

GİRİŞ ve AMAÇ

Nimodipin, bir dihidropiridin türevi olan kalsiyum kanal blokörü olup subaraknoid kanama sonucu oluşan iskemik hasarın tedavisinde kullanılmaktadır (Blardi ve ark., 2002).

Deney hayvanlarındaki bulgulara göre serebral damarlarda, diğer damar yataklarının çoğundakinden daha belirgin vazodilatasyon yapar. Subaraknoid kanama olgularında; beyin damarlarındaki vazospazm insidansını veya spazmın derecesini ya da lokal kan akımı ölçümünü değiştirmeyen dozlarda bile, kanamadan sonra lokal beyin dokusunda yavaş olarak gelişen infarkt (nekroz) alanının boyutlarını küçülttüğü saptanmıştır. Karaciğerde çabuk yıkılır, eliminasyon yarılanma ömrü ortalama 1 saat kadardır. Çok fazla lipofilik olduğu için beyine kolaylıkla girer. Beyin iskemisine yol açan durumlarda iskeminin, nöronlarda aşırı kalsiyum birikmesine bağlı zedeleyici etkisini azaltabileceği ileri sürülmüştür. Halen subaraknoid kanamanın tedavisinde kullanılır; bu durumda serebral arter spazmını önleme ve tedavi etme bakımından etkinliği kısıtlı derecede olmakla beraber, nörolojik bozukluğu yeterli derecede önleyebilir ve düzeltebilir. Böylece lokal nekroza bağlı nörolojik bozuklukları önleyebilir veya hafifletebilir. Migren profilaksisinde bazı incelemelerde, metizerjid kadar etkili bulunmuştur. Antikonvülsan etkinlik de gösterir (Kayaalp, 2005).

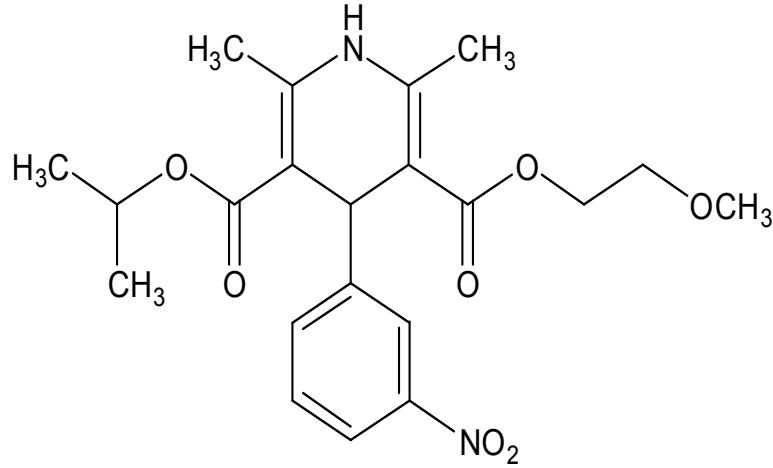
Nimodipin'in tayini için geliştirilen çok fazla yöntem bulunmamaktadır. Literatürlerde genellikle yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK) kullanılarak yapılan çalışmalar yer almaktadır. Bu çalışmanın amacı, nimodipinin tayini için literatürlerde yer almayan sürekli akış enjeksiyon analizi (AEA), yöntemi geliştirilmiş ve bu yöntemlerin farmasötik preparatlara uygulanabilirliği araştırılmıştır. Elde edilen veriler UV-Spektrofotometrik yöntem ile karşılaştırılmıştır. Sonuçta tabletlerdeki miktar tayini için çabuk sonuç alınabilen, kesin, doğru, duyarlı ve ucuz bir yöntem geliştirilmiştir. Akış enjeksiyon yöntemiyle nimodipin içeren tabletlerdeki miktar tayininin sonuçları istatistiksel olarak da değerlendirilmiştir.

Sürekli akış enjeksiyon analizi yöntemi, detektörün önünden akan taşıyıcı çözeltiliye numunenin enjeksiyonu ile, numunenin sistemde sürüklenmesi sırasında karşılık gelen sinyallerinin kaydedilmesi temeline dayanan bir yöntemdir. Bu yöntem, basit bir kimyasal işlem, otomasyon kolaylığı, ucuz kimyasal madde ve cihaz kullanımı ve iyi kalitede sonuçlar elde edebilme gibi avantajlara sahiptir. Bu avantajlar, sürekli akış enjeksiyon analizini analitik kimyanın pek çok alanındaki rutin analizler için uygun kılmaktadır (Can ve Altıokka, 2006; Altıokka ve Kırçali, 2003).

KAYNAK BİLGİSİ

Nimodipin'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Nimodipin, kimyasal olarak [izopropil 2-metoksietil 1,4-dihidro-2,6-dimetil-4-(m-nitrofenil)-3,5-piridinkarboksilat] şeklinde adlandırılır. $C_{21}H_{26}N_2O_7$ kapalı formülüne sahiptir (United States Pharmacopoeia XXIV, 2000). Açık kimyasal formülü Şekil 1 'de görülmektedir (Abraham, 2003).



Şekil 1. NIM'in Kimyasal Yapısı

Nimodipin'nin molekül ağırlığı 418.44'dür. Açık sarı veya sarı renkte, kristal toz halindedir. 125 °C'de erir (The Merck Index. 1996). Suda hemen hemen hiç çözünmez; alkolde (etanol) uygun kullanılması durumunda tamamen çözünür; etil asetatla rahatlıkla çözünür. Birden çok yapısal özellik gösterir. Ultraviyole (UV) ışığında nitro fenilpiridin türevi oluşumu açığa çıkar. Çözeltileri, kullanmadan hemen önce karanlıkta yada 420 nm'den daha büyük dalga boyundaki ışık altında hazırlanabilir (British Pharmacopoeia, 2005). İyi bir şekilde korumak için, ışığa dayanıklı kaptan 15-30 °C arasında tutulmalıdır (United States Pharmacopoeia XXIV, 2000).

Nimodipin'in Farmakolojik Özellikleri

Nimodipin, dihidropiridin türevi olan bir kalsiyum kanal blokörüdür. Deney hayvanlarındaki bulgulara göre serebral damarlarda, diğer damar yataklarının çoğundakinden daha belirgin vazodilatasyon yapar. Subaraknoid kanama olgularında; beyin damarlarındaki vazospazm insidansını veya spazmın derecesini ya da lokal kan akımı ölçümünü değiştirmeyen dozlarda bile, kanamadan sonra lokal beyin dokusunda yavaş olarak gelişen infarkt (nekroz)

alanının boyutlarını küçülttüğü saptanmıştır. Karaciğerde çabuk yıkılır, eliminasyon yarılanma ömrü ortalama 1 saat kadardır.

Nimodipin lipofilik yapıda olması nedeniyle beyine kolaylıkla girer. Nimodipinin iskemi nedeniyle nöronlarda aşırı kalsiyum birikmesine bağlı zedeleyici etkisini azaltabileceği ileri sürülmüştür. Günümüzde subaraknoid kanamanın tedavisinde kullanılmaktadır. Serebral arter spazmını önleme ve tedavi etme bakımından etkinliği kısıtlı derecede olmakla beraber, nörolojik bozukluğu yeterli derecede önleyebilir ve düzeltebilir. Böylece lokal nekroza bağlı nörolojik bozuklukları önleyebilir veya hafifletebilir. Migren profilaksisinde bazı incelemelerde, metizerjid kadar etkili bulunmuştur. Ayrıca antikönvülsan etkinliğe de sahiptir. Başlıca indikasyonu olan subaraknoid kanamada, nimodipin uygulamasına kanamayı izleyen 96 saat içinde başlanması ve 21 gün süre ile intravenöz (*i.v.*) olarak uygulanması tavsiye edilir. Uygulamanın başlangıcında birkaç gün veya en fazla 14 gün sürekli santral kateterden *i.v.* infüzyonla (1-2 mg.saat⁻¹ hızında) verilmesi gerekebilir. *i.v.* uygulamadan sonra tedavi ilacın oral yolla uygulanması ile sürdürülür. En sık görülen yan etkisi baş ağrısı, ciltte kızarma, hipotansiyon, bulantı ve gastrointestinal bozukluklardır. CYP3A4 enzimi ile yıkıldığından greyfurt suyu, metabolizmasını yavaşlatır (Kayaalp, 2005).

Nimodipinin oral uygulamasını takiben mide bağırsak sisteminde hızlı bir şekilde absorbe olur, ancak karaciğerde büyük ölçüde ilk geçişte eliminasyona uğramaktadır. Oral biyoyararlanımı yaklaşık %13 olarak rapor edilmiştir. Kan-beyin engelini kolayca ters çevirmektedir. Nimodipinin karaciğerde kapsamlı metabolik faaliyetleri vardır. Neredeyse tamamı metabolize edilerek safra yoluyla dışkı yoluyla ve idrarda atılır. Plazma yarılanma ömrü 1-2 saattir. Nimodipin plazmaya proteinlerine %95 oranında bağlanmaktadır.

