

**BUPROPİON HİDROKLORÜR'ÜN
ÇEŞİTLİ ANALİTİK YÖNTEMLERLE
BİYOLOJİK SIVILARDA ve
FARMASÖTİK PREPARATLARDA
TAYİNİ**

Duygu Yeniceli

Doktora Tezi

**BUPROPİON HİDROKLORÜR'ÜN ÇEŞİTLİ
ANALİTİK YÖNTEMLERLE BİYOLOJİK
SIVILARDA ve FARMASÖTİK
PREPARATLARDA TAYİNİ**

Duygu Yeniceli

Doktora Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Anabilim Dalı

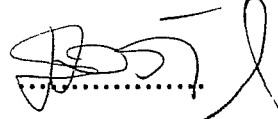
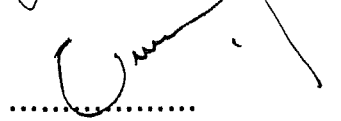
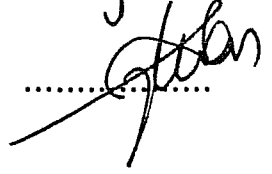
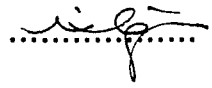
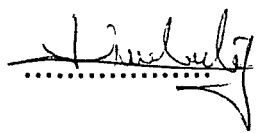
Eskişehir, Ocak 2009

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Dilek DOĞRUKOL-AK

Bu tez çalışması, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No. 060324).

Jüri ve Enstitü Onayı

Duygu YENİCELİ'nin "Bupropion Hidroklorür'ün Çeşitli Analitik Yöntemlerle Biyolojik Sıvılarda ve Farmasötik Preparatlarda Tayini" başlıklı, Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki Doktora tezi, 19.01.2009 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. Dilek DOĞRUKOL-AK Anadolu Üniversitesi	
Üye	Prof. Dr. Muzaffer TUNÇEL Anadolu Üniversitesi	
Üye	Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN Ankara Üniversitesi	
Üye	Prof. Dr. Nilgün GÖĞER Gazi Üniversitesi	
Üye	Prof. Dr. Nursabah BAŞCI Hacettepe Üniversitesi	

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

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı ve soyadı : Duygu Yeniceli
Doğum tarihi ve yeri : 1980, Kütahya
Uyruğu : T.C.
Medeni durumu : Bekâr
İletişim adresleri : Anadolu Üniversitesi. Eczacılık Fakültesi.
Analitik Kimya Anabilim Dalı.
26470 Tepebaşı/Eskişehir
0 222 3350580 # 3765
0 222 3350750
dyeniceli@anadolu.edu.tr

Eğitim Durumu

İlkokul : Melahat Ünügür İlkokulu
Eskişehir, 1991
Ortaokul : Kılıçoğlu Anadolu Lisesi
Eskişehir, 1995
Lise : Süleyman Çakır Lisesi
Eskişehir, 1998
Lisans : Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Ankara, 2002
Yüksek Lisans : Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Eskişehir, 2004
Yabancı dil : İngilizce

Yayımlar

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

Yeniceli, D., Doğrukol-Ak, D., Tunçel, M., A Validated HPLC Method with Fluorescence Detection for the Determination of Droperidol in Pharmaceutical Tablet, Human Serum and Breast Milk, Chromatographia, 66, 37-43 (2007).

Şener, E., Korkmaz, O.T., Yeniceli, D., Doğrukol-Ak, D., Tunçel, M., Tunçel, N., Determination of Carbamazepine and Its Main Metabolite Carbamazepine 10,11-Epoxy in Rat Brain Microdialysate and Blood Using ESI-LC-MS (Ion Trap), Chromatographia, 66, 31-36 (2007).

Tunçel, M., Dogrukol-Ak D., Yeniceli, D., Uslu, B., Doğan, B., CE Determination of Droperidol in Tablets and Human Serum, *Chromatographia* 63, 507-511 (2006).

Yeniceli, D., Dogrukol-Ak, D., Tunçel, M., Determination of Leflunomide in Tablets by High Performance Liquid Chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 40, 197-201 (2006).

Yeniceli, D., Dogrukol-Ak, D., Tunçel, M., Determination of Leflunomide in Pharmaceutical Tablets by Flow-injection Analysis, *J. Liq. Chromatogr. R. T.*, 28 (11), 1693-1701 (2005).

Yeniceli, D., Dogrukol-Ak, D., Tunçel, M., Determination of Lansoprazole in Pharmaceutical Capsules by Flow-injection Analysis Using UV-Detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 36, 145-148 (2004).

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

Yeniceli, D., Dogrukol-Ak, D., Tunçel, M., A Validated Stability Indicating High-Performance Thin-Layer Chromatographic Method for the Determination of Bupropion Hydrochloride in Pharmaceutical Dosage Form, 19th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Sözlü Bildiri, Gdansk, Polonya, 2008.

Yeniceli, D., Dogrukol-Ak, D., Tunçel, M., A HPTLC Method for the Determination of Bupropion in Human Serum, 32nd International Symposium on Capillary Chromatography, Poster Bildiri, Riva Del Garda, İtalya, 2008.

Yeniceli, D., Dogrukol-Ak, D., Tunçel, M., A Validated HPLC Method with Fluorescence Detection for the Determination of Droperidol in Pharmaceuticals, Human Serum and Breast Milk, Dalian International Symposia and Exhibition on Chromatography Including 30th ISCC, 4th GCxGC, 16th NISEC, Poster Bildiri, Dalian, Çin, 2007.

Şener, E., Korkmaz, O.T., Yeniceli, D., Doğrukol-Ak, D., Tunçel, M., Tunçel, N., Determination of Carbamazepine and Its Main Metabolite Carbamazepine 10,11-Epoxy in Rat Brain Microdialysate and Blood Using ESI-LC-MS (Ion Trap), Pharmaceutical Science World Congress 3. PSWC, Poster Bildiri, Amsterdam, Hollanda, 2007.

Tunçel, M., Dogrukol-Ak D., Yeniceli, D., Uslu, B., Doğan, B., CE Determination of Droperidol in Tablets and Human Serum, 29th International Symposium on Capillary Chromatography, Poster Bildiri, Riva Del Garda, İtalya, 2006.

Yeniceli, D., Dogrukol-Ak, D., Tunçel, M., Determination of Leflunomide in Pharmaceutical Tablets by Flow-injection Analysis, ISOPS 8, Poster Bildiri, Ankara, Türkiye, 2006.

