DEF'in kimyasal yapısı.....	3
Şekil 4.1.1.1. Standart DEF (1.0×10^{-5} M) çözeltisinin 200-360 nm aralığındaki UV spektrumu.....	10
Şekil 4.1.1.2. Akış hızının DEF sinyallerinin pik alanına etkisi.....	11
Şekil 4.1.2.1. Standart DEF (2.0×10^{-5} M) çözeltisinin 1.3 mL/dk akış hızında ve 250 nm' deki sinyallerinin tekraredilebilirliği.....	12
Şekil 4.1.3.1. DEF'in 1.0×10^{-5} - 5.0×10^{-5} M derişim aralığındaki çözeltilerinin 1.3 mL/dk akış hızında ve 250 nm' deki sinyalleri (n=2 herbiri için).....	13

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1.2.1. Deflazacort'un günüçi ve günlerarası tekraredilebilirlik sonuçları.....	12
Çizelge 4.1.3.1. 1.3 mL/dk akış hızında, 250 nm' de ve 1.0×10^{-5} - 5.0×10^{-5} M derişim aralığında DEF'in pik alanı sinyallerinin doğrusallığı.....	13
Çizelge 4.1.5.1. Pik alanlarına göre DEF'in tabletlerdeki miktar tayini değerlendirmeleri.....	15
Çizelge 4.2.1. UV-spektrofotometrik yöntemle farmasötik tabletlerde DEF tayini.....	16
Çizelge 4.3.1. Sürekli akış enjeksiyon analizi ile UV spektrofotometri yönteminin karşılaştırılması.....	17

1. GİRİŞ VE AMAÇ

DEF glukokortikoid türü yeni ilaçlardan biridir. Adreno-kortikal yetmezlikte, romatizmal hastalıkların (psoriatik artrit, romatoid artrit, ankilozan spondilit, akut gut artrit, travma sonrası, osteo artrit, akut ve subakut bursit, non spesifik akut tenosinovit, epikondilit), kollajen hastalıkların, deri hastalıklarının, allerjik durumların, akciğer hastalıklarının, göz hastalıklarının, hematolojik hastalıkların, gastrointestinal hastalıkların, böbrek hastalıklarının ve birçok akut ve kronik iltihabın tedavisinde yaygın olarak kullanılan DEF daha düşük lipit çözünürlüğüne sahip olup kemik, karbonhidrat, lipit ve fosfat-kalsiyum metabolizmasına türevlerinden daha az etkisi olduğu için de önerilmektedir [1-5]. Sporcuların performanslarını geliştirmek için de kortikoidler kullanılır. Bu yüzden kortikosteroidlerin tayini hem klinik hem de doping kontrol amaçlar için gereklidir [3].

DEF'in kantitatif tayini için çoğunlukla biyolojik numunelerde, farklı tayin sistemi ile HPLC metotları kullanılmış olup serum, plazma ve idrardaki miktar tayini uygulamaları gösterilmiştir [3, 6-11].

Sürekli akış enjeksiyon analizi, detektörün önünden akan taşıyıcı çözeltiliye numunenin enjeksiyonu ile, numunenin sistemde sürüklenmesi sırasında karşılık gelen sinyallerinin kaydedilmesini temel alan bir yöntemdir ve analitik kimyanın önemli bir metodolojik uygulamasıdır. Önemi, basit bir kimyasal işlem, ucuz alet, fazla el becerisi gerektirmeyen çalışma koşulları ve iyi kalitede sonuçlar elde edebilme olanağından kaynaklanmaktadır. Farmasötik preparatlardaki etken madde miktarını tayin etmek için sürekli akış enjeksiyon sistemlerinin kullanımı çabuk gerçekleştirilen işlemlerle oldukça iyi sonuçlar elde edilmesine olanak sağlar [12-14].

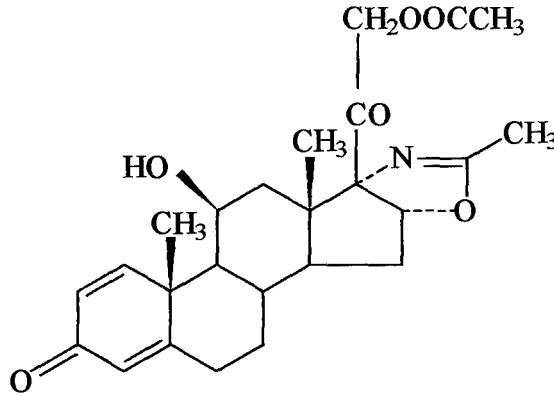
Bu çalışmanın amacı, DEF'in sürekli enjeksiyon analizi ile farmasötik tabletlerde miktar tayini için çabuk sonuç alınabilen, kesin, doğru, duyarlı ve ucuz bir yöntem geliştirmektir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, UV-spektrofotometrik yöntemle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılarak yöntemin doğruluğu ve kesinliği incelenmiştir. Geliştirilen bu

yöntemle DEF'in tabletlerdeki miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Bulunan sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Deflazacort'un Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

DEF kimyasal olarak (11 β ,16 β)-21(asetiloksi)-11-hidroksi-2'-metil-5'-H-pregna-1,4-dienol [17,16-d] okzazol-3,20-dion;11 β ,21-dihidroksi-2'-metil-5' β H-pregna-1,4-dieno [17,16-d] okzazol-3,20-dion 21-asetat;pregna-1,4-diene-11 β ,21-diol-3,20-dion [17 α ,16 α -d]-2'-metilokzolin-21-asetat; okzakort, azakort şeklinde adlandırılır. C₂₅H₃₁NO₆ kapalı formülüne sahiptir [15]. Açık kimyasal formülü Şekil 2.1.1'de görülmektedir.