Nimodipin iskemik hasarda profilaksi amacıyla oral yolla kullanılabilirdiği gibi subaraknoid kanama tedavisinde 4 gün içinde uygulamaya başlanıp 21 gün devam edebilmektedir. Hastalarda karaciğer fonksiyon bozukluğunda ilk doz yarıya indirilir ve her 4 saatte 30 mg uygulanmaktadır. Beyin iskemiası meydana gelmesinde, nörolojik bozuklukta nimodipin *i.v.* yolla da verilmektedir. İlk 2 saat saatte 1 mg nimodipin, saatte 2 mg artırılarak (Şiddetli olmamak şartıyla kan basıncında azalma gözlenir.) uygulanır. Başlangıçtaki doz ağırlığı 70 kg'dan az olan kararsız kan basıncı veya karaciğer fonksiyon bozukluğu nedeniyle hastalarda saat başına 0.5 mg veya daha az olmak şartıyla azaltılabilir. İnfüzyona 5 günden daha az ve 14 günden daha çok olmamak şartıyla devam edilebilir (Martindale, 1999).

Nimodipin bir dihidropiridin kalsiyum kanal blokörü olarak nifedipine benzer özellikler göstermekle birlikte asıl etkisi beyin damarları üzerinedir. Beyin damarındaki bozuklukları özellikle subaraknoid kanama sonucu oluşan atardamar vazospazmını önlemekte ve tedavi etmekte kullanılmaktadır (British Pharmacopea, 2005).

Son araştırmalar nimodipinin insan kırmızı kan hücreleri ve pariyetal beyin zarı nöronlarında adenezine taşınmasına engelleyici yeteneğe sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

Nimodipin atardamar düz kaslarını gevşetmektedir. Nimodipin kan-beyin engelinde bulunan atardamarı genişleterek, beyinde atardamar spazmının sebep olduğu subaraknoid kanama sonucu oluşan iskemik hasarların tedavisinde kullanılmaktadır. Nimodipin iskemik felç ve multi-infarkt demans gibi diğer

vasküler hastalıklarda da kullanılır. Etki mekanizması başlıca voltaja bağlı L-tipi kalsiyum kanallarında kalsiyum akımının engellemesine dayanır. Bununla birlikte, son çalışmalar nimodipinin tedavi edici dozlarda kırmızı kan hücreleri ve pariyetal beyin zarı nöronlarına adenosin taşınımını engelleyici özelliğe sahip olduğunu göstermiştir. Adenosin taşınımının engellenmesi nöroprotektif etki yönünden de önem taşımaktadır (Blardi ve ark., 2002).

Nimodipin ile İlgili Analitik Çalışmalar

Blardi ve ark. (2002) çalışmalarında nimodipinin farmakokinetiği ve hastalarda beyin iskemiasında etkili olan adenosin seviyelerinde nimodipinin etkilerini araştırmışlardır. 12 hasta ile beyin iskemiasında (9 erkek, 3 kadın, 68.8 ± 11.2 yaşlarında, 67.9 ± 9.3 kg kilolarında) çalışma yapmışlardır. Hastalara nimodipini *i.v.* ve oral yolla farklı doz ve dönemlerde uygulamışlardır. Adenosin ve nimodipin için kan örneklerini 480 dk.'ya kadar belli aralıklarda toplamışlardır. Daha sonra plazmadaki nimodipin ve adenosin seviyelerini YBSK yöntemi kullanarak tayin etmişlerdir. Nimodipin analizinde kan örneklerini santrifüj edip, plazmayı analize kadar dihidropiridin bileşimindeki piridin türevlerinin UV ışığında bozunmasını önlemek için cam amberde saklamışlardır. Her bir örnek, organik çözücü ile ekstraksiyonundan önce bir iç standart karışımı ile karıştırılıp, analizi UV detektör kullanarak YBSK'de yapmışlardır. Hareketli faz olarak asetonyitril ve su (57/43, h/h) kullanılmıştır. Akış hızı $1 \text{ mL} \cdot \text{dk}^{-1}$, deteksiyon dalga boyu 238 nm olarak belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrisi 5 ve $320 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ arasında gerçekleştirilmiş ve saptama sınırı $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak *i.v.* ve oral yolla yapılan nimodipin uygulamalarıyla plazmada adenosin seviyelerinde önemli istatistiksel artışların meydana geldiği gözlenmiştir. Böylece ilaç uygulamasında doz ve izlenecek yol ortaya çıkarılmıştır. Özellikle *i.v.* uygulama sonucu %67.8 artış gözlenmiş ve sırasıyla 30 mg, 60 mg ve 90 mg nimodipin uygulamasında %28.9, %43.6 ve %60.2 artışlar gözlenmiştir.

i.v. uygulamadan sonra nimodipinin farmakokinetik parametreleri izlenmiş, pik konsantrasyonu (C_{max}), $319.6 \pm 38.9 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ilk örnekleme zamanı; eğri altındaki alan (AUC), $239 \pm 25 \text{ ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$; ve yarılanma ömrü, 3.12 ± 0.97 saat olarak bulunmuştur.

Oral yolla yapılan uygulamadan sonra, doz sırası ve farmakokinetik parametrelerin takip ettiği uygulamada ilaç kinetiklerinin doğrusal olduğu belirtilmiştir: C_{max} (30 mg), $46.1 \pm 5.8 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; C_{max} (60 mg), $81.7 \pm 14.6 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; C_{max} (90 mg), $131.6 \pm 16.3 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; AUC (30 mg), $119 \pm 25 \text{ ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$; AUC (60 mg), $256 \pm 48 \text{ ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$; ve AUC (90 mg), $389 \pm 54 \text{ ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Yarılanma ömrününün *i.v.* uygulama sonucu gözlenen değerlerle benzer olduğu görülmüş, biyoyararlanımın %2 ve %5.9 arasında olduğu vurgulanmıştır.

Bu çalışmalarında nimodipinin farmakokinetiği ve beyindeki iskemiası ile hastalarda plazmadaki adenosin seviyelerine etkisini dikkatle incelemişlerdir.

Ma ve ark. (2007) nimodipinin iç standart olarak kullanıldığı çalışmada insan plazmasında amlodipinin tayini ve farmakokinetik çalışması için yeni, özel, hassas ultra performanslı sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (UPLC-MS/MS) yöntemi geliştirmişlerdir.

Analizde $0.35 \text{ mL} \cdot \text{dk}^{-1}$ akış hızıyla gradient ayırma ile ACQUITY UPLC (TM) BEH C Is kolon ($50 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}$, i.d., $1.7 \mu\text{m}$) ve hareketli faz olarak gradient koşullar altında (her ikisinde $\%0.3$ formik asid içermektedir) su ve asetonitril kullanmışlardır.

Saptaması turbo iyon sprej iyonlaştırma (ESI) aracılığıyla birçok reaksiyon izlenmesi koşuluyla üçlü-kuadropol kütle spektrometrede yapmışlardır.

Tayin sınırının $0.15 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ den daha düşük olduğu bildirilmektedir, 0.15 - $16.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ aralığındaki konsantrasyonda doğrusal kalibrasyon eğrileri elde etmişlerdir.

Güniçi ve günlerarası ölçümlerde relative standart sapma değerlerini $\%15$ 'in altında ve doğruluk değerlerini $\%-2.3$ ile $\%6.9$ olarak bulmuşlardır.

Metodda sağlıklı gönüllülerde belirtilen oral uygulamayla amlodipin'in klinik farmakokinetik çalışmalarını destek olarak kullanmışlardır.

Yang ve ark. (2004) ikili-elektrot ve ikili-kanal elektrokimyasal detektör sistemine bağlı micellar elektrokinetik kromatografi (MECK) yöntemiyle dört kalsiyum kanal blokörünün (nifedipine, nitrendipine, nimodipine ve nicardipine) eşzamanlı olarak belirlenmesi için yeni bir yöntem geliştirmişlerdir.

Bu sistemde, iki çalışma elektrodu ve iki amperometrik detektörle çalışmışlardır. Yükseltgeyici ve indirgeyici deteksiyon potansiyellerini sırasıyla 1.0 V ve -1.0 V (vs. SCE) olarak ayarlayıp 4 kalsiyum kanal blokörünün yükseltgeme ve indirgemelerini belirlemişlerdir.

Çalışma elektrodu, deteksiyon potansiyeli, tampon, sodyum dodesil sülfat (SDS) ve asetonitril konsantrasyonu etkilerini ayırma işleminde ayrıntılı olarak incelemişlerdir.

Sonuçta $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ sodyum borat-borik asit tamponu (pH 8.6) ve $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ sulandırılmış SDS: asetonitril (85:15) ile etkili, hızlı ve çok yönlü elektroforetik koşullar elde etmişlerdir. Metodu tatmin edici sonuçlar ile insan plazması örneğinde dört bileşimin ayrılması ve saptanmasında uygulamışlardır.

Qiu ve ark. (2004) insan plazmasındaki nimodipin miktarını belirlemek için hassas ve seçici sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi (LC-MS-MS) yöntemini geliştirmişlerdir.