Yeniceli, D., Dogrukol-Ak, D., Tunçel, M., Determination of Lansoprazole in Pharmaceutical Capsules by Flow-injection Analysis Using UV-Detection, ISOPS 7, Poster Bildiri, Ankara, Türkiye, 2003.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

Yeniceli, D., Dogrukol-Ak, D., Tunçel, M., Bupropion'un UV-Spektrofotometri ve İkinci Türev Spektrofotometri Yöntemleri ile Tabletlerinde Miktar Tayini, XXI. Ulusal Kimya Kongresi, Poster Bildiri, Malatya, Türkiye, 2007.

Yardım, Y., Yeniceli, D., Tuncel, M., Şentürk, Z., Antihipertansif İlaçlardan Asebutolol'ün Polarografik Yöntemle Miktar Tayini, II. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, Poster Bildiri, Malatya, Türkiye, 2004.

Bilimsel Etkinlikler

Burslar

Tübitak Yurt İçi Doktora Bursu, 2005.

Ödüller

En iyi poster bildiri ödülü, Dalian International Symposia and Exhibition on Chromatography Including 30th ISCC, 4th GCxGC, 16th NISEC, Dalian, Çin, 2007.

Mezuniyet Derecesi İkincilik Ödülü, Hacettepe Üniversitesi, 2002.

Mezuniyet Derecesi İkincilik Ödülü, Ankara Eczacılar Odası, 2002.

Mezuniyet Derecesi İkincilik Ödülü, Türk Eczacılar Birliği, 2002.

Sözlü konferans veya seminerler

Yeniceli, D., Doğrukol-Ak, D., Tuncel, M., Determination of leflunomide in pharmaceutical tablets by flow-injection analysis, İTAB Kanser Araştırmaları Çalıştayı, Eskişehir, Türkiye, 08/11/2005.

Organizasyonunda bulunulan toplantılar

Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ve Kapiller Elektroforez Uygulamaları, Eskişehir, Türkiye, 4-8 Aralık 2006.

Katılan kurslar ve eğitim programları

DeneySEL Araştırma Kursu, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hakan Çetinsaya DeneySEL ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM), Kayseri, Türkiye, 25-26 Kasım 2006.

Elektrokimyasal DNA biosensörleri çalıştayı, Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi, Eskişehir, Türkiye, 31 Ocak-1 Şubat 2005.

ÖNSÖZ

Bu çalışmada, Bupropion Hidroklorür'ün tabletlerinde ve plazmadaki tayini için çeşitli analitik yöntemler geliştirilmiştir.

Yapılmış olan tez çalışması, klasik analiz yöntemlerinin ve modern yöntemlerin bir arada kullanıldığı, geliştirilen yöntemler ve numune hazırlama basamakları yönünden önceki çalışmalardan farklılık gösteren bir çalışmadır ve bu bakımdan uluslararası literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Öncelikle, almış olduğum doktora bursu nedeniyle, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve deneyimlerinin yanı sıra, bana duyduğu güven, çalışmalarımın her aşamasında verdiği cesaret, hoşgörüsü, anlayışı ve güler yüzü ile akademik hayatımın her anından ayrı bir tat almamı sağlayan değerli danışman hocam Prof. Dr. Dilek DOĞRUKOL-AK'a üzerimdeki emekleri için teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman yanımda olduğunu hissettiğim, öngörüsüyle tez çalışmamı zamanında bitirebilmeme olanak sağlayan ve bu süre içinde bilgi ve tecrübesiyle beni sürekli destekleyen değerli hocam Prof. Dr. Muzaffer TUNÇEL'e teşekkürlerimi sunarım.

Desteklerinden ötürü dekanımız sayın Prof. Dr. Neşe KIRIMER'e ve dekan yardımcılarımız sayın Doç. Dr. Bülent ERGUN ve sayın Doç. Dr. Göksel ARLI ALTIOKKA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Verdikleri bilgiler ile tezimin çerçevesini çizmeme yardımcı olan ve sağlamış oldukları Zyban® tabletten ötürü Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü sayın Prof. Dr. Yasemin YAZAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam kapsamında, Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü bünyesinde bulunan İTK cihazını kullanmama olanak sağlayan, Bölüm Başkan Yardımcıları Yard. Doç. Dr. Deniz HÜR ve Doç. Dr. Hakan DAL'a ve Anadolu Üniversitesi Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi (AÜBİBAM) bünyesinde bulunan liyofilizasyon cihazını kullanmama olanak sağlayan AÜBİBAM Müdür Yardımcısı Doç. Dr. Lütüf GENÇ'e teşekkürlerimi sunarım.

Verdikleri destek ve güler yüzleri ile sorunlara göğüs germemi sağlayan sevgili arkadaşlarım Araş. Gör. Ruhan KARADAĞ ve Araş. Gör. Çiğdem ÇARDAK'a; fen fakültesinde yaptığım deneyler sırasında bana çok yardımcı olan, tezimin bana kazandırdığı arkadaşlarım Araş. Gör. Emel ERMİŞ ve Araş. Gör. Yasemin SÜZEN'e ve tezime önemli katkısı olan Öğretim Görevlisi Ahmet SARAÇOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarıma ve cihazlarla ilgili her sorunumda imdadıma yetişen ve YPSK deneylerine önemli katkısı olan Araş. Gör. Dr. Erol ŞENER'e ve diğer çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Œu anda yanımnda olmamasına karşın, varlığını her zaman hissettiğim sevgili babam Hasan YENİCELİ'ye, üzerimdeki emeklerini anlatmak için kelimelerin yetersiz olduğunu bildiğim sevgili annem Nesrin YENİCELİ'ye, dualarını benden eksik etmeyen anneannem Nedime KARACALAR'a, desteklerini her an hissettiren sevgili aileme ve bugünlere gelmemi sağlayan, öğrenim hayatım boyunca bana emeği geöen tüm hocalarıma sonsuz teœekkürlerimi sunarım.