Şekil.2.1.1. DEF'in kimyasal yapısı

DEF'in molekül ağırlığı 441.52'dir. Aseton-hegzan karışımında kristallendirilebilir. Maddenin metanol ve etanolde çözündüğü bildirilmektedir [15].

2.2. Deflazacort'un Farmakolojik Özellikleri

DEF bir sistemik antiinflamatuvar ajan olarak başlangıçtaki fazda bulunan, yüksek glukokortikoid aktivitesine sahip bir sentetik oksazolin steroiddir [16-17]. DEF prednisonun antiinflamatuvar özelliklerine sahip glukokortikoid olmasına karşın kemik, karbonhidrat ve lipit metabolizması üzerinde yan etki açısından daha iyi bir profil gösterir. Bu kortikosteroidler

böbrek üstü bezlerinin yetmezliğinde yer değiştirme tedavisi için fizyolojik dozlarda kullanılır [18-19].

Fizyolojik dozları aşan bütün kortikosteroidler, azalmış intestinal absorpsiyonu veya üriner atılımının artışı nedeniyle, kalsiyum dengesini negatif şekilde, kemik kütlesinin ilk kaybindan, osteopeni ve osteoporozun son kademesine erişene kadar etkilerler.

İnsanlarda yapılan klinik çalışmalar DEF'in diğer glukokortikoidlere göre kemik reabsorpsiyonunun ve buna bağlı olarak iskeletin kalsiyum ve protein matriks kaybının daha az olmasına neden olduğunu göstermiştir [18-19].

Bundan başka doğal ve sentetik kortikosteroidler, glukoz toleransını düşürme ve latent diabetes mellitusa neden olma ve böylece insülin tedavisini gerektirme veya antidiyabetik ilaçların kullanımını arttırarak klinik diyabeti daha da kötüleştirme eğilimine sahiptirler. DEF diğer kortikosteroidlere göre karbonhidrat metabolizmasını belirgin bir şekilde daha az etkilemektedir. Bu, karşılaştırmalı çalışmalarda DEF'in glikoz toleransını hafif ve daha az sıklıkta azaltılmasıyla gösterilmiştir [8, 20, 21].

2.3. Otomatikleştirilmiş Analiz Yöntemleri

Analitik kimyada son yıllarda gözlenen en önemli gelişmelerden biri otomatik ve akışkan ortamlarda enjeksiyon tekniği ile analiz yöntemleridir. Bu yöntemlerde analizcinin katkısı en aza indirgenmiş, çok sayıda rutin analizin yapılması, özellikle hızlı analizin gerektiği konumlarda daha az maliyetle büyük yararlar sağlamıştır. Analitik enstrümantasyondaki gelişmenin elektronik ve bilgisayardaki gelişme ile doğru orantılı olmasıyla, bu yöntemler klinik, çevre v.b. laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Sürekli akış yönteminde kimyasal analiz için izlenen aşamalardan; örnek alma ve hazırlama dışındaki tüm basamaklar otomatikleştirilmiştir. Bu yöntem bir gaz yada sıvı akışının hiç kesilmediği koşullarda analiz yapmayı sağlayan sistemlerdir. Örnekler ya belirli bir sıklıkta reaktif içeren kolon içine gönderilir ya da yardımcı bir kolonla reaktif taşınarak bir reaktörde her ikisi karıştırılıp

saptama yapılabilmektedir. Akış dedektörden geçerken sinyaller sürekli kaydedilmekte ve taşınan çözelti dışarı atılmaktadır. Her bir örnek sinyali zemin sinyalinin kararlı bir konuma ulaşmasından sonra pik formunda elde edilmekte ve pik yükseklikleri derişimle doğru orantılı olarak değişmektedir. Zemin sinyali ise, örnek yada tepkime ürününün dedektörden geçmediği ölçüm aralığına karşı gelen konumdur [22].

2.4. Kesiksiz Akış Yöntemi (FIA)

İlk kez 1975 yılında Ruzicka ve Hansen tarafından "Flow Injection Analysis", FIA, adıyla önerilmiş olan Kesiksiz Akış Yöntemi, akışın sürekli olduğu ortama örnek enjeksiyonu ile oluşan örnek zonuunun dedektör sistemine taşınarak, sinyalin sürekli izlenmesi ilkesine dayanmaktadır. Kısaca "akan bir sisteme enjeksiyonla analiz" de denilebilir. Sinyal zamana bağlı pik formundadır. Sistem az bir deneyim ve ucuz bir alet donanımı ile kurulabilir.

Kesiksiz akış yönteminde örnek taşıyıcı sistem içine enjekte edilmekte, enjekte edilen örnek sistem boyunca taşınırken fizikokimyasal işlemler gerçekleşebilmektedir. Örneğin kısmi dispersiyonu ya da seyrelme hidrodinamik koşulların kontrol edilmesi ile mümkün olmaktadır. Yöntemde kimyasal ve fiziksel dengenin oluşmasını bekleme zorunluluğu yoktur. Ancak tüm sistemin tekrarlanabilir çalışması gerektiği gibi, örnekleme zamanının tekrarlanabilir olması da gereklidir. Çünkü denge konumuna ulaşılmadan ölçüm yapılmakta ve küçük değişimler büyük yanlıgılara neden olabilmektedir.