İç standart olarak nitrendipinin kullanıldığı plazma örneklerindeki nimodipinin analizine dayalı bir kromatografik yöntem geliştirmişlerdir. Hareketli faz olarak metanol:su:formik asit (80:20:1, h/h/h) kullanılmıştır.

Deteksiyonu atmosferik basınçta kimyasal iyonlaşma (APCI) kaynağı aracılığıyla seçimli reaksiyon izlenmesi modunda üçlü kuadropol kütle spektrometrede yapmışlardır. Metodun tayin sınırı $0.24 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ olarak bildirilmektedir. Doğrusal kalibrasyon eğrileri 0.24 - $80 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ konsantrasyon aralığında elde edilmiştir. Güniçi ve günlerarası doğrulukları ilgili standart sapmaya (R.S.D) oranla $\%4.4$ den daha az, ve kesinlik ilgili hataya (R.E.) oranla sırasıyla $\% 0.0$ ile $\%5.8$ olarak bulmuşlardır. Bu yöntem 18 sağlıklı gönüllüye nimodipin tabletlerini uygulayarak farmakokinetik profillerin değerlendirilmesini incelemişlerdir.

Miglioranca ve ark. (2005) nimodipinin iç standart olarak kullanıldığı sıvı kromatografisine bağlı kütle spektrometresiyle insan plazmasında felodipinin belirlenmesi ve tayini için hızlı, hassas, güçlü ve özel bir metod geliştirmişlerdir.

0.5 mL akış hızında hareketli faz olarak dietileter:hekzan (80:20, h/h) kullanarak insan plazmasında sıvı/sıvı prosedürü uygulamışlardır.

Yöntem C₁₈ analitik kolon (100mm x 4.6mm i.d.) kullanarak 5 dakikalık kromatografik akışı içermektedir ve kalibrasyon eğrisi sırasıyla 0.02-10 ng.mL⁻¹ aralığında olup regresyon katsayısı r=0.9940 olarak bulmuşlardır.

Belal ve ark. (2003) insan idrarında ve farmasötik preparatlarda nimodipinin tayini için basit, duyarlı ve seçici bir spektrofotometrik metod geliştirmişlerdir.

Yöntem nimodipinin Zn/HCl ile indirgenmesi temeline dayanmaktadır. Floresans detektör ile 425 nm'de uyarımdan sonra 360 nm'de ölçümler yapılmıştır. Beta-sikloklekstrin (betaCD), karboksimetilselüloz (CMC), SDS ve Triton X-100 gibi bazı yüzey aktif maddelerinin floresans etkisini araştırmışlardır.

Floresans yoğunluk-konsantrasyon grafiğinde doğru üzerinde sırasıyla 0.1-5.0 µg.mL⁻¹ olarak Triton X-100' ü minimum saptama sınırı 0.06 µg.mL⁻¹ (1.62x10⁻⁷ M) olarak bulmuşlardır.

Önerdikleri yöntemde ticari tabletlerdeki nimodipinin yüzde geri kazanımının çalışması yapılmıştır. Yöntemde insan idrar örneklerinde nimodipinin vitro olarak belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. Yüzde geri kazanımı 102.1±2.54 (n=4)dür.

Canlica ve Islımyeli (2005) tablet formüllerinde nimodipinin analizi için basit bir atomik absorpsiyon spektrofotometrik (AAS) metodu kullanmışlardır.

Yöntemin geri akış altında 1 saatte CO₂ atmosfer altında ortalama 0.05N HCl kadmiyum metali ile kaynaması sonucunda bir aromatik nitro grubu içeren antihipertansif ilaç maddelerinin indirgenmesi temeline dayandırıldığı belirtilmektedir.

Elde edilen sonuçlar spektrofotometrik yöntemle karşılaştırılmıştır.

Nimodipin miktarı serbest haldeki Cd⁺² atomik absorpsiyonlarının belirlenmesiyle hesaplanmıştır. Kalibrasyon grafikleri absorpsiyonla Cd⁺² konsantrasyonları arasında çizilmiştir. Nimodipin için sırasıyla 0.242 ile 1.209 µg.cm⁻³ bulmuşlardır.

Geliştirdikleri iki yöntemi ticari tablet formüllerindeki nimodipinin tayini için uygulamışlardır. İstatistiksel karşılaştırma sonuçları, her iki yöntemin uyumlu olduğunu göstermiştir. Yöntemin basit, ucuz, ve kolay yapılmasından dolayı üstünlüğe sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Zhao ve ark. (2004) nimodipinin tayini için akış enjeksiyonlu kemiluminesans metodunu kullanmışlardır.

Yaptıkları çalışmanın seryum(IV) ve sülfid reaksiyonu arasında bir kemiluminesans inhibisyonuna dayanan bir yöntem olduğu bildirilmektedir. Kemiluminesans yoğunluğunun nimodipin konsantrasyonu ile orantılı olduğunu, 0.5-10 mg.L⁻¹ konsantrasyon aralığında korelasyon katsayısının 0.9990, 10-90 mg.L⁻¹ aralığında ise 0.9968 olarak elde edilmiştir. Geri kazanımın %98.3-103.2 arasında olduğu, tayin sınırının 0.085 mg.L⁻¹, standart sapmanın ise %1.8 olarak elde edildiği belirtilmektedir.

Reddy ve Reddy (2004) nimodipin ve nifedipinin belirlenmesi için karbon-pasta elektrot (CPE) ve modifiye karbon-pasta elektrot (CMCPE) ilaçların bir aromatik nitro grubunun indirgenmesi temeline dayanır. Basit, hızlı ve seçimli *differential pulse adsorptive stripping voltametri* (DPAdSV) metodunu geliştirmişlerdir.

Geliştirdikleri bu metodla en yüksek hassaslığı veren CMCPE'yi CPE ile karşılaştırmışlardır. Reaksiyon oluşumuna elektrot etkisini biriktirme zamanı, biriktirme potansiyeli, destekleyici elektrot ve pH gibi analitik parametreleri incelemişlerdir.

Nifedipin ve nimodipin için CMCPE kullanıldığında doğrusal ve sırasıyla 4.6×10^{-10} - 2×10^{-7} M ve 5.4×10^{-10} - 4×10^{-7} M konsantrasyon aralığında son derece iyi kalibrasyon denklemleri elde edilmiştir. Tayin deteksiyon sınırı (LOD) sırasıyla 3.9×10^{-10} ve 4.8×10^{-10} M ve ilişkili katsayı 0.9996 ve 0.9998 olarak bulunmuştur.

Yöntemin tablet dozaj formları, idrar ve serum örneklerinde nimodipin ve nifedipinin doğrudan doğruya belirlenmesi için başarıyla uygulandığı belirtilmektedir.

Yagnesh ve ark. (1998) oral yolla uygulanan hipertansiyon ilaçlarının [atenolol, amlodipin, nifedipin, nitrendipin, nimodipin ve felodipin] eş zamanlı olarak analizi için YBSK sisteminde isokratik bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada hipertansiyon tedavisinde belirtilmiş olan bir ariloksipropanolamin β -blokörü olan atenolol, diğer 5 dihidropiridin kalsiyum kanal blokörlerinin herhangi biri ile uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

Bu ilaçlar metanolde çözülmüş ve 20 μ L'lik ilaçların karışımı yapılarak 5 μ 'luk ters-fazlı JASCO-metaphase ODS (250 x 4.0 mm) kolona enjekte edilmiştir. İlaçların kararlı bir şekilde birbirinden ayrılabilmesi; pH'ı 4.5 olan eş hacimli asetonitril-0.01M KH_2PO_4 hareketli fazı kullanılmıştır. pH ayarlaması H_3PO_4 ile yapılmıştır (akış hızı 1.5 mL.dk⁻¹). Deteksiyon 250 nm'de yapılmıştır.

Detektör cevabı (pik yükseklik oranı), ilaçların 25-3200 ng.mL⁻¹ aralığında doğrusal olarak gözlenmiştir.

İstatistiksel değerlendirmenin tümü doğrusal regresyon analiziyle yapılmıştır.

Önerilen prosedürün üstünlüğü, 5 dihidropiridin türevinin yalnızca veya atenolol ile tayin edilebilir olmasıdır.

Martinez ve ark. (1999) 1,4-dihidropiridin kalsiyum antagonisti olan nifedipin, nimodipin, felodipin, nicardipin hidroklorid, lacidipin ve amlodipin besilatı ayırmak için miseller elektrokinetik kromatografik (MECK) yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada tampon etkileri (konsantrasyon ve pH), SDS konsantrasyonu, organik modifier, enjeksiyon zamanı ve voltaj çalışması yapılmıştır.