BUPROPION HİDROKLORÜR'ÜN ÇEŞİTLİ ANALİTİK YÖNTEMLERLE BİYOLOJİK SIVILARDA VE FARMASÖTİK PREPARATLARDA TAYİNİ

ÖZET

Bu çalışmada Bupropion Hidroklorür'ün (BUP) farmasötik tabletlerindeki tayini için geliştirilmiş olan potansiyometri, kondüktometri, UV ve II. türev spektrofotometri yöntemleri ve farmasötik tabletlerindeki tayine ilaveten BUP'un plazmadaki analizi için geliştirilmiş olan İTK ve YPSK yöntemleri tanıtılmaktadır. Spektrofotometrik yöntemler, valide edilmiş ve UV-spektrofotometri yöntemi için saptama sınırı (LOD) ve tayin alt sınırı (LOQ) değerleri 2.73×10^{-6} M ve 8.26×10^{-6} M olarak bulunmuştur. II. türev spektrofotometri yöntemi için ise bu değerler sırasıyla 8.20×10^{-7} M ve 2.48×10^{-6} M olarak hesaplanmıştır. Daha sonra, etkin maddenin asit, baz, hidrojen peroksit, kuru ve nemli ısı, fotokimyasal ve UV ışık ortamında kararlılığının araştırıldığı İTK yöntemi geliştirilmiş ve tam olarak validasyonu sağlanmıştır. Etanol-kloroform-glasiyel asetik asit (30:10:1, h/h/h) den oluşan hareketli fazın kullanıldığı yöntemin, LOD ve LOQ değerleri sırasıyla $10.41 \text{ ng.spot}^{-1}$ ve $34.71 \text{ ng.spot}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.

Geliştirilmiş olan İTK yöntemi, BUP'un plazmadaki tayinine de uygulanmış ve ortalama olarak, % 87 dolayında, oldukça yüksek bir geri kazanım ve düşük bağıl standart sapma değerleri ile yüksek düzeyde kesinlik elde edilmiştir.

Daha sonra, BUP'un farmasötik tabletlerinde ve ana metaboliti olan HBUP'la birlikte plazmada tayini için bir YPSK yöntemi geliştirilmiştir. Yöntem, İTK yönteminde olduğu gibi tam olarak valide edilmiş ve BUP'un plazmadaki LOD ve LOQ değerleri sırasıyla, 9.09×10^{-8} M ve 2.76×10^{-7} M olarak hesaplanmıştır. HBUP'un LOD ve LOQ değerleri ise, 4.68×10^{-7} M ve 1.42×10^{-6} M olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak, bu çalışmada BUP'un farmasötik tabletlerindeki tayini için potansiyometri, kondüktometri, UV ve II. türev spektrofotometri yöntemleri gibi basit, güvenilir, analiz maliyeti düşük, her laboratuvarında kolaylıkla uygulanabilen klasik analiz yöntemleri ve farmasötik tabletlerindeki tayine ilaveten BUP'un plazmadaki tayini için kesinliği, güvenilirliği ve seçiciliğinin yanı sıra duyarlı İTK ve YPSK yöntemleri geliştirilmiştir. Yöntemler, validasyonu sağlandıktan sonra BUP'un farmasötik tabletlerine başarıyla uygulanmış ve tablet içerikleri farmakopeye uygun bulunmuştur.

İTK ve YPSK yöntemleri ile plazma analizlerinde de düşük bağıl standart sapma değerleri ile yüksek geri kazanım elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: bupropion hidroklorür, spektrofotometri, İTK, YPSK, tablet analizi, plazma analizi

THE DETERMINATION OF BUPROPION HYDROCHLORIDE IN PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND BIOLOGICAL FLUIDS BY ANALYTICAL METHODS

ABSTRACT

Potentiometric, conductometric, UV-spectrophotometric and second derivative spectrophotometric methods which are developed for the determination of Bupropion Hydrochloride (BUP) in pharmaceutical tablets, TLC and HPLC methods which are developed for the determination of BUP in both pharmaceuticals and human plasma were described in this study. Two spectrophotometric methods were validated and the limit of detection (LOD) and quantitation (LOQ) of UV-spectrophotometry were 2.73×10^{-6} M and 8.26×10^{-6} M. Also, these parameters were determined as 8.20×10^{-7} M and 2.48×10^{-6} M for the second derivative spectrophotometry, respectively. Then, a stability indicating TLC method is developed for the determination of BUP in pharmaceutical tablets in which BUP was subjected to acidic and alkali hydrolysis, oxidation, photodegradation, dry heat and wet heat treatment and the method was fully validated. The mobile phase consisted of ethanol-chloroform-glacial acetic acid (30:10:1, v/v/v) was used and the LOD and LOQ values of the method were found as $10.41 \text{ ng.spot}^{-1}$ and $34.71 \text{ ng.spot}^{-1}$, respectively.

Then, developed TLC method was applied to human plasma samples for the determination of BUP and high recovery almost about 87 % and high precision with low % RSD values were obtained.

After all, a HPLC method was developed for the determination of BUP in pharmaceuticals and in human plasma for the determination of BUP and HBUP, the major metabolite of BUP. The method was fully validated as shown in TLC method and the LOD and LOQ values of HPLC method were 9.09×10^{-8} M and 2.76×10^{-7} M for BUP and also, these parameters were determined as 4.68×10^{-7} M and 1.42×10^{-6} M respectively, for HBUP.

As a result, the developed potentiometric, conductometric and spectrophotometric methods were found to be simple, fast, reliable and cost efficient. These methods were classical methods which can be used in all laboratories. The TLC and HPLC methods were both selective and sensitive. Developed methods were fully validated and the applicability of the methods for the determination of BUP in pharmaceuticals was demonstrated and the drug content was found to be in the limits of USP 29 suggestions. Also the applicability of the TLC and HPLC methods in human plasma were demonstrated and high recoveries were obtained with the low % RSD values.