Özetle Kesiksiz Akış Yöntemi (FIA) sürekli bir akış, doğrudan enjeksiyon, kontrollü kısmi dispersiyon ve tekrarlanabilir örnekleme zamanı özelliklerine sahip olduğu koşullarda ideal bir çalışma olanağı sağlar.

FIA üç çalışma ilkesinden oluşmaktadır. Örnek enjeksiyonu, enjekte edilen örneğin kontrollü dağılımı (dispersiyonu) ve enjeksiyon noktasından dedektöre olan hareketin tekrarlanabilir zamanlı olması. Örnek enjekte edildikten sonra, örnek zonu ilk önce dikdörtgen şeklinde olup, daha sonra akış kolundaki dağılma nedeniyle genişler. Dağılmaya konveksiyon ve difüzyon neden olmaktadır [22].

2.5. Deflazacort Tayini İle İlgili Çalışmalar

Bernareggi ve ark. [6] DEF'in iki ana metabolitinin, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile insan plazmasında tayinini incelemişlerdir. Bu metabolitler DEF'in hızlı dealkilasyonu ile oluşan Deflazacort-21-alkol ve bu metabolitin 6- β -hidroksilasyonu ile oluşan 6- β -hidroksi-Deflazacort-21-alkoldür. Ekstraksiyon işlemleri için metilen klorür çözeltisi kullanılmıştır. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile tayinde akış hızı 1 mL/dk olmak üzere metilen klorür:metanol (94:6, v/v) karışımının mobil faz olarak kullanıldığı bildirilmektedir. Çalışmada iç standart olarak prednisolon kullanılmış ve prednisolon, asetonitril:2-propanol (50:50, v/v) karışımında çözülmüştür. Ölçümlerin 254 nm dalga boyunda, UV dedeksiyonu ile pik yükseklikleri göz önünde bulundurularak yapıldığı belirtilmektedir. Numunelerin 10-600 ng mL⁻¹ aralığında doğrusallık gösterdiği bulunmuştur.

Hirata ve ark. [7] insan serumuyla yaptıkları bir çalışmada DEF'in iki metaboliti, kortisol, kortison, prednisolon ve prednisonu ters faz yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile analiz etmişlerdir. Tüm steroidler izopropanol:asetonitril (1:1, v/v) karışımında çözülmüştür. Ekstraksiyon kolonundan metanolla yıkama sonucu elde edilen serum yüksek basınçlı sıvı kromatografya enjekte edilmiştir. Mobil faz olarak gradient sistemde izopropanol:0.05 M asetat tamponu pH 4.5 (10:90, v/v) kullanılmıştır. Dedeksiyonun 254 nm'de gerçekleştirildiği ve iç standart olarak betametazon kullanıldığı bildirilmektedir. Sinyal/gürültü=5 oranına göre her bileşik için saptama sınırının 10 ng/mL olduğu belirtilmektedir. Yöntemin validasyonu yapılmıştır.

Santos-Montes ve ark. [3] çalışmalarında DEF ve metaboliti olan 21-hidroksi-DEF'in de içinde bulunduğu 16 kortikoid için iki ayrı yüksek basınçlı sıvı kromatografik yöntem geliştirmişlerdir. Çalışmada sözü geçen maddelerin ekstraksiyonunu, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile analizini ve yöntemin idrar numunelerine uygulanmasını tarif etmişlerdir. Geliştirilen yöntemde metil-prednisolon iç standart olarak kullanılmıştır. Mobil faz olarak su:tetrahidrofüran (72:28, v/v) karışımının, detektör olarak da diode array detektörün kullanıldığı bildirilmektedir. Her iki ayırım sonucunda da, bu 16 kortikoidin 15 tanesinin

farklı C₁₈ kolonlar kullanılarak tayini yapılabilmektedir. Ayrıca çalışmada DEF ve metaboliti için farklı ekstraksiyon prosedürleri de yer almaktadır.

Özkan ve ark. [8] insan serum numunelerinde ve tabletlerde DEF'in tayini için UV dedeksiyonu ile RP-HPLC metodu geliştirmişlerdir. Ayırma C₁₈ kolon (250x4.6 mm; 5µm) ve asetonitril: metanol: 0.067 M KH₂PO₄ (pH:6.5) (27:20:53, v/v/v) karışımından oluşan mobil faz sistemi kullanılarak yapılmıştır. Analiz sonuçları istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve valide edilmiştir. Yöntemin saptama sınırı ve tayin sınırı mobil fazda 2.05 ng mL⁻¹ ve 6.83 ng mL⁻¹ olarak, serum numunelerinde ise 4.06 ng mL⁻¹ ve 13.55 ng mL⁻¹ olarak belirtilmiştir. Metot, mobil fazda 10-30.000 ng mL⁻¹, serum numunelerinde ise 25-30.000 ng mL⁻¹ konsantrasyon aralığında doğrusallık göstermiştir.

3. DENEYSEL BÖLÜM

3.1. Kimyasal Maddeler

Standart DEF Aventis Pharma (Türkiye) firmasından temin edilmiştir. Deneyler sürecinde kullanılan fosforik asit, etanol, pH 6.0 tampon çözeltisinin ayarlanmasında kullanılan sodyum hidroksit ve hidroklorik asit Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir ve analitik ölçülerde saftır. Deneyler sırasında kullanılan bidistile su laboratuvarımızda tümü pyrex camdan yapılmış cihazlarda üretilmiştir.