Sonuçta en uygun ayırmayı sağlamak için kararlılık ve göç zamanı ile ilgili olarak, uygun elektrolitin 50 mM borat tampon, pH 8.2, 20 mM SDS ve %15 asetonitril (h/h) olduğu bulunmuştur. Numuneler 4 s'de 50 mbar enjeksiyon basıncı ve +25 kV voltaj uygulamasıyla hidrostatiksel olarak ortaya çıkarılmıştır. 6 bileşik 15 dakikadan daha az sürede gözlenmiştir: nifedipin (göç zamanı; $t_m=6.9$ dk.), nimodipin ($t_m=10.1$ dk.), felodipin ($t_m=12.2$ dk.), nicardipin hidroklorid ($t_m=12.7$ dk.), lacidipin ($t_m=13.5$ dk.) ve amlodipin ($t_m=14.1$ dk., besilat $t_m=8$ dk.).

Yöntem 70 μ g.mL⁻¹ tam doğrusallıkta her bir bileşim için tayin sınırı aşağı yukarı 5 μ g.mL⁻¹ ile gelişmişlik göstermiştir. Günlük ve günlerarası geri kazanım 6 örnek için sırasıyla %4.8 ve %8.6'den daha düşüktür.

Lopez ve ark. (2000) insan plazmasında 1,4-dihidropiridinlerin (nifedipin, nimodipin, nisoldipin, nicardipin, felodipin ve lacidipin) belirlenmesinde amperometrik deteksiyon ile YBSK yöntemini geliştirmişlerdir.

Bu kromatografik ayırmada Supelcosil LC-ABZ+Plus C₁₈ kolon kullanılmıştır. Hareketli faz metanol-su (70:30), 1 mL.dk⁻¹ akış hızında 2 mM CH₃COOH-CH₃COONa ve pH 5.0 ile çalışma yapılmıştır. En uygun sıcaklık 30±0.2 °C olarak belirlenmiştir. Kullanılan amperometrik detektör, cam karbon elektrot ile donatılmış ve akış şekli doğrudan doğruya Ag/AgCl'ye karşı 1000 mV olarak ayarlanmıştır.

Yöntem, bileşiklerin konsantrasyonlarına kararlılıkla uygulanmış, günüçi geri kazanımları standart sapmaya göre %5'den daha az ve tayin sınırları 16-44 ng.mL⁻¹ olarak elde edilmiştir. Plazma örneklerinde 1,4-dihidropiridinlerin hepsi 18 dakikadan daha az alıkonma zamanıyla elde edilmiştir. Nimodipin ve felodipin için sırasıyla %91 ve %88'lik en iyi geri kazanım elde edilmiştir. Bu geri kazanımlarla birlikte insan plazmasında uygulanan bu ilaçların analizi deteksiyon sınırlarının düşük çıkması yöntemim başarısı olarak kabul edilmiştir.

Oh ve ark. (2003) insan plazmasında nitrendipini belirlemek için ultraviolet deteksiyon ve katı-faz ekstraksiyon (SPE) kullanılarak YBSK yöntemini geliştirmişlerdir. Nimodipin bu çalışmada iç standart olarak kullanılmıştır.

Çalışmada gaz kromatografisi ile kütle spektrometrik deteksiyonun yada elektron yakılma detektörünün çok yüksek duyarlılık ve belirlilik gösterdiği vurgulanmaktadır. Fakat numunenin termal bozunmasına neden olabilecek koşullardan dolayı kullanışlı olmadığı belirtilmektedir. LC-MS metodu duyarlılık, belirlilik ve tutarlılıktan dolayı en iyi seçim olarak dikkate alınabilirdi ancak pek çok laboratuarda ekonomik nedenlerden dolayı LC-MS mevcut olmayabileceği göz önünde bulundurulduğundan bu metotta düşünülmemiştir. Detektör seçiminde ise ilk olarak elektrokimyasal detektör denenmiş fakat pek çok problemle karşılaşmıştır. Bu nedenle YBSK metodu UV detektörle kullanılmıştır. Bu metodunda farmakokinetik çalışma için yeterli olmayacağı düşünülerek katı-faz ekstraksiyon ve UV deteksiyon kullanılarak YBSK yöntemi geliştirilmiştir.

Bu yöntem nitrendipinin farmakokinetik özellikleri değerlendirildikten sonra 7 sağlıklı gönüllüde başarılı bir şekilde denenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEMLER

Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Aletler

Kullanılan kimyasal maddeler

Standart madde olarak kullanılan nimodipin, Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir. Geliştirilen yöntemin tablet formülasyonlarına uygulanması esnasında Bayer İlaç A.Ş. firması tarafından üretilmiş olan Nimotop® (30 mg) Tablet kullanılmıştır. Deneyler sırasında kullanılan YBSK saflıkta metanol ve bidistile su laboratuvarımızda tümü pyrex camdan yapılmış cihazlarda üretilmiştir.

Kullanılan aletler

Maddenin spektrofotometrik analizi Shimadzu marka UV-2401 PC model çift ışık yollu UV-spektrofotometre ile yapılmıştır. Veriler UVPC Personal Spectroscopy Software Version 3.7 programı ile işlenmiştir.

Tampon çözeltilerin hazırlanması aşamasında, çözeltilerin hedeflenen pH'a ayarlanması sürecinde WTW marka Multiline P4 model pH-metre kullanılmıştır.

Tablet analizleri esnasında çözeltilerin içerdiği çözünmemiş safsızlıkların çöktürülmesi amacıyla Sigma marka 1-6 model santrifüj (Almanya) aleti kullanılmıştır.

AEA için Rheodyne (Cotati) enjeksiyon tablası üzerinde 20 µL'lik halka taşıyan Shimadzu marka LC-6A model pompa kullanılmıştır. Maddeye ait sinyaller Shimadzu marka SPD-10A UV-VIS detektör ile detekte edilmiş ve sonuçlar yine Shimadzu marka C-R7A Chromatopac integratör ile hesaplanmıştır.

Numunelerin ve çözeltilerin hazırlanmasında Heidolph (Almanya) marka Reax Top model vorteks, Bandelin (Almanya) marka RK 100H model ultrasonik banyo, Ohaus marka Explorer E12140 model analitik terazi (İsviçre), InLab 413 NTC model pH elektrodu bağlanmış Mettler Toledo marka Seven-Multi model pH metre (Switzerland) ve 0.2 µm gözenek çapına sahip Orange Scientific (Belçika) marka 13 mm çaplı non-steril PVDF membran filtreler kullanılmıştır.

Nimodipin Çözeltilerinin Stabilitesinin İncelenmesi

2.056×10^{-5} M derişimde hazırlanan nimodipin çözeltisi 3 gün boyunca geliştirilen analiz yöntemiyle analiz edilmiş ve sinyal şiddetlerindeki değişim incelenmiştir. İncelemeler sonucunda nimodipin çözeltilerinin sinyal şiddetlerinde bir değişikliğe rastlanmamıştır. Ancak olası bozunmanın önlenmesi için çözeltiler ağız kapaklı cam balon içersinde $+4^{\circ}\text{C}$ 'de karanlıkta saklanmıştır.

UV-Spektrofotometrik Çalışmalarda Yapılan İşlemler

Stok çözelti

UV-Spektrofotometrik çalışmalar için 21.5 mg standart nimodipin tartılmış ve 50 mL'lik balon jøjeye alınarak metanolde çözülmüştür. Bu çözeltiden 2.5 mL alınıp 25 mL su ile tamamlanmıştır. Böylece stok çözelti 1.03×10^{-4} M olarak hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden hareketle 1.03×10^{-5} - 3.60×10^{-5} M derişim aralığında bir seri çözelti hazırlanmıştır. Gerekli seyreltmeler bidistile su ile yapılarak maddenin UV bölgedeki davranışı incelenmiş ve regresyon analizi yapılmıştır.

UV-Spektrofotometrik koşullar

UV-Spektrofotometrik ölçümlerde maddenin maksimum absorbans verdiği dalga boyunu belirleyebilmek amacıyla 200-400 nm dalga boyu aralığında, 0.1 nm duyarlılıkta absorpsiyon taraması yapılmıştır. Tarama sonunda nimodipinin 238 nm dalga boyunda maksimum absorbans verdiği belirlenmiş ve ölçümler bu dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. İncelemeler sonucunda nimodipinin 1.03×10^{-5} - 3.60×10^{-5} M aralığındaki bölgede doğrusal sinyaller verdiği gözlenmiş ve bu bölgedeki molar absortivite katsayısı 27162 olarak hesaplanmıştır. Yapılan lineer regresyon analizinde kalibrasyon denklemi $A=27162.18C(M)+0.03139$ olarak hesaplanmıştır. Regresyon katsayısı $r=0.9998$ olarak bulunmuştur.

Akış Enjeksiyon Analizi ile Yapılan Çalışmalardaki İşlemler

Stok çözelti

21.5 mg nimodipin 100 mL'lik balon jojeye alınarak metanolde çözülmüştür. Gerekli seyreltmeler bu stoktan %50 metanol çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Nimodipin'in AEA ile yapılan çalışmalarında en uygun analiz koşullarının belirlenebilmesi için kullanılan nimodipin çözeltisi, başlangıçtaki stok çözeltinin seyreltilmesi ile elde edilen 2.06×10^{-5} M derişimdeki çözelti ile yapılmıştır.