Key Words: bupropion hydrochloride, spectrophotometry, TLC, HPLC, tablet analysis, plasma analysis

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZGEÇMİŞ	i
ÖNSÖZ	iv
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	xix
GİRİŞ ve AMAÇ	1
KAYNAK BİLGİSİ	2
Bupropion Hidroklorür	2
<i>Fizikokimyasal Özellikleri</i>	2
<i>Farmakolojik Özellikleri</i>	3
<i>Antidepresan Etki</i>	3
<i>Sigara Bıraktırma Etkisi</i>	3
<i>Farmakokinetik Özellikleri</i>	4
BUP Analizi Çalışmaları	4
Plazma Numunesi Hazırlamak için Kullanılan Yöntemler	8
<i>Liyofilizasyon (Dondurarak Kurutma)</i>	8
<i>Plazma Proteinlerini Çöktürme İşlemi</i>	9
<i>Prensip</i>	9
<i>Çöktürücü Ajan Olarak Kullanılan Asitler</i>	9
<i>Çöktürücü Ajan Olarak Kullanılan Organik Çözücüler</i>	9
<i>Çöktürücü Ajanların Kullanılan Miktarları</i>	10
<i>Diğer Protein Çöktürücü Ajanlar</i>	10
<i>Protein Çöktürme Yönteminin Yararları</i>	11
<i>Protein Çöktürme Yönteminin Sakıncaları</i>	11
GEREÇLER	12
Kimyasal Maddeler	12
Cihazlar ve Diğer Gereçler	13

YÖNTEMLER	14
BUP'un Potansiyometrik ve Kondüktometrik Titrasyon Yöntemleri ile Farmasötik Tabletlerinde Miktar Tayini	14
<i>Tablet Numune Çözeltilerinin Hazırlanması</i>	14
<i>Kondüktometrik Titrasyon ile İlgili Deneysel Koşullar</i>	14
<i>Potansiyometrik Titrasyon ile İlgili Deneysel Koşullar</i>	14
BUP'un UV-Spektrofotometri ve İkinci Türev Spektrofotometri Yöntemleri ile Farmasötik Tabletlerinde Miktar Tayini	15
<i>Deneysel Koşulların Hazırlanması</i>	15
<i>Spektrofotometrik Yöntemlerin Validasyonu</i>	15
<i>Kesinlik (Precision)</i>	15
<i>Doğrusallık (Linearity)</i>	15
<i>Saptama Sınırı ve Tayin Alt Sınırı (LOD and LOQ)</i>	15
<i>Doğruluk (Accuracy)</i>	15
<i>Tablet Numune Çözeltilerinin Hazırlanması</i>	16
BUP'un İTK Yöntemi ile Farmasötik Tabletlerinde Miktar Tayini	17
<i>İTK Yöntemi ile İlgili Deneysel Koşullar</i>	17
<i>İTK Yönteminin Validasyonu</i>	17
<i>Kesinlik (Precision)</i>	17
<i>Doğrusallık (Linearity)</i>	17
<i>Saptama Sınırı ve Tayin Alt Sınırı (LOD and LOQ)</i>	17
<i>Doğruluk (Accuracy)</i>	17
<i>Özgünlük (Specificity)</i>	18
<i>Sağlamlık (Robustness)</i>	18
<i>Tutarlılık (Ruggedness)</i>	18
BUP için Hızlandırılmış Kararlılık Testi	18
<i>Asit ve Baz Etkisi</i>	18
<i>Hidrojen Peroksit Etkisi</i>	18
<i>Kuru ve Nemli Isı Etkisi</i>	19
<i>Fotokimyasal ve UV Işık Etkisi</i>	19
BUP Farmasötik Dozaj Şeklinin Kararlılığının Araştırılması	19
<i>İlgili Safsızlıkların Saptanması</i>	19
<i>Tablet Numune Çözeltilerinin Hazırlanması</i>	19
BUP'un İTK Yöntemi ile Plazmada Miktar Tayini	20

<i>DeneySEL Koşullar</i>	20
<i>Örnek Hazırlama</i>	20
<i>İTK Yönteminin Plazmadaki Validasyonu</i>	20
<i>Doğrusallık (Linearity)</i>	20
<i>Kesinlik ve Geri Kazanım Oranı (Precision and Recovery)</i>	20
<i>Saptama Sınırı ve Tayin Alt Sınırı (LOD and LOQ)</i>	21
BUP'un YPSK Yöntemi ile Farmasötik Tabletlerinde Miktar Tayini	21
<i>YPSK Yöntemi ile İlgili DeneySEL Koşullar</i>	21
<i>YPSK Yönteminin Validasyonu</i>	21
<i>Kesinlik (Precision)</i>	21
<i>Doğrusallık (Linearity)</i>	21
<i>Saptama Sınırı ve Tayin Alt Sınırı (LOD and LOQ)</i>	22
<i>Doğruluk (Accuracy)</i>	22
<i>Özgünlük (Specificity)</i>	22
<i>Sağlamlık (Robustness)</i>	22
<i>Tutarlılık (Ruggedness)</i>	22
<i>Tablet Numune Çözeltilerinin Hazırlanması</i>	22
BUP ve HBUP'un YPSK Yöntemi ile Plazmada Miktar Tayini	22
<i>DeneySEL Koşullar</i>	22
<i>Örnek Hazırlama</i>	23
<i>YPSK Yönteminin Plazmadaki Validasyonu</i>	23
<i>Doğrusallık (Linearity)</i>	23
<i>Kesinlik ve Geri Kazanım Oranı (Precision and Recovery)</i>	23
<i>Saptama Sınırı ve Tayin Alt Sınırı (LOD and LOQ)</i>	23
BULGULAR ve TARTIŞMA	25
BUP'un Potansiyometrik ve Kondüktometrik Titrasyon Yöntemleri ile Farmasötik Tabletlerinde Miktar Tayini	25
<i>Kondüktometrik Titrasyon Yönteminin Farmasötik Tabletlerdeki Uygulaması</i>	25
<i>Potansiyometrik Titrasyon Yönteminin Farmasötik Tabletlerdeki Uygulaması</i>	26
BUP'un UV-Spektrofotometri ve İkinci Türev Spektrofotometri Yöntemleri ile Farmasötik Tabletlerinde Miktar Tayini	27
<i>Spektroskopik Yöntemlerin Optimizasyonu</i>	27