3.2. Aletler

Spektrofotometrik deneyler sırasında Shimadzu marka UV-2401 PC model spektrofotometre kullanılmıştır.

Sürekli akış enjeksiyon analizinde, LC 6A marka sıvı kromatograf ve pompa, SPD-10A marka UV detektörle yapılan deneylerde elde edilen verilerin işlenmesi CR-7A marka integratör ile gerçekleştirilmiştir (hepsi Shimadzu, Japonya). Numune enjeksiyonları Rheodyne (Cotati, ABD) marka enjeksiyon tablasına 22 gauge enjektör ucu ile yapılmıştır.

Tüm çözeltilerdeki çözünmüş gazları uzaklaştırmak için B-220 (Branson, ABD) model ultrasonik banyo kullanılmıştır. Çözeltilerin pH'ları Elektromag M822 model pH metre ile ölçülmüştür.

3.3. Standart Çözeltinin Hazırlanması

Sürekli akış enjeksiyon analizinde taşıyıcı çözeltinin hazırlanması için %20'lik etanol ile 0.2 M H_3PO_4 çözeltileri hazırlanıp gerekli oranda karıştırıldıktan sonra 1 M NaOH ile pH'ı 6.0'ya ayarlanmıştır.

DEF standardından uygun miktar tartılıp bir balon jøjeye transfer edilmiş, üzerine etanol ilave edilerek çözülmüştür. Seyrelmeler, pH'ı 6.0 olan 0.2 M fosfat tamponu katılarak yapılmıştır. Etanolün yüzdesi hep %20 olarak ayarlanmıştır.

DEF'in UV- spektrumu için 1.0×10^{-5} M'lık çözelti kullanılmıştır. Bu çözelti ile kuvarz küvetler kullanılarak 200-360 nm dalga boyu aralığında tarama yapılmıştır. Kör olarak deneyler esnasında kullandığımız çözücü sistem kullanılmıştır.

Sürekli akış enjeksiyon analizi deneyleri için önce 5.0×10^{-4} M 'lık stoktan hareketle 1.0×10^{-4} M'lık yeni stok çözelti hazırlanmıştır. Elde edilen pik alanları doğrultusunda 1.0×10^{-5} - 5.0×10^{-5} M'lık çözeltiler kalibrasyon seti oluşturmak üzere belirlenmiştir. Tekraredilebilirlik çalışmalarında 2.0×10^{-5} M'lık DEF çözeltisi kullanılmıştır.

3.4. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanışı

DEF'in farmasötik preparatı, Aventis Pharma firmasının üretimi olan Filantadin® adlı tablet olup 30 mg DEF içerdiği bilinmektedir. Farmasötik preparatlardaki DEF tayinlerinin farmakopelerdeki gibi yapılma zorunluluğu vardır. Ancak, DEF henüz farmakopelere monograf olarak girmemiştir. Bu nedenle, genel farmakope yöntemleri uygulanmış ve sonuçlar buna göre yorumlanmıştır.

Genel uygulamaya göre; 10 adet DEF tableti alındı, tartıldı ve ortalama tablet ağırlıkları (368.7 mg) hesaplandı. Tartımı gerçekleştirilen bu tabletler toz haline getirilerek koyu renkli bir şişeye kondu ve kapağı kullanım dışında hep kapalı tutuldu. Tayinler sürecinde, bir tablete eşdeğer tartım alınıp gerekli işlemler yapılmıştır. DEF'in tablet tozundan geri kazanımı etanol katılarak ve ultrasonik banyoda işlem uygulayarak sağlanmıştır. Seyrelme işlemleri diğerlerine benzer şekilde gerçekleştirilmiştir.

Sürekli akış enjeksiyon analizi ve UV-spektrofotometrik yöntemde standart DEF için tarif edildiği şekilde seyreltilen numune çözeltisinin 247 nm'de yanıt sinyalleri ve absorbans değerleri ölçülerek kalibrasyon eşitliklerinde çözüldükten sonra tablet içindeki DEF miktarı hesaplanmıştır.

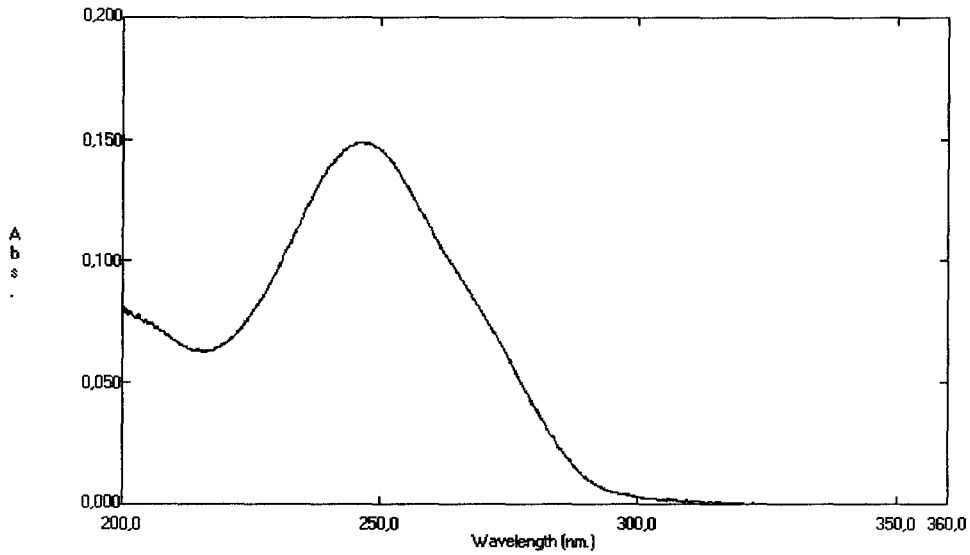
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizi

4.1.1. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizi Optimizasyonu

Deneyler esnasında yapılan çalışmalarda pH'ı 6.0 olan 0.2 M fosfat tampon sistemi çözücü olarak seçilmiş ve tüm seyreltme işlemleri bu tampon ile yapılmıştır.