Hareketli faz ve tampon sistemi

Nimodipin'in AEA yöntemiyle analizi süresince kullanılacak analitik ve aletsel parametrelerin belirlenebilmesi amacıyla bir dizi inceleme yapılmıştır. Bu aşamada kullanılmak üzere 2.06×10^{-5} M derişime sahip nimodipin çözeltisi hazırlanmış ve deneyler bu çözelti kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Nimodipin'in AEA yöntemiyle analizi sırasında kullanılacak hareketli fazın belirlenebilmesi amacıyla yapılan çalışmalarda % 10 - %50 oranında metanol içeren metanol – su sistemleri denenmiş ve %50'luk metanol çözeltisinin en uygun taşıyıcı olduğuna karar verilmiştir.

AEA sisteminde bir diğer parametre olan akış hızının belirlenebilmesi için 0.1-2.0 mL.dk⁻¹ aralığındaki akış hızlarında seri enjeksiyonlar yapılmış ve pik alanı-akış hızı, pik yüksekliği-akış hızı ilişkileri incelenmiştir. İncelemeler sonucunda 1.2-1.6 mL.dk⁻¹ bölgesinde akış hızına bağlı doğrusallık gözlenmiş ve çalışmanın kalan kısmında 1.4 mL.dk⁻¹ akış hızının kullanılmasına karar verilmiştir.

Nimodipin'in en kararlı olduğu tampon sistemini ve pH bölgesini saptamak amacıyla pH 1.0-12.0 aralığında asetat ve fosfat tamponları hazırlanmış ve bu tamponlar enjeksiyon anında 0.1 M derişimde tamponlama sağlayacak şekilde analit çözeltilerine ayrı ayrı ilave edilmiştir. Enjeksiyonlar sonrası elde edilen verilerden nimodipine ait pik alanı-pH, pik yüksekliği-pH grafikleri çizilmiş ve pik morfolojileri incelenmiştir. Değerlendirmeler sonucunda nimodipinin AEA ile analizi için en uygun tampon ve pH sisteminin 0.1 M pH 2.0 asetat tamponu olduğuna karar verilmiştir.

Tablet Örneklerinin Hazırlanışı

Nimodipin'in tayini için kullanılan farmasötik preparatı, Bayer İlaç A.Ş. firmasının üretimi olan Nimotop® adlı tablettir. 30 mg nimodipin içeren tablet formu lokal eczanelerden temin edilerek kullanılmıştır.

Tablet numunelerinin hazırlanması için, 30 mg nimodipin içeren 10 tablet ağırlığı tam olarak tartıldıktan sonra tabletler havanda toz haline getirilmiş ve ağız sıkı şekilde kapanan ve ışık geçirmeyen bir kaba konulmuştur.

Bir tabletin ortalama ağırlığı hesaplanarak, bu ağırlığa karşılık gelen miktar tam tartıldıktan sonra 50 mL %50 metanol içinde çözülmüş ve ağız kapalı bir kaptaki 30 dakika ultrasonik banyoda bekletildikten sonra 5500 rpm devirde (3000 x g) santrifüj edilerek analize hazır numune haline getirilmiştir. Gerekli seyreltme işlemleri ölçüm sırasındaki metanol oranı %50 olacak şekilde yapılmıştır.

AEA ve UV-spektrofotometri yöntemleri ile yapılan ölçümlerde, tablet numunesi çözeltisinin çalışılan kalibrasyon aralığındaki uygun derişimi stok çözeltiden seyreltilerek hazırlandıktan sonra 238 nm'de yanıt sinyalleri ve absorbans değerleri ölçülmüştür. Elde edilen veriler, kalibrasyon eşitliklerinde çözüldükten sonra tablet içindeki nimodipin miktarı ve % nimodipin içeriği hesaplanmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

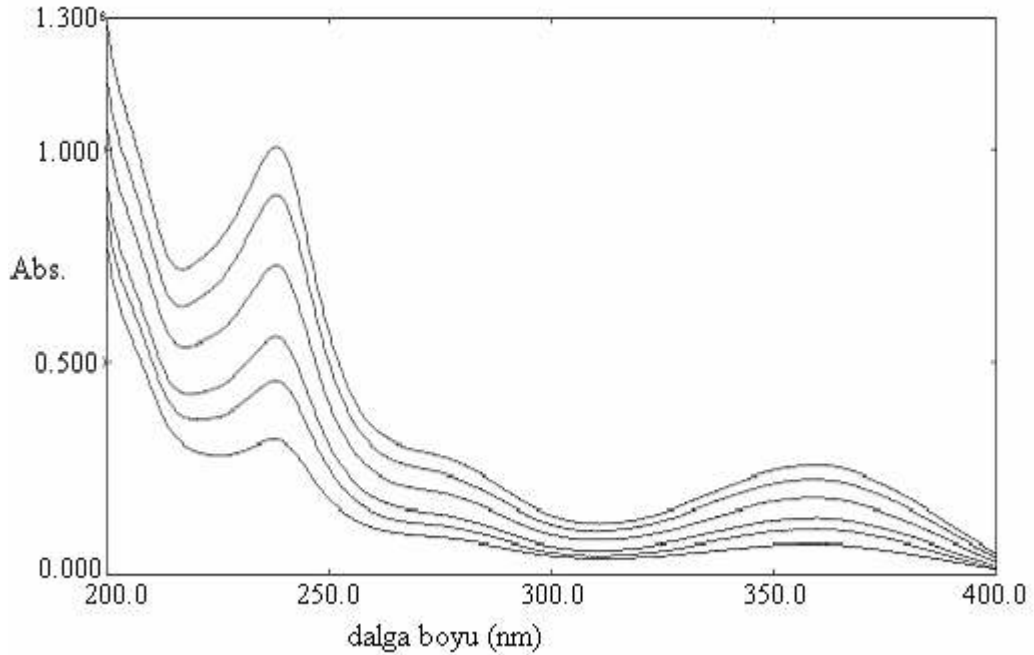
Sürekli Akış Enjeksiyon Analizi Optimizasyonu

AEA için yöntem geliştirme aşamasında bir seri parametre incelenmiştir. Bunlar; maddenin maksimum absorbans verdiği dalga boyunun belirlenmesi, seyreltme işleminin hangi çözelti ile gerçekleştirileceği, uygun pik sinyallerinin elde edilebileceği akış hızı değerinin belirlenmesi ve pH'nın pik alanına olan etkisinin araştırılmasıdır.

Başlıca parametre olarak seyreltmenin hangi çözelti ve oranda yapılacağı belirlenmiştir. Yapılan incelemelerde maddenin lipofilik yapısından kaynaklı olarak %40 metanolden daha düşük oranda metanol içeren çözücü sistemlerinde çözünmediği belirlenmiştir. Analizlerde pH etkilerinin incelenmesi esnasında oluşabilecek olası çökme işleminin önüne geçmek amacıyla çözücü sistemi olarak %50 metanol kullanılmasına karar verilmiştir. Daha az organik çözücü harcanması ve daha ekonomik koşullar göz önüne alınarak, nimodipin ölçümlerindeki seyreltme işlemlerinde %50 metanol çözeltisi seçilmiş ve deneyler süresince tüm seyreltme işlemleri %50 metanol içeriğiyle gerçekleştirilmiştir. AEA deneyleri içinde, ifade edilen uygunluk gerçeklerinden dolayı sürükleyici çözücü olarak %50 metanol seçilmiştir.

Bu çalışmada AEA sinyallerini belirlemek amacıyla UV detektör kullanıldığından bu alandaki çalışılacak dalga boyunu belirlemek için UV-spektrofotometrisi kullanılmıştır.