<i>Spektroskopik Yöntemlerin Validasyonu</i>	29
<i>Kesinlik (Precision)</i>	29
<i>Doğrusallık (Linearity)</i>	29
<i>Saptama Sınırı ve Tayin Alt Sınırı (LOD and LOQ)</i>	30
<i>Doğruluk (Accuracy)</i>	30
<i>Spektroskopik Yöntemlerin Farmasötik Tabletlerdeki Uygulaması</i>	31
BUP'un İTK Yöntemi ile Farmasötik Tabletlerinde Miktar Tayini	32
<i>İTK Yönteminin Optimizasyonu</i>	32
<i>İTK Yönteminin Validasyonu</i>	34
<i>Kesinlik (Precision)</i>	34
<i>Doğrusallık (Linearity)</i>	35
<i>Saptama Sınırı ve Tayin Alt Sınırı (LOD and LOQ)</i>	36
<i>Doğruluk (Accuracy)</i>	36
<i>Özgünlük (Specificity)</i>	37
<i>Sağlamlık (Robustness)</i>	38
<i>Tutarlılık (Ruggedness)</i>	38
<i>BUP için Hızlandırılmış Kararlılık Testi</i>	38
<i>Asit ve Baz Etkisi</i>	38
<i>Hidrojen Peroksit Etkisi</i>	42
<i>Kuru ve Nemli Isı Etkisi</i>	43
<i>Fotokimyasal ve UV Işık Etkisi</i>	43
<i>BUP Farmasötik Dozaj Şeklinin Kararlılığının Araştırılması</i>	44
<i>İlgili Safsızlıkların Saptanması</i>	44
<i>BUP İçeren Tabletlerde Miktar Tayini</i>	45
BUP'un İTK Yöntemi ile Plazmada Miktar Tayini	45
<i>İTK Yönteminin Optimizasyonu</i>	45
<i>İTK Yönteminin Plazmadaki Validasyonu</i>	46
<i>Kesinlik ve Geri Kazanım Oranı (Precision and Recovery)</i>	46
<i>Doğrusallık (Linearity)</i>	47
<i>Saptama Sınırı ve Tayin Alt Sınırı (LOD and LOQ)</i>	48
BUP'un YPSK Yöntemi ile Farmasötik Tabletlerinde Miktar Tayini	48
<i>YPSK Yönteminin Optimizasyonu</i>	48

<i>YPSK Yönteminin Validasyonu</i>	53
<i>Keskinlik (Precision)</i>	53
<i>Doğrusallık (Linearity)</i>	54
<i>Saptama Sınırı ve Tayin Alt Sınırı (LOD and LOQ)</i>	54
<i>Doğruluk (Accuracy)</i>	54
<i>Özgünlük (Specificity)</i>	56
<i>Sağlamlık (Robustness)</i>	57
<i>Tutarlılık (Ruggedness)</i>	57
<i>BUP İçeren Tabletlerde Miktar Tayini</i>	57
BUP ve HBUP'un YPSK Yöntemi ile Plazmada Miktar Tayini	58
<i>YPSK Yönteminin Optimizasyonu</i>	58
<i>YPSK Yönteminin Validasyonu</i>	60
<i>Keskinlik ve Geri Kazanım Oranı (Precision and Recovery)</i>	60
<i>Doğrusallık (Linearity)</i>	62
<i>Saptama Sınırı ve Tayin Alt Sınırı (LOD and LOQ)</i>	64
SONUÇ ve ÖNERİLER	65
KAYNAKLAR	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE NO ve ADI	SAYFA
Çizelge 1 Çöktürücü Ajanların, Çöktürülen Plazma Proteini Oranında % Bağlı Etkinlikleri	10
Çizelge 2 Tablet Matriks Çözeltisini Hazırlamak için Kullanılan Yardımcı Maddeler ve Yüzdeleri	16
Çizelge 3 Kondüktometrik Titrasyon ile Elde Edilen Dönüm Noktaları ve BUP'un Farmasötik Tabletlerindeki Miktar Tayini Sonuçları	25
Çizelge 4 Potansiyometrik Titrasyon ile Elde Edilen Dönüm Noktaları ve BUP'un Farmasötik Tabletlerindeki Miktar Tayini Sonuçları	27
Çizelge 5 2.07×10^{-5} - 7.25×10^{-5} M Derişim Aralığındaki BUP'un İki Farklı Spektrofotometrik Yöntemle Doğrusallık Sonuçları	30
Çizelge 6 UV-Spektrofotometri Yöntemi ile Standart BUP ve BUP Eklenmiş Matriks için Doğruluk Sonuçları	31
Çizelge 7 II. Türev Spektrofotometri Yöntemi ile Standart BUP ve BUP Eklenmiş Matriks için Doğruluk Sonuçları	31
Çizelge 8 İki Farklı Spektrofotometrik Yöntemle BUP'un Farmasötik Tabletlerindeki Miktar Tayini Sonuçları	32
Çizelge 9 BUP'un Gün İçi ve Günler Arası Tekrar Edilebilirlik Sonuçları	35
Çizelge 10 200-1000 ng.spot ⁻¹ Derişim Aralığındaki BUP'un 254 nm'deki Pik Alanı Sinyallerinin Doğrusallığı	36
Çizelge 11 İTK Yönteminin Doğruluk Sonuçları (n=5)	37
Çizelge 12 İTK Yönteminin Sağlamlık Sonuçları (n=3, 1000 ng.spot ⁻¹ BUP)	38
Çizelge 13 Hızlandırılmış Kararlılık Testi Sonuçları (n=5, 1000 ng.spot ⁻¹ BUP)	44
Çizelge 14 İlgili Safsızlıklar (n=5)	45

ÇİZELGE NO ve ADI (DEVAM)	SAYFA
Çizelge 15 BUP'un Plazmada Kesinliği ve Geri Kazanım Oranı (gün=3, n=5)	47
Çizelge 16 Plazma İçerisinde 120-600 ng.spot ⁻¹ Derişim Aralığındaki BUP'un 254 nm'deki Pik Alanı Sinyallerinin Doğrusallığı	47
Çizelge 17 BUP'un Sistem Uygunluk Parametreleri	52
Çizelge 18 BUP'un Gün İçi ve Günler Arası Tekrar Edilebilirlik Sonuçları	53
Çizelge 19 4.48x10 ⁻⁷ -1.78x10 ⁻⁵ M Derişim Aralığındaki BUP'un 254 nm'deki Doğrusallığı	54
Çizelge 20 YPSK Yönteminin Doğruluk Sonuçları (n=7)	55
Çizelge 21 YPSK Yönteminin Sağlamlık Sonuçları (n=3, 5.37x10 ⁻⁶ M BUP)	57
Çizelge 22 YPSK Yönteminin Tutarlılık Sonuçları (n=7, 5.37x10 ⁻⁶ M BUP)	57
Çizelge 23 YPSK Yöntemi ile Tablet Analizi Sonuçları (n=9, 5.37x10 ⁻⁶ M BUP)	58
Çizelge 24 Plazmaya Eklenmiş olan BUP'un Gün İçi ve Günler Arası Tekrar Edilebilirlik Sonuçları	60
Çizelge 25 Plazmaya Eklenmiş olan HBUP'un Gün İçi ve Günler Arası Tekrar Edilebilirlik Sonuçları	61
Çizelge 26 BUP'un YPSK Yöntemiyle Plazmada Kesinliği ve Geri Kazanım Oranı (gün=3, n=6)	62
Çizelge 27 HBUP'un YPSK Yöntemiyle Plazmada Kesinliği ve Geri Kazanım Oranı (gün=3, n=6)	62
Çizelge 28 4.48x10 ⁻⁷ -1.79x10 ⁻⁵ M Derişim Aralığında Standart BUP'un 254 nm'deki Doğrusallığı	63
Çizelge 29 1.02x10 ⁻⁶ -6.09x10 ⁻⁵ M Derişim Aralığında Standart HBUP'un 214 nm'deki Doğrusallığı	63
Çizelge 30 8.97x10 ⁻⁷ -1.79x10 ⁻⁵ M Derişim Aralığında Plazmaya Eklenmiş Olan BUP'un 254 nm'deki Doğrusallığı	64
Çizelge 31 2.03x10 ⁻⁶ -5.49x10 ⁻⁵ M Derişim Aralığında Plazmaya Eklenmiş Olan HBUP'un 214 nm'deki Doğrusallığı	64