Sürekli akış enjeksiyon analizi sinyalleri UV detektör ile algılandığı için çalışma dalga boyunu belirlemek gereklidir. Bu amaçla, deneysel kısımda tarif edilen şekilde hazırlanan standart DEF çözeltileri kullanılarak 200-360 nm dalga boyu aralığında DEF'in UV spektrumu kaydedilmiştir. DEF'in 1.0×10^{-5} M'lık çözeltisinin spektrumu Şekil 4.1.1.1.'de görülmektedir.

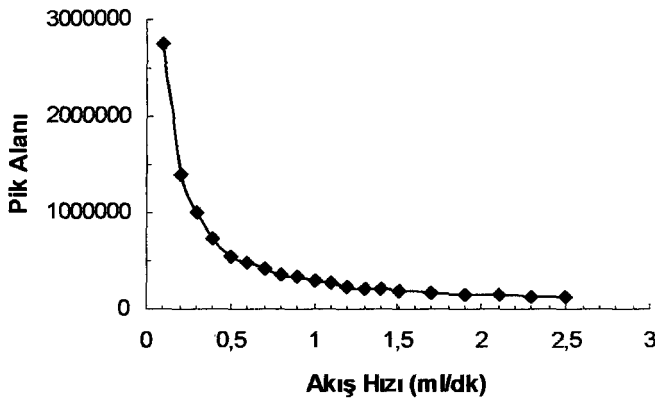


Şekil 4.1.1.1. Standart DEF (1.0×10^{-5} M) çözeltisinin 200-360 nm aralığındaki UV spektrumu.

Belirtilen koşullarda DEF'in en yüksek absorbanans verdiği dalga boyu 247nm olarak gözlenmiş ve sürekli akış enjeksiyon analizi deneylerinde kullanılacak dalga boyu değeri 247 nm olarak seçilmiştir.

Sürekli akış enjeksiyon analizinde en uygun pik sinyallerinin elde edildiği akış hızı değerinin belirlenmesi önemlidir. Akış hızının piklere olan etkisi 0.1-2.5 mL/dk akış hızı aralığında incelenmiştir. Düşük akış hızlarında büyük pik alanları ve keskin olmayan pikler belirmiştir. Yüksek akış hızlarında ise pikler daha keskinleşmiş ve pik alanları oldukça düşük bulunmuştur.

Belirtilen akış hızı aralığında elde edilen pik alanı değerleri akış hızına karşı grafiğe geçirildiğinde Şekil 4.1.1.2. elde edilmiştir.

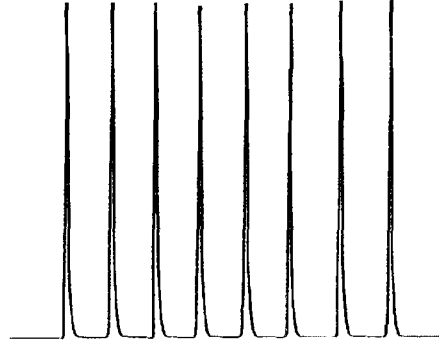


Şekil 4.1.1.2. Akış hızının DEF sinyallerinin pik alanına etkisi.

Akış hızının incelenmesinde elde edilen tüm veriler göz önünde bulundurularak optimum koşulları sağlayan akış hızı değerinin 1.3 mL/dk olduğuna karar verilmiştir.

4.1.2. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizinin Keskinliği

Yöntemin keskinliğinin incelenmesi amacıyla DEF'in 2.0×10^{-5} M derişimli çözeltisi ile 8 ayrı enjeksiyon ve birbirini takip eden 3 günde sürekli akış enjeksiyon sinyalleri kaydedilmiştir. Birinci gün elde edilen 2.0×10^{-5} M derişimindeki DEF çözeltisinin 1.3 mL/dk akış hızındaki 8 sinyal Şekil 4.1.2.1 de verilmiştir.



Şekil 4.1.2.1. Standart DEF(2.0×10^{-5} M) çözeltisinin 1.3 mL/dk akış hızında ve 247 nm'deki sinyallerinin tekraredilebilirliği.

Pik alanları olarak elde edilen sinyaller istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.1.2.1.'de verilmektedir.

Çizelge 4.1.2.1. DEF'in günüçi ve günlerarası tekraredilebilirlik sonuçları.