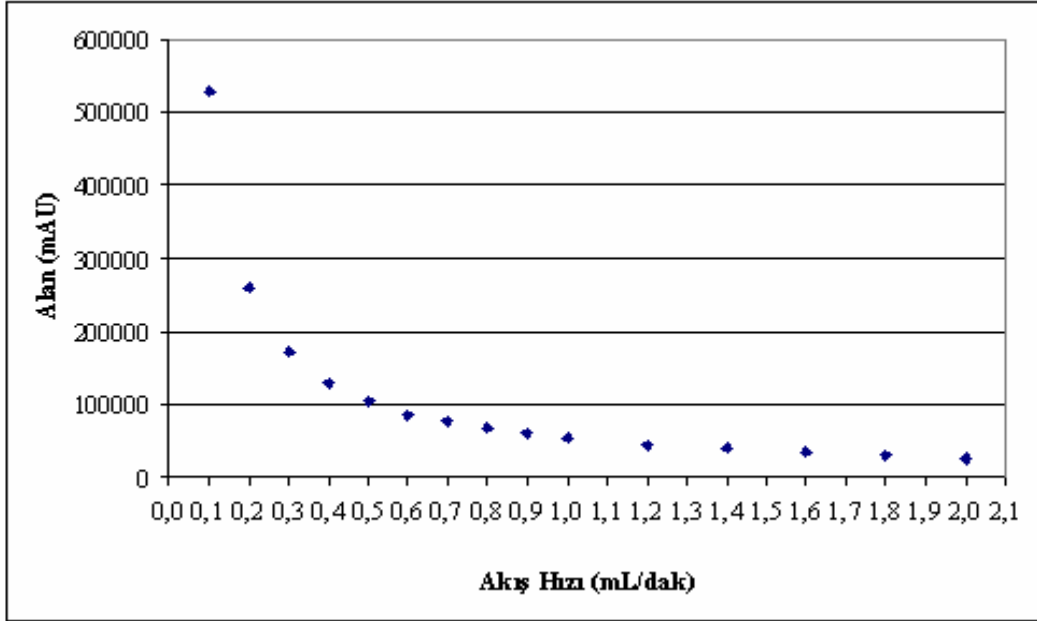
Bu amaçla %50 metanol çözelti içinde çözülmüş olan madde, yine aynı çözeltinin kör olarak kullanıldığı UV-spektrofotometrisi yöntemiyle incelenmiştir. Bu analizde 1.03×10^{-5} - 3.60×10^{-5} M derişim aralığındaki nimodipin çözeltisinin absorbans değerleri 200-400 nm dalga boyu aralığında kaydedilmiştir. Elde edilen UV spektrumu Şekil 2'de verilmektedir.



Şekil 2. %50 Metanol İçerisindeki 1.03×10^{-5} - 3.60×10^{-5} M Derişim Aralığındaki NIM Çözeltisinin 200-400 nm Aralığındaki UV-Spektrumu

Spektrumdan da görüldüğü üzere nimodipinin en yüksek absorbanası 238 nm’de verdiği gözlenmiş ve AEA analizlerinde kullanılacak dalga boyu 238 nm olarak seçilmiştir.

AEA’da en uygun pik sinyallerinin elde edildiği akış hızının belirlenmesi, optimizasyonda önemli olan bir başka parametredir. Nimodipin pik sinyallerine akış hızının etkisi, 0.1-2.0 mL.dk⁻¹ akış hızı aralığında incelenmiştir. Bu akış hızı aralığında elde edilen pik alanı değerleri Şekil 3’de verilmektedir.

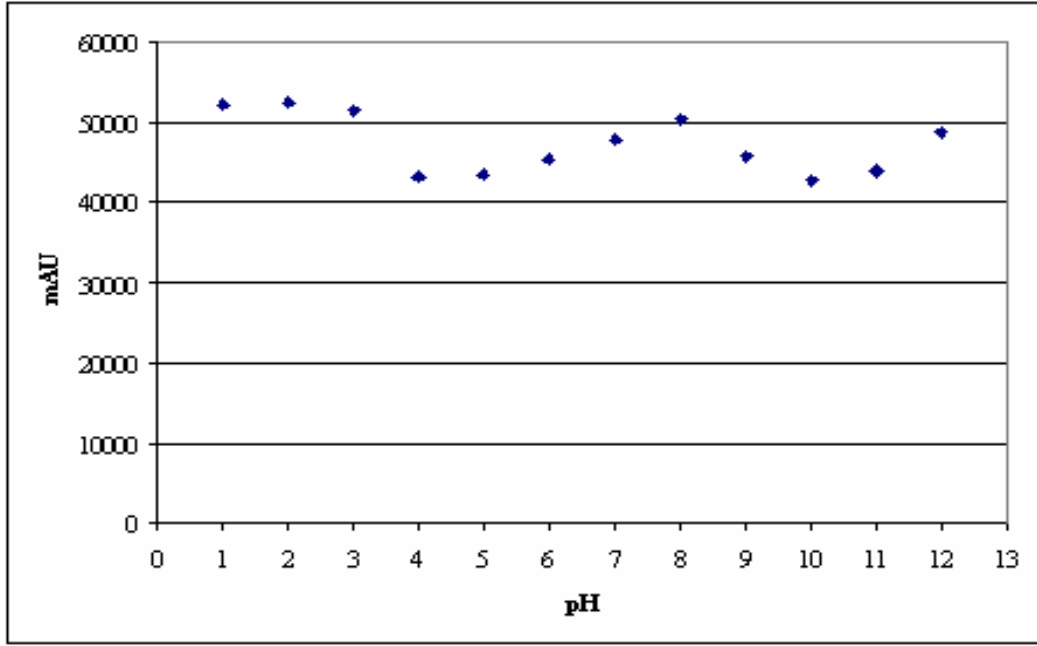


Şekil 3. Akış Hızının NIM Pik Alanlarına Etkisi (1.03×10^{-5} M)

Akış hızındaki artışla pik alanının azaldığı görülmektedir (Şekil 3).

Akış hızının belirlenmesinde elde edilen sonuçlara göre, kantitatif tayine olanak sağlayacak uygun akış hızı değerinin 1.4 mL.dk⁻¹ olduğu saptanmış ve çalışmanın deneysel kısmının devamında bu akış hızı değeri kullanılmıştır.

Optimizasyon işleminde incelenen bir başka parametrede pH’ın pik alanına olan etkisidir. Bu etkinin incelenmesinde asetat tamponu ve fosfat tamponu taşıyıcı çözelti olarak kullanılarak %50 metanol içerecek şekilde hazırlanan 1.03×10^{-5} M nimodipin çözeltisinin 1.4 mL.dk⁻¹ akış hızında ve 238 nm dalga boyundaki pik sinyalleri alınmıştır.



Şekil 4. pH'nın NIM Pik Alanlarına Etkisi

pH'ın pik alanlarına olan etkisinin incelenmesi sonucunda, yukarıdaki şekilde de görüldüğü gibi pH'ın 1, 2 ve 3 değerlerinde alan farkının çok az olması nedeniyle en uygun pH değerinin 2 olduğu sonucuna varılmıştır. Bu nedenle deneysel kısımda pH=2 kullanılmıştır.

AEA'nın optimizasyonu için yapılan çalışmalar sonucunda, 1.4 mL.dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu ve %50 metanol çözücü sisteminin kantitatif analiz için en uygun koşullar olduğu belirlenmiştir. Bu koşullar altında validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Sürekli Akış Enjeksiyon Analizi Yönteminin Validasyonu

Sürekli akış enjeksiyon analizinin kesinliği

AEA yönteminin kesinliğinin incelenmesi amacıyla derişimindeki çözelti ardışık 3 gün süre boyunca analiz edilmiştir.

Yöntemin tekraredilebilirliğini ölçmek amacıyla 3 ayrı gün 2.06x10⁻⁵ M derişimdeki nimodipin çözeltisi AEA sistemine enjekte edilmiş ve elde edilen sinyaller istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler **Çizelge 1**'de verilmektedir.

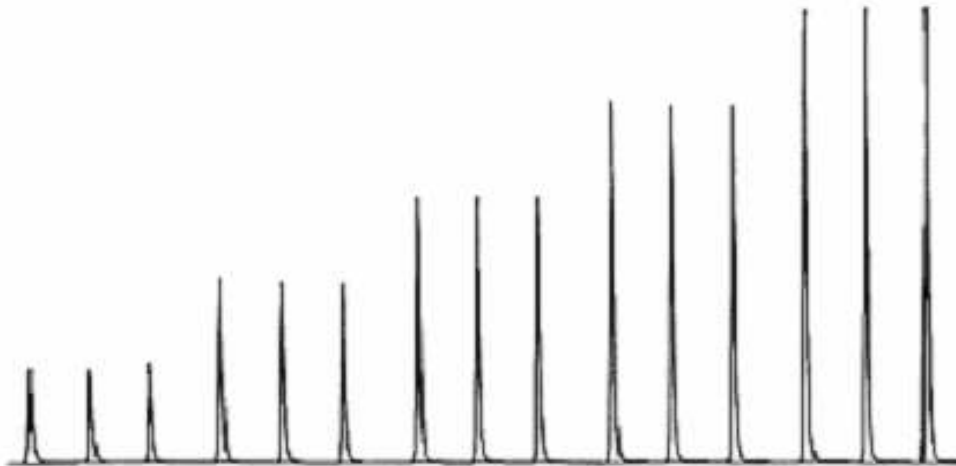
Çizelge 1. Sürekli Akış Enjeksiyon Yönteminin Güniçi ve Günlerarası Tekraredilebilirlik Sonuçları

2.06 x 10 ⁻⁵ M nimodipin	Gün İçi Ortalama Kesinlik			Günlerarası Kesinlik (n=24)
	I gün (n=8)	II gün (n=8)	III gün (n=8)	
Ortalama Pik Alanı	301276	302115	303290	302227
Standart Sapma	4830	4463	4453	4462
% Bağıl Std. Sapma	1.60	1.48	1.47	1.48
Standart Hata	1708	1578	1574	910.7
Güven Aralığı ($\alpha=0.05$)	± 4038	± 3731	± 3723	± 1884

Sürekli akış enjeksiyon analizinin doğrusallığı

Nimodipin'in 1.03x10⁻⁵ - 3.08x10⁻⁵ M derişim aralığında 5 ayrı çözeltisi ve yöntemin doğrusallığını incelemek amacıyla, sürekli akış enjeksiyon sistemine enjekte edilmiştir. Güniçi ve günlerarası tekraredilebilirliği göstermek için 3 gün boyunca belirtilen konsantrasyon aralığında üç ayrı set çözelti hazırlanarak sistemde pik sinyalleri kaydedilmiştir.