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA	
Şekil 1	BUP'un Açık Kimyasal Formülü	2
Şekil 2	BUP'un FT-IR Spektrumu	2
Şekil 3	BUP Tablet Numunesinin (150 mg) 0.1000 N NaOH ile Kondüktometrik Titrasyon Grafiği	25
Şekil 4	BUP Tablet Numunesinin (150 mg) 0.1000 N NaOH ile Potansiyometrik Titrasyon Eğrisi	26
Şekil 5	BUP Tablet Numunesinin (150 mg) 0.1000 N NaOH ile Potansiyometrik Titrasyonunda I. Türev Eğrisi	26
Şekil 6	BUP Tablet Numunesinin (150 mg) 0.1000 N NaOH ile Potansiyometrik Titrasyonunda II. Türev Eğrisi	27
Şekil 7	% 2 Metanol İçerisindeki Standart BUP (5×10^{-5} M) Çözeltilisinin 200-350 nm Aralığındaki UV-Spektrumu	28
Şekil 8	% 2 Metanol İçerisindeki Standart BUP (5×10^{-5} M) Çözeltilisinin 200-350 nm Aralığındaki I. Türev Spektrumu	28
Şekil 9	% 2 Metanol İçerisindeki Standart BUP (5×10^{-5} M) Çözeltilisinin 200-400 nm Aralığındaki II. Türev Spektrumu	29
Şekil 10	Optimum Koşullarda Standart BUP'un (500 ng.spot^{-1}) İTK Kromatogramı (pik 1: BUP)	33
Şekil 11	USP 29'da Belirtilen Koşullarda ve Toluen, Sikloheksan ve Glasiyel Asetik Asit (47:47:6, h:h:h) İçeren Hareketli Faz Kullanılarak, 254 nm'de Standart BUP'un (500 ng.spot^{-1}) İTK Kromatogramı (Pik 1: BUP)	34
Şekil 12	Standart BUP Çözeltilisi ve Tablet Numunesinin Spektrum Karşılaştırması	37
Şekil 13a	Asit (1N HCl, 70°C Sıcaklıkta 30 Dakika) ile Muamele Edilmiş Nötral BUP Numunesi ($1000 \text{ ng.spot}^{-1}$) Kromatogramı (Pik 1: BUP)	39

ŞEKİL NO ve ADI (DEVAM)	SAYFA
Şekil 13b Asit (1N HCl, 70°C Sıcaklıkta 30 Dakika) ile Muamele Edilmiş Nötral Olmayan BUP Numunesi (1000 ng.spot ⁻¹) Kromatogramı (Pik 1: Bozunma Ürünü, Pik 2: BUP)	39
Şekil 13c Asit Muamelesine Tabi Tutulmamış Standart BUP Çözeltisinin Spektrumu ile Nötral ve Nötral Olmayan Numunelerin Spektrumlarının Karşılaştırması (1000 ng.spot ⁻¹) a: Standart BUP, b: Nötral Numune, c: Nötral Olmayan Numune	40
Şekil 14a Baz (1N NaOH, 70°C Sıcaklıkta 30 Dakika) ile Muamele Edilmiş Nötral BUP Numunesi (1000 ng.spot ⁻¹) Kromatogramı (Pik 1: Bozunma Ürünü, Pik 2: BUP)	41
Şekil 14b Baz (1N NaOH, 70°C Sıcaklıkta 30 Dakika) ile Muamele Edilmiş Nötral Olmayan BUP Numunesi (1000 ng.spot ⁻¹) Kromatogramı (Pik 1: Bozunma Ürünü, Pik 2: BUP)	41
Şekil 14c Baz Muamelesine Tabi Tutulmamış Standart BUP Çözeltisinin Spektrumu ile Nötral ve Nötral Olmayan Numunelerin Spektrumlarının Karşılaştırması (1000 ng.spot ⁻¹) a: Standart BUP, b: Nötral Numune, c: Nötral Olmayan Numune	42
Şekil 15 Hidrojen Peroksit (% 30 h/h; 80°C Sıcaklıkta 1 saat 15 Dakika) ile Muamele Edilmiş BUP Numunesi (1000 ng.spot ⁻¹) Kromatogramı (Pik 1 ve 2: Bozunma Ürünü, Pik 3: BUP)	42
Şekil 16 UV Işığı (UV Lamba Altında 8 Saat) ile Muamele Edilmiş BUP Numunesi (1000 ng.spot ⁻¹) Kromatogramı (Pik 1: Bozunma Ürünü, Pik 2: BUP)	43
Şekil 17 BUP ve Safsızlıkların Kromatogramı (Pik 1 ve 2: Safsızlık, Pik 3: BUP)	44
Şekil 18a BUP Eklenmemiş Plazma Örneğinin İTK Kromatogramı	46