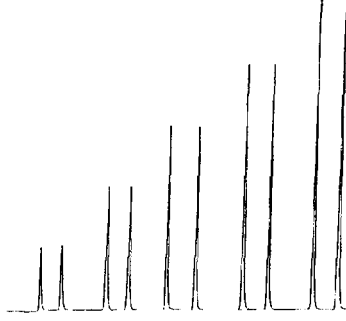
	Günüçi kesinlik			Günlerarası kesinlik
	1.gün	2.gün	3.gün	Tüm günler
	(n=8)	(n=8)	(n=8)	(n=24)
	Alan	Alan	Alan	Alan
Ortalama	178118	178332	178198	178216
Standart sapma	518	730	489	570
% Bağlı standart sapma	0.29	0.41	0.27	0.32

Çizelge 4.1.2.1.'den de görüldüğü gibi, pik alanı sinyallerinin tekraredilebilirliğinin değerlendirilmesi ile % 0.4 dolayında % bağlı standart sapma değerlerini veren yüksek tekraredilebilirlik sonuçları elde edilmiştir.

4.1.3. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizinin Doğrusallığı

DEF'in 1.0×10^{-5} - 5.0×10^{-5} M derişim aralığında beş ayrı çözeltisi deneysel bölümde anlatıldığı şekilde hazırlanmış ve yöntemin doğrusallığını incelemek amacıyla sürekli akış sistemine enjekte edilmiştir. Günüçi ve günlerarası tekraredilebilirliği göstermek için belirtilen konsantrasyon aralığında, üç ayrı set

çözelti hazırlanarak birbirini takip eden 3 günde pik sinyalleri kaydedilmiştir. Elde edilen sinyaller Şekil 4.1.3.1.'de görülmektedir.



Şekil 4.1.3.1. DEF'in 1.0×10^{-5} - 5.0×10^{-5} M derişim aralığındaki çözeltilerinin 1.3 mL/dk akış hızında ve 247 nm'deki sinyalleri (n=2 herbiri için).

Doğrusallık deney sonuçları ise Çizelge 4.1.3.1.'de pik alanlarına göre sunulmaktadır.

Çizelge 4.1.3.1. 1.3 mL/dk akış hızında , 247 nm'de ve 1.0×10^{-5} - 5.0×10^{-5} M derişim aralığında DEF'in pik alanı sinyallerinin doğrusallığı.

	1.gün (n=5)	Güniçi 2.gün (n=5)	3.gün (n=5)	Günlerarası Tüm günler (n=15)
Eğim, a	7.96×10^9	8.05×10^9	8.02×10^9	8.01×10^9
Kesim, b	2.46×10^3	7.58×10^2	1.19×10^3	1.48×10^3
Korelasyon katsayısı, r	r=0.9999	r=0.9999	r=0.9998	r=0.9999
Regresyon denkleminin Standart sapması, ± Sr	1.26×10^5	1.27×10^5	1.27×10^5	1.17×10^5
Güven Aralığı(p<0,05)	$\pm 1.57 \times 10^5$	$\pm 1.58 \times 10^5$	$\pm 1.58 \times 10^5$	$\pm 6.60 \times 10^4$

Pik alanlarına göre yapılan istatistiksel hesaplamalarda DEF'in farmasötik tabletlerindeki miktar tayinine izin verecek ölçüde, oldukça iyi korelasyon katsayılı kalibrasyon eşitlikleri elde edilmiştir.

4.1.4. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizinin Saptama ve Tayin Sınırı

DEF'in sürekli akış analizi yöntemiyle saptama sınırı (Limit of detection, LOD) değerinin belirlenmesi amacıyla sinyal/gürültü=3.3 (S/N=3.3) için pik alanı sinyali dikkate alınarak hesaplamalar yapılmıştır. Tayin sınırının (Limit of quantification, LOQ) belirlenmesi için sinyal/gürültü=10 (S/N=10) eşitliğine göre pik alanı sinyali dikkate alınmıştır. Belirtilen koşullarda yöntemin saptama sınırı 3.65×10^{-7} M ve tayin sınırı 1.10×10^{-6} M olarak hesaplanmıştır.

4.1.5. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizi ile Deflazacort İçeren Tabletlerde Miktar Tayini

Burada geliştirilen yöntem daha sonra DEF'in farmasötik preparatı olan tabletlerdeki (30 mg DEF içeren) miktar tayini için uygulanmıştır.

Sürekli akış enjeksiyon analizi uygulamaları için tablet çözeltisi, standart çözeltiyle aynı olacak şekilde hazırlanmıştır. Farmasötik tablet içeriği 10mL etanol içerisinde çözülerek hazırlanan stoktan hareketle son derişimi 3.0×10^{-5} M olan yeni çözelti hazırlanmıştır. Standart çözeltinin kalibrasyon setinin orta noktasına denk gelecek şekilde hazırlanan 6 yeni çözeltiyle enjeksiyonlar yapılmıştır. Okunan pik alanları kalibrasyon denkleminde ($A=8.01 \times 10^9 \cdot C(M)+1.48 \times 10^3$) çözülerek çözeltilerin içerdiği DEF miktarları hesaplanmıştır. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 4.1.5.1.'de sunulmaktadır.

Çizelge 4.1.5.1. Pik alanlarına göre DEF'in tabletlerdeki miktar tayini değerlendirmeleri.

	Bulunan DEF (mg)	% DEF
	30.59	101.97
	30.47	101.57
	30.29	100.97
	30.35	101.17
	30.53	101.77
	30.47	101.57
Ortalama	30.45	101.50
Standart sapma	0.14	0.41
% Bağlı standart sapma	0.45	0.40
Güven aralığı (p<0.05)	0.15	0.43

Çizelge 4.1.5.1.'den görüldüğü gibi % bağlı standart sapma değerleri % 1 in altında olan ve tabletlerde pik alanı sinyallerine göre % 101 oranında DEF içeriği bulunmuştur.