AEA ile analiz edilen çözeltilerin derişim-sinyal ilişkisi **Şekil 5'**de verilmiştir.



Şekil 5. NIM'in 1.03x10⁻⁵ - 3.08x10⁻⁵ M Derişimler Arasındaki Çözeltilerinin Optimum Koşullarda Elde Edilen Sinyalleri

Elde edilen veriler **Çizelge 2'**de verilmektedir.

Çizelge 2. NIM'in 1.03×10^{-5} - 3.08×10^{-5} M Derişim Aralığındaki Çözeltilerinin Optimum Koşullarda Elde Edilen Sinyallerinin Doğrusallığı

	Güniçi			Günlerarası
	I gün (n=5)	II gün (n=5)	III gün (n=5)	Tümgünler (n=15)
Eğim, a	$1,64 \times 10^9$	$1,61 \times 10^9$	$1,53 \times 10^9$	$1,59 \times 10^9$
Kesim, b	17610	18640	20726.93	18991.45
Korelasyon Katsayısı, r	0.998	0.999	0.999	0.998
Regresyon denkleminin standart sapması, Sr	923.9	837.7	463.9	535.1
Eğimin % bağıl standart sapması, Se	$4,24 \times 10^7$	$3,85 \times 10^7$	$2,13 \times 10^7$	$2,46 \times 10^7$
Güven aralığı (p<0.05)	$\pm 1,35 \times 10^{+8}$	$\pm 1,23 \times 10^{+8}$	$\pm 0,68 \times 10^{+8}$	$\pm 0,53 \times 10^{+8}$

Nimodipin derişimi ve pik alanı yanıtı arasındaki doğrusal ilişkiyi incelemek amacıyla yapılan istatistiksel hesaplamalarda, nimodipinin tabletlerdeki miktar tayinine uygun olacak şekilde, yüksek korelasyon katsayısına sahip, kesim değeri sıfıra yakın doğrusal eşitlikler elde edilmiştir.

Sürekli akış enjeksiyon analizinin saptama ve tayin sınırı

Yöntemin saptama sınırı (LOD) ve tayin alt sınırı (LOQ), ICH uygulamalarına uygun olarak kalibrasyon eşitliğinin eğimi ve kesim değerinin standart sapması kullanılarak hesaplanmıştır. Kesimin standart sapmasının eğime oranının kullanıldığı hesaplamalarda elde edilen oran değeri saptama sınırı için 3.3, tayin sınırı için ise 10 ile çarpılmıştır. Hesaplama kullanılan istatistiksel veriler doğrusallığın günler arası çalışmalarından elde edilmiştir. Bu yolla hesaplanan LOD ve LOQ değerleri **Çizelge 3'**de verilmiştir.

Çizelge 3. Yöntemin Saptama Sınırı ve Tayin Alt Sınırı Değerleri

	1.set (n=5)	2.set (n=5)	3.set (n=5)	Ortalama(n=15)
Aralık (M)	1.03x10 ⁻⁵ - 3.08x10 ⁻⁵			
Kesim SS	± 923.9	± 837.7	± 463.9	± 535.1
Eğim	1,64x10 ⁹	1,61x10 ⁹	1,53x10 ⁹	1,59x10 ⁹
LOD (M)	1.85x10 ⁻⁶	1.71x10 ⁻⁶	1.00x10 ⁻⁶	1.11x10 ⁻⁶
LOQ (M)	5.62x10 ⁻⁶	5.19x10 ⁻⁶	3.04x10 ⁻⁶	3.36x10 ⁻⁶

LOD: Limit of detection (Saptama sınırı); LOQ: Limit of quantitation (Tayin alt sınırı)

Sürekli akış enjeksiyon analizinin tabletlere uygulanması

AEA yönteminin uygulaması, hazırlanan 30 mg nimodipin içerdiği bilinen farmasötik tablet örneklerinde miktar tayini yapılarak gösterilmiştir. Tablet örneklerinin analizi deneysel bölümde anlatıldığı şekilde hazırlanarak optimum koşullarda yapılmıştır. Analiz bitiminde elde edilen sonuçlar, doğrusallık bölümünde açıklanan günlerarası eşitlikte yerine koyularak nimodipin içeren tabletlerdeki miktarlar ve yüzdeleri hesaplanmıştır. Tablet bileşenlerinden kaynaklanan ve ölçümleri etkileyecek düzeyde girişim gözlenmemiştir.

USP XXIV (2000)'de, birim etkin madde içeriği için sağlanması gereken koşullar bildirilmektedir. Farmakopeye göre, 10 adet tablet ölçümü yapılmasının altından etken madde içeriğinin %85-115 aralığında bulunması ve ölçümün % bağıl standart sapma değerinin ise % 6'dan az veya eşit olması gereklidir. Geliştirilen yöntemle yapılan ölçümlerde Nimotop[®] tablet içeriği farmakopenin gerektirdiği aralıkta bulunmuştur. Ölçümlerin % bağıl standart sapma değeri % 6'dan azdır.

Çizelge 4. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizi ile NİM'in Farmasötik Tabletlerindeki Miktar Tayini Sonuçları

Deney No	NİM (mg)	% NİM
1	30.24	100.8
2	29.16	97.2
3	29.82	99.4
4	29.73	99.1
5	29.43	98.1
6	29.91	99.7
7	30.12	100.4
8	30.06	100.2
Ortalama	29.81	99.36
Standart Sapma	0.364	1.213
% Bağıl Standart Sapma	1.22	1.22
Güven Aralığı (p=0.05)	± 0.30	± 1.01

Nimodipin'in UV-Spektrofotometrik Yöntemle Analizi

UV-Spektrofotometri yönteminin doğrusallığı

İlaç içerisindeki etken madde tayininde yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri de spektrofotometridir (Altıokka ve Atkoşar, 2001; Altıokka ve ark., 2002). AEA ile yapılan tablet içerisindeki nimodipin tayini sonuçlarının doğrusallığını karşılaştırmak için UV-Spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır.

Spektrofotometrik yöntemle yapılan çalışmalarda nimodipinin %50 metanol ile hazırlanmış olan çözeltisi kullanılmıştır. UV-Spektrofotometrik ölçümlerde maddenin maksimum absorbans verdiği dalga boyunu belirleyebilmek amacıyla 200-400 nm dalga boyu aralığında kuartz küvetler kullanılarak incelenmiştir. Kör olarak %50 metanolün kullanıldığı çalışmada dalga boyu 238 nm olarak belirlenmiştir.

Nimodipin'in 1.03×10^{-5} - 3.60×10^{-5} M derişim aralığında UV-Spektrofotometrik çalışma sonucu elde edilen veriler **Çizelge 5**'de verilmektedir.

Çizelge 5. 1.03×10^{-5} - 3.60×10^{-5} M Derişim Aralığındaki Çözeltilerinin Optimum Koşullarda Elde Edilen Sinyallerinin Doğrusallığı

	Güniçi			Günlerarası
	I gün (n=6)	II gün (n=6)	III gün (n=6)	Tüm günler (n=18)
Eğim, a	26680	27210	27620	27170
Kesim, b	0.042	0.043	0.044	0.043
Korelasyon Katsayısı, r	0.999	0.999	0.999	0.998
Regresyon denkleminin standart sapması, Sr	0.0075	0.0076	0.0078	0.0082
Eğimin % bağıl standart sapması, Se	305.3	311.4	316.1	335.0
Güven aralığı (p<0.05)	± 850	± 860	± 880	± 710

UV-Spektrofotometrik yöntemin Nimodipin içeren tabletlere uygulanması

Nimodipin'in farmasötik tabletlerinde UV-Spektrofotometrik tayini için, tablet numuneleri deneysel bölümde tarif edildiği gibi hazırlanarak 238 nm dalga boyunda incelenmiştir. UV-Spektrofotometrik yöntem ile elde edilen tablet analizi sonuçları, **Çizelge 6**'da sunulmaktadır.

Çizelge 6. UV-Spektrofotometrik Yöntem ile NİM'in Farmasötik Tabletlerindeki Miktar Tayini Sonuçları

Deney No	NİM (mg)	% NİM
1	30.36	101.2
2	29.04	96.8
3	29.76	99.2
4	29.49	98.3
5	29.28	97.6
6	29.82	99.4
7	30.33	101.1
8	30.15	100.5
Ortalama	29.78	99.26
Standart Sapma	0.487	1.623
% Bağlı Standart Sapma	1.64	1.64
Güven Aralığı(p=0.05)	± 0.41	± 1.35

Sürekli Akış Enjeksiyon Analizi ve UV-spektrofotometrisi Tablet Analiz Sonuçlarının Karşılaştırılması

Geliştirilen AEA ile elde edilen tablet analiz sonuçları, standart bir yöntem olan UV-spektrofotometrik yöntem sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Yöntemlerin doğruluğunu karşılaştırmak için t-testi ve kesinliği karşılaştırmak için F-testi kullanılarak, sonuçlar %95 önem düzeyinde istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonuçları **Çizelge 7**'da verilmektedir.