ŞEKİL NO ve ADI (DEVAM)	SAYFA
Şekil 18b 240 ng.spot ⁻¹ Derişimde BUP Eklenmiş Plazma Örneğinin İTK Kromatogramı (pik 1: BUP)	46
Şekil 19 Alıkonma Zamanı (RT) ve Teorik Tabaka Sayısının (N) pH'a Göre Değişim Grafiği (Koşullar: Metanol-Asetonitril-Fosfat Tamponu (20 mM) (40:10:50, h/h/h) ve 10 mM 1-HSA)	49
Şekil 20 Alıkonma Zamanı (RT) ve Teorik Tabaka Sayısının (N) Çözücü Yüzdesine Göre Değişim Grafiği (Koşullar: Fosfat Tamponu (20 mM, % 50, pH:3) ve 10 mM 1-HSA)	50
Şekil 21 Alıkonma Zamanı (RT) ve Teorik Tabaka Sayısının (N) 1-HSA Derişimine (mM) Göre Değişim Grafiği (Koşullar: Metanol-Asetonitril-Fosfat Tamponu (20 mM, pH:3) (40:10:50, h/h/h))	50
Şekil 22 Alıkonma Zamanı (RT) ve Teorik Tabaka Sayısının (N) Fosfat Derişimine (mM) Göre Değişim Grafiği (Koşullar: Metanol-Asetonitril-Fosfat Tamponu (pH:3) (40:10:50, h/h/h) ve 10 mM 1-HSA)	51
Şekil 23 Alıkonma Zamanı (RT) ve Teorik Tabaka Sayısının (N) Akış Hızına Göre Değişim Grafiği (Koşullar: Metanol-Asetonitril -Fosfat Tamponu (20 mM, pH:3) (40:10:50, h/h/h), 10 mM 1-HSA)	51
Şekil 24 Optimum Koşullarda BUP (7.16×10^{-6} M) ve CBZ (IS, 8.38×10^{-6} M)'nin Kromatogramı	52
Şekil 25 Optimum Koşullarda BUP ve CBZ (IS)'nin Tablet Analizlerindeki Kromatogramı (a) BUP Eklenmemiş Tablet Matriksi (b) 5.37×10^{-6} M BUP Eklenmiş Tablet Matriksi (c) Ticari Tablet	55

ŞEKİL NO ve ADI (DEVAM)	SAYFA
Şekil 26 Optimum Koşullarda BUP ve CBZ (IS)'nin Yöntem Özgünlük Sonuçları (a) % 3'lük H ₂ O ₂ İçerisinde Hazırlanmış BUP (b) 0.1 N NaOH İçerisinde Hazırlanmış BUP (c) 0.1 N HCl İçerisinde Hazırlanmış BUP	56
Şekil 27 Oda Sıcaklığında ve 60°C Sıcaklıkta, Bazla Muamele Karşısında Zamana Karşı % BUP Değişim Grafiği	56
Şekil 28 254 nm'de Kaydedilmiş (a) IS Eklenmiş Boş Plazma Kromatogramı (b) Standart BUP (1.79×10^{-5} M) ve HBUP'un (6.10×10^{-5} M) Kromatogramı (c) BUP (1.79×10^{-5} M) ve HBUP (6.10×10^{-5} M) Eklenmiş Plazma Kromatogramı	59
Şekil 29 214 nm'de Kaydedilmiş (a) IS Eklenmiş Boş Plazma Kromatogramı (b) Standart BUP (1.79×10^{-5} M) ve HBUP'un (6.10×10^{-5} M) Kromatogramı (c) BUP (1.79×10^{-5} M) ve HBUP (6.10×10^{-5} M) Eklenmiş Plazma Kromatogramı	59

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

a/h	: Ağırlık/hacim oranı
AUC	: Eğri altında kalan alan
BH	: Bağlı hata
BSS	: Bağlı standart sapma
BUP	: Bupropion hidroklorür
CBZ	: Karbamazepin
C_{maks}	: Maksimum plazma konsantrasyonu
DA	: Dopamin
DN	: Donma noktası
EBUP	: Eritrohidrobupropion
HBUP	: Hidroksibupropion
HCl	: Hidroklorik asit
HClO ₄	: Perklorik asit
h/h	: Hacim/hacim oranı
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
1-HSA	: 1-Heptan sülfonik asit
IS	: İç standart
İTK	: İnce tabaka kromatografisi
k	: İletkenlik hücre sabiti
LOD	: Saptama sınırı
LOQ	: Tayin alt sınırı
M	: Molar
N	: Teorik tabaka sayısı
NA	: Noradrenalin
NaOH	: Sodyum hidroksit
NH ₃	: Amonyak
nAkR	: Nikotinik tipteki asetilkolin reseptörleri
OAQ	: Ortalama alan oranı
OPA	: Ortalama pik alanı
R _f	: Alıkonma faktörü
RT	: Alıkonma zamanı
SE	: Serotonin

SH	: Standart hata
SK	: Sıvı kromatografisi
SK-KS	: Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi
S/N	: Sinyal/gürültü oranı
SR	: Sürekli salım
SS	: Standart sapma
TBUP	: Treohidrobupropion
TCA	: Trikloroasetik asit
$t_{1/2\beta}$: Eliminasyon yarı ömrü
t_{maks}	: Maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşmak için gereken zaman
USP	: The United States Pharmacopeia
UV	: Ultraviyole
YPSK	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
Λ	: Düzeltilmiş iletkenlik değeri
Λ_0	: Kondüktometrede okunan iletkenlik değeri
$\Delta\lambda$: Türev aralığı

GİRİŞ ve AMAÇ

Bupropion hidroklorür (BUP), fenilaminoketon grubu atipik bir antidepresan ajandır. BUP'un sürekli salım formülasyonu (Zyban®), FDA tarafından 1997 yılında sigarayı bıraktırmak için kullanılan ve nikotin içermeyen ilk farmakoterapötik olarak kabul edilmiştir (George ve O'Malley, 2004).

Literatürde, BUP'un insan ve çeşitli hayvanların plazmalarındaki tayinini içeren az sayıda çalışma bulunmaktadır ve bu çalışmalar yöntem çeşitliliği göstermediği gibi, kullanılan sabit ve hareketli fazlar, numune hazırlama basamakları yönünden birbirine benzer niteliktedir (Cooper ve ark., 1984; Suckow ve ark., 1986; Suckow ve ark., 1997; Zhang ve ark., 2003; Borges ve ark., 2004; Loboz ve ark., 2005). Farmakokinetik çalışmalar yapmak üzere, plazma örneklerinde BUP ve metabolitlerinin analizi için değişik yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) yöntemleri ve kütle spektroskopisi detektörlü sıvı kromatografisi (SK-KS) gibi özgün çalışma koşulları ve pahalı cihazlar gerektiren yöntemler geliştirilmiş olmasına karşılık, plazma analizleri için laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılabilir ve literatürdekilerden farklı analitik kolon (C₈) ve hareketli faz içeren ayrıca numune hazırlama basamağı daha kısa ve kolay olan bir YPSK yöntemi ve aynı amaçla kullanılacak bir ince tabaka kromatografisi (İTK) yöntemi geliştirilmesi ile ilgili literatür bilgisine rastlanmamıştır. Ayrıca, literatürde BUP'un farmasötik formlarındaki miktar tayini konusunda çalışma bulunmamaktadır.