4.2. Deflezacort'un UV Spektrofotometrik Yöntemle Analizi

Spektrofotometri, ilaç içerisindeki etken madde tayininde yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir [23-30]. Sürekli akış enjeksiyon analizi ile yapılan farmasötik tablet içerisindeki DEF tayini sonuçlarının doğruluğunu ve kesinliğini karşılaştırmak için UV spektrofotometrik yöntemin kullanılabilmesi koşullar araştırılmıştır.

Spektrofotometrik yöntemin uygulanması için DEF'in fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış olan çözeltisi kullanılmıştır. Maddenin spektrumu 200-360 nm dalga boyu aralığında kuvarz küvetler kullanılarak kaydedilmiştir. Kör olarak fosfat tamponu kullanılmıştır.

Kalibrasyon eğrisini hazırlamak ve kalibrasyon eşitliğinin belirlenmesi için stok çözeltisinden sırayla 1.02×10^{-5} , 2.04×10^{-5} , 3.06×10^{-5} , 4.08×10^{-5} , 5.10×10^{-5} M'lık standart DEF çözeltileri hazırlanarak 247 nm'deki absorbans değerleri okunmuştur. Belirtilen derişimler ile karşılık gelen absorbans değerleri grafiğe geçirildiğinde ;

$$A=14265.C(M)-0.087 \quad r=0.9999$$

eşitliği elde edilmiştir. Elde edilen bu sonuç üzerine korelasyon katsayısı yüksek doğrusal kalibrasyon eğrisi ile DEF içeren tabletlerde miktar tayininin yapılabileceğine karar verilmiştir.

Tablet numunesi deneysel kısımda tarif edildiği şekilde kalibrasyon doğrusunun orta noktasına karşılık gelecek şekilde 3.0×10^{-5} M derişimde hazırlanarak 247 nm dalga boyunda absorbands değerleri okunmuştur. Bulunan numune absorbandsları kalibrasyon eşitliğinde çözüldükten sonra DEF içeriği hesaplanmıştır.

Spektrofotometrik yöntemle elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2.1.'de sunulmaktadır.

Çizelge 4.2.1. UV spektrofotometrik yöntemle farmasötik tabletlerde DEF tayini.

	Bulunan DEF (mg)	% DEF
	30.25	100.84
	30.44	101.47
	31.10	103.86
	30.82	102.74
	30.84	102.79
Ortalama	30.69	102.34
Standart sapma	0.31	1.19
% Bağlı standart sapma	0.99	1.16
Güven aralığı(p<0.05)	0.39	1.48

Çizelgeden de görüldüğü gibi farmasötik tabletlerdeki ortalama DEF miktarı % 102 olarak bulunmuştur ve yöntemin % bağıl standart sapması % 2'nin altındadır.

4.3. Tablet İçerisindeki Deflazacort Miktar Tayini Sonuçlarının Karşılaştırılması

Sürekli akış enjeksiyon analizi, standart yöntem olarak uygulanan UV-spektrofotometri yöntemi uygulanarak elde edilen tablet analiz sonuçları SPSS 10.0 paket programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Sürekli akış enjeksiyon analizinin pik alanı şeklinde elde edilen sinyal yanıtları standart yöntemlerle ayrı ayrı değerlendirildiğinde bulunan istatistiksel veriler Çizelge 4.3.1.'de verilmektedir.

Çizelge 4.3.1. Sürekli akış enjeksiyon analizi ile UV-spektrofotometri yönteminin karşılaştırılması.

	Sürekli akış enjeksiyon analizi (n=6)	UV-Spektrofotometri (n=5)
Ortalama	30.4	30.7
Standart sapma	0.14	0.31
% Bağlı standart sapma	0.45	0.99
t-testi (p<0.05)	1.89	Tablo t _{0.05} =2.26
F testi(p<0.05)	4.90	Tablo F _{0.05} =5.19

Çizelge 4.3.1.'de görüldüğü gibi t-testi uygulanarak pik alanı sinyalleri ile bulunan DEF miktarları ile standart UV- spektrofotometri yöntemle elde edilen miktarlar birbirine çok yakındır. Majistral tablet üzerinde DEF miktarı 30 mg olarak belirtilmektedir ve her iki yöntemle de bulunan miktarlar 30 mg'a çok yakındır. Farmakopelerde monografi bulunmayan DEF için genel kurallar uygulandığında kabul edilebilirlik sınırının % 90-% 110 arasındaki ağırlığa sahip olanların kabuledilebilirliği düşünülmelidir. Buna göre geliştirilen yöntem ve karşılaştırma yöntemi olarak kabul edilen UV-spektrofotometri yöntemiyle bulunan sonuçlar resmi gerekleri yerine getirmektedir. Ayrıca, karşılaştırma yöntemi olarak kabul edilen UV spektrofotometri yöntemi t-(1.89<2.26) ve F-(4.90<5.19) testlerine göre % 95 güven düzeyinde iki yöntem arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemli olmadığı (insignificant) bulunmuştur.