Çizelge 7. Sürekli Akış Enjeksiyon Yöntemi ile UV-spektrofotometrik Yöntemin Karşılaştırması

	AEA	UV-spektrofotometri
Ortalama (n=8)	29.81	29.78
Standart sapma	0.364	0.487
% Bağlı standart sapma	1.22	1.64
t-testi (p<0.05)	0.55	Tablo $t_{0.05}=2.36$
F testi (p<0.05)	0.46	Tablo $F_{0.05}=3.44$

Kesinlik ve doğruluk açısından karşılaştırması yapılan AEA ile elde edilen tablet içeriği sonuçlarıyla, standart yöntem olarak kullanılan UV-spektrofotometrik yöntem sonuçları arasındaki farkın %95 önem düzeyinde istatistiksel olarak önemsiz olduğu sonucuna varılmıştır.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Gerçekleştirilen akış enjeksiyon analizi ile tabletler içerisindeki nimodipinin analizi çabuk, ucuz ve hassas bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Birden fazla komponent içermeyen bileşiklerin özellikle ilaçların analizinde geliştirilen bu yöntem rutin kontrollerde başarıyla kullanılabilir. Sonuçlar yine rutin analizlerde kullanılan UV spektrofotometrik yöntemle karşılaştırılmış istatistiksel hesaplamalar yapılmıştır. Ayrıca validasyon çalışmaları da yapılarak yöntem daha güvenilir hale getirilmiştir.

AEA sistemleri, uygulama ve kullanım kolaylığı, yüksek örnekleme frekansı ve çok az örnek ve çözelti harcamasıyla ön plana çıkan ve günümüzde geniş uygulama alanı bulabilen bir yöntemdir. Ayrıca analiz süresinin kısa ve duyarlılığın yüksek oluşu da yöntemin üstünlüklerindedir. Ayırma işlemine gerek görülmeyen analizler için sinyaller çok kısa sürede alınabilmektedir (Altıokka ve ark., 2006; Altıokka ve Altıokka, M., 2002; Atkoşar ve Altıokka, 2006; Can ve Altıokka, 2005).

Geliştirilen AEA yönteminin söz edilen özelliklerinin yanı sıra kesin ve duyarlı bir yöntem olduğu da gösterilmiştir.

AEA, geçerli bir yöntem olan UV-spektrofotometri ile karşılaştırılmıştır. t- ve F-testi sonuçlarına dayanarak yöntemler arasındaki farkın %95 önem düzeyinde istatistiksel olarak önemsiz olduğu söylenebilir. Ayrıca yöntemin uygulaması sırasında elde edilen tabletlerdeki nimodipin içerikleri USP XXIV farmakopesinde verilen koşullarını sağlamaktadır (United States Pharmacopoeia XXIV, 2000).

KAYNAKLAR

Abraham, D.J., Cardiovascular Agents and Endocrines, in Burger's Medicinal Chem. and Drug Discovery, Sixth Edition, Volume 3, 22-27, (2003).

Altıokka, G., Altıokka, M., Flow injection analysis of amlodipine using UV-detection, *Pharmazie*, 57(7), 500, (2002).

Altıokka, G., Atkoşar, Z., Flow injection analysis of doxazosin mesylate using UV-detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 27, 841-844, (2001).

Altıokka, G., Atkoşar, Z., Can, N. O., The determination of levofloxacin by flow injection analysis using UV-detection, potentiometry, and conductometry in pharmaceutical preparations, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 30, 881-885, (2002).

Altıokka, G., Kırçali, K., The determination of paroxetine in pharmaceutical preparations by flow injection analysis using UV-Detection, *Analytical Science*, 29, 354-359, (2003).

Altıokka, G., Kırçali, K., Aboul-Enein H. Y., Rapid HPLC and direct flow injection analysis assay for the determination of trimetazidine HCl in pharmaceutical tablet formulation, *J. Liq. Chrom. Related Technologies*, 29, 2245-2255, (2006).

Atkoşar, Z., Altıokka, G., The determination of albendazole by flow injection analysis method using UV-Detection and HPLC method in suspensions, *J. Liq. Chrom. Related Technologies*, 29, 847-854, (2006).

Belal F., Al-Majed Aa., Julkhuf S., Khalil Ny., Spectrofluorometric determination of nimodipine in dosage forms and human urine, *Pharmazie*, 58 (12), 874-876, (2003).

Blardi, P., Urso, R., de Lalla, A., Volpi, L., Di Perri, T., and Auteri, A., Nimodipine: Drug pharmacokinetics and plasma adenosine levels in patients affected by cerebral ischemia, *Clinical Pharmacology ve Therapeutics*, 556-561, (2002).

British Pharmacopoeia, Market Towers 1 Nine Elms Lane, London, SW8 SNQ, Vol. II, 1409-1410, (2005).

Can, N. O., Altıokka, G., Determination of azapropazone in its pharmaceutical form by HPLC and flow injection analysis, *J. Liq. Chrom. Related Technologies*, 28, 857-869, (2005).

Can, N. O., Altıokka, G., 'Determination of cefuroxime axetil in tablets and biological fluids using liquid chromatography and flow injection analysis', *Anal. Chem. Acta*, 34, 121-124, (2006).

Canlica M., Islimyeli S., The atomic absorption spectrophotometric method for indirect determination of nimodipine in tablets, *Turkish J. of Chem.* 29 (2), 141-146, (2005).

Kayaalp O., Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Hacettepe Taş, Ankara, 390-391, (2005).

Lopez, J. A., Martinez, V., Alonso, R. M., Jimenez, R. M., High-performance liquid chromatography with amperometric detection applied to the screening of 1,4-dihydropyridine in human plasma, *J. Chromatogr. A*, 870, 105-114, (2000).

Ma, Yy., Qin, F., Sun, Xh., Lu, Xm., Li, Fm., Determination and pharmacokinetic study of amlodipine in human plasma by ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, *J. of Pharm. and Biomed. Anal.*, 43 (4), 1540-1545, (2007).

Martindale, *The Complete Drug Reference*, 32. Edition, Published by the Pharmaceutical Press, London, SE1 7JN, UK, 922, (1999).

Martinez, V., Lopez, J. A., Alonso, R. M., Jimenez, R. M., Micellar electrokinetic chromatography as a fast screening method for the determination of 1,4-dihydropyridine calcium antagonists, *J. Chromatogr. A*, 836, 189-199, (1999).

Miglioranca, Lh., Barrientos-Astigarraga, Re., Schug, Bs., Blume, Hh., Pereira, As., De Nucci, G., Felodipine quantification in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *J. of Chromatogr. B-Analytical Techno. in the Biomed. and Life Sciences*, 814 (2), 217-223, (2005).

Oh, S. Y., Kim, K. Y., Kim, Y. G., Kim, H. G., High-performance liquid chromatographic analysis of nitrendipine in human plasma using ultraviolet detection and single-step solid-phase sample preparation, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 32, 387-392, (2003).

Qiu, F., Chen, Xy., Li, Xy., Zhong, Df., Determination of nimodipine in human plasma by a sensitive and selective liquid chromatography-tandem mass spectrometry method, *J. of Chromatogr. B-Analytical Techno. in the Biomed. and Life Sciences*, 802 (2), 291-297, (2004).

Reddy Tm., Reddy Sj, Differential pulse adsorptive stripping voltammetric determination of nifedipine and nimodipine in pharmaceutical formulations, urine, and serum samples by using a clay-modified carbon-paste electrode, *Analytical Letters*, 37 (10), 2079-2098, (2004).

The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, Twelfth Edition, Published by Merck&Co., Inc., N.J., ABD, 1125-1126, (1996).

United States Pharmacopoeia XXIV, Printed by National Publishing, Philadelphia, PA, 1535-1536, (2000).

Yagnesh, P. P., Suvarna P., Indravadan, C. B., Sundaresan, M., Isocratic, simultaneous reversed-phase high-performance liquid chromatographic estimation of six drugs for combined hypertension therapy, *J. Chromatogr. A*, 828, 283-286, (1998).

Yang By., Mo Jy., Lai R., Huang Bm., Simultaneous determination of four calcium channel blockers by dual-electrode and dual-channel electrochemical detection and micellar electrokinetic chromatography, *Chinese J. of Anal. Chem.*, 32 (10), 1304-1308, (2004).

Zhao, Yj., Lang, Hy., Zhang, Xj., Jiang, Yr., Determination of nimodipine by flow injection chemiluminescence method, *Chinese J. of Anal. Chem.*, 32 (3), 345-347, (2004).