4.4. Sonuç ve Değerlendirme

Sürekli akış enjeksiyon analizi, son yıllarda basitliği, hızlı oluşu, az miktarda numune gerektirmesi ve ucuz olması gibi nedenlerle analitik kimyada önem kazanmış bir yöntemdir. Diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında kolay otomasyonu, duyarlılığı, yüksek tekrar edilebilirliği ve kısa analiz süresi sağlaması nedenleriyle daha çok tercih edilen bir yöntem olmuştur.

Bu çalışmada, sürekli akış enjeksiyon analizi, geçerli bir yöntem olan UV-spektrofotometri ile karşılaştırılmıştır. Yöntemler arasındaki farkın istatistiksel olarak önemsiz olduğu % 95 güvenle söylenebilir.

Burada nerilen yöntem basit, hızlı, ucuz ve kesindir. Bu nedenle DEF'in laboratuvarlardaki rutin analizi için önerilebilir.

KAYNAKLAR

1. SCHIATTI, P., SELVA, D., BARONE, D., RESTELLI, A., GLASSER, A., *Drug Res*, **30**, 15434, 1980.
2. HAHN, B.H., HAHN, T.J., *Adv. Exp. Med. Biol*, **171**, 301, 1984.
3. SANTOS-MONTES, A., GONZALO-LUMBRERAS, R., GASCO-LOPEZ, A.I., IZQUIERDO-HORNILLOS, R., *J.Chromatogr. B*, **657**, 248-253, 1994.
4. TAKEUCHI, R., *Suteroidoyaku no tsukaikata, Nagai Shoten, Osaka*, 1989.
5. KROGSGAARD, MR., THAMSBORG, G., LUND, B, *Annals of the Rheumatic Diseases*, **55**,143-146, 1996.
6. BERNAREGGI, A., POLETTI, P., ZANOLO, G., ZERILLI, L.F., *J. Pharmaceutical & Biol.Analysis*, **5**, 177-181, 1987.
7. HIRATA, H., KASAMA, T., SAWAI, Y., FIKE, R.R., *J. Chromatogr.B*, **658**, 55-61, 1994.
8. ÖZKAN, Y., SAVAŞER, A., TAŞ, Ç., USLU, B., ÖZKAN, S. A., *J. Liquid Chromatogr & Related Technologies*, **26**,2141-2156, 2003.
9. REYNOLDS, D.L., BURMASTER, S.D., EICHMEIER, L.S., *Biomed. Chromatogr*, **8**, 230-235, 1994.
10. IFA, D.R., MORAES, M.O., SANTAGALA, V., CALIENDO, G., *J.Mass Spectrom*, **35**, 440-445, 2000.
11. SANTOS-MONTES, A., IZQUIERDO-HORNILLOS, R., *J.Chromatogr. B.*, **724**, 53-63, 1999.
12. BARROS, F.G., TUBINO, M., *Analyst*, **117**, 917-919, 1992.
13. GONZALES, F., TARIN, P., MASPOCH, S., BLANCO, M., *Arch. Pharm*, **321**, 725-728, 1988.
14. NOBREGA, J.A., FATIBELLO-FILHO, O., CRUZ VIEIRA, I., *Analyst*, **119**, 2101-2104, 1994.
15. The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, Eleventh edition, Published by Merck & Co., Inc., N.J.,ABD, 1989, s:979.
16. NATHANSOHN, G., WINTERS, G., TESTA, E., *J. Med. Chem.* **10**, 799-802, 1967.

17. SCHIATTI, P., SELVA, D., BARONE, D., RESTELLI, A., GLASSER, A., *Arzneim.Forsch.* **30**,1543-49, 1980.
18. GENNARI, C., IMBIMBO, B., MONTAGNANI, M., BERNINI, M., NARDI, P., AVIOI, L.V., *Calcif. Tissue Int.* **36**, 245-252, 1984.
19. BUNIVA, G., DUBINI, A., SASSELLA, D., *Curr. Ther. Res.* **26**, 69-81, 1979.
20. HARDMAN, J.G., LIMBIRD, L., GILMAN, A.G., GOODMAN AND GILMAN'S. The McGraw Hill Comp. 1996 [CD-ROM]
21. Martindale, The Extra Pharmacopeia, 29th Ed., Reynold, J.E.F., Ed., Pharmaceutical Press: London, 1989, s: 904.
22. HENDEN, E., GÖKÇEL, İ., ERTAŞ, N., *Eser Analiz Yaz Okulu*, 272, 2002
23. TUNÇEL, M., YAZAN, Y., DOĞRUKOL, D., ATKOŞAR, Z., *Analytical Letters*, **24(10)**, 1837-1846, 1991.
24. DOĞRUKOL, D., TUNÇEL, M., *Portugaliae Electrochimica Acta*, **9**, 331-338, 1991.
25. TUNÇEL, M., DOĞRUKOL, D., *Analytical Letters*, **25 (6)**, 1087-1094, 1992.
26. DOĞRUKOL-AK, D., TUNÇEL, M., *Pharmazie*, **49 (21)**, 928-929, 1994.
27. DOĞRUKOL-AK, D., TUNÇEL, M., *Pharmazie*, **50 (10)**, 701-702, 1995.
28. TUNÇEL, M., DOĞRUOL-AK, D., *Pharmazie*, **52 (1)**, 73-74, 1997.
29. DOĞRUKOL-AK, D., GÖKÖREN, N., TUNÇEL, M., *Analytical Letters*, **31 (1)**, 105-116, 1998.
30. DOĞRUKOL-AK, D., TUNALIER, Z., TUNÇEL, M., *Pharmazie*, **53(4)**, 272-273, 1998.