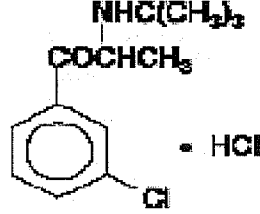
Bu çalışma ile, BUP'un plazmadaki tayinine olanak sağlayacak kolay uygulanabilen bir İTK yöntemi, BUP'un ve ana metaboliti olan Hidroksibupropion'un (HBUP) birlikte tayinini sağlayacak, duyarlılığı yüksek bir YPSK yöntemi geliştirilmesi ve ayrıca yukarıda bahsedilen yöntemlerin yanında BUP'un farmasötik tabletlerindeki tayininin spektrofotometri ve potansiyometrik ve kondüktometrik titrasyon gibi değişik yöntemlerle de gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. 254 nm'de maksimum absorpsiyon gösteren BUP ve 214 nm'de maksimum absorpsiyon gösteren HBUP'un plazmada birlikte tayinini sağlayabilmek için, YPSK cihazında aynı anda değişik dalga boylarının görüntülenmesine olanak sağlayan diyot dizisi detektörü kullanılmıştır. Ayrıca, literatürdeki uzun ve zahmetli numune hazırlama basamakları yerine, tek basamakta plazma proteinlerinin uzaklaştırılmasını sağlayan, kuvvetli bir asit olan trikloroasetik asit (TCA) ile çöktürme işlemi uygulanmış; böylece hem plazma proteinleri çöktürülmüş hem de BUP'un plazmadaki kararlılığı sağlanmıştır (Laizure ve Devane, 1985). Numuneyi deriştirme amaçlı olarak da, çözücünün uzaklaştırılması liyofilizasyon işlemi ile gerçekleştirilmiştir.

KAYNAK BİLGİSİ

Bupropion Hidroklorür

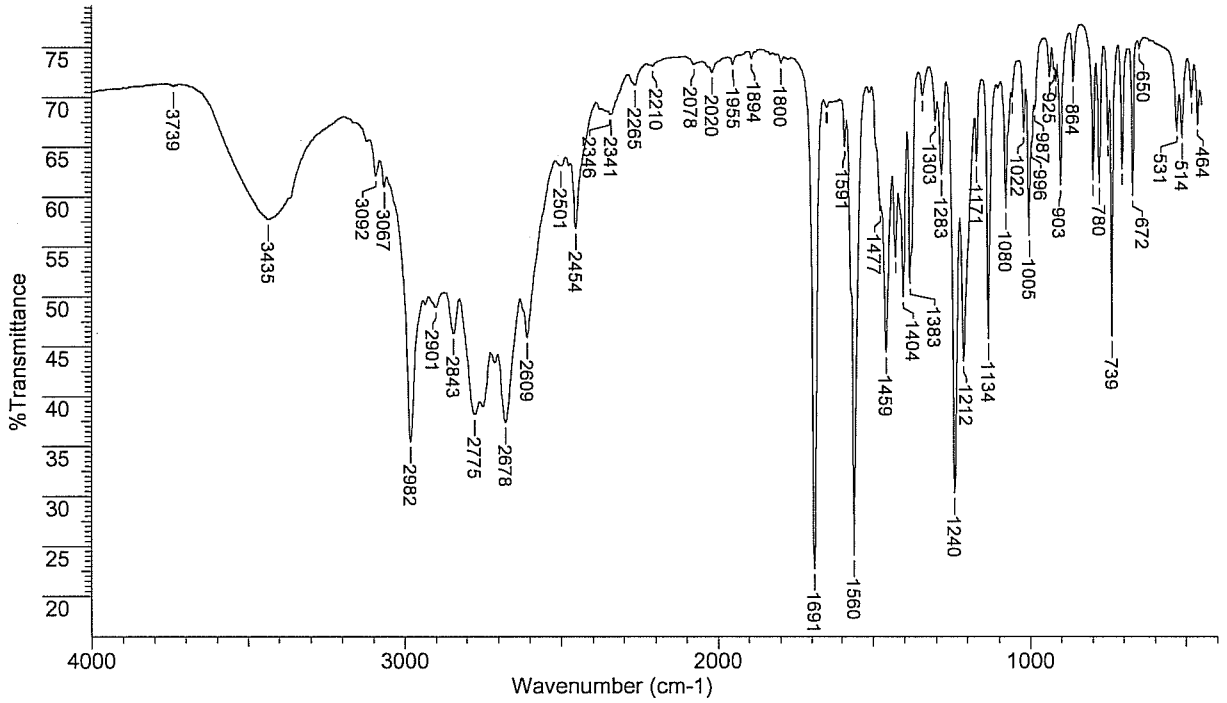
Fizikokimyasal özellikleri

Kimyasal adı (DL-2-tert-bütülamino-3'-kloropropiofenon hidroklorür) olan BUP'un kapalı kimyasal formülü $C_{13}H_{18}ClNO.HCl$ ve molekül ağırlığı 276.2 dir. BUP'un açık kimyasal formülü, **Şekil 1**'de verilmiştir. BUP, beyaz kristalli bir tozdur ve suda çok çözünür. Tadı acıdır ve oral mukozada lokal anestezi hissi uyandırır (http-1).



Şekil 1. BUP'un Açık Kimyasal Formülü

BUP'un KBr diskinde alınan FT-IR spektrumu **Şekil 2**'de verilmiştir.



Şekil 2. BUP'un FT-IR Spektrumu

Spektrum incelendiğinde 3435'deki yayvan bandın, N-H gerilme titreşimine; 2982-2678 aralığındaki piklerin amin tuzunun gerilme titreşimlerine ait olduğu düşünülmüştür. Ayrıca dalga sayısı 1691 olan kuvvetli bir karbonil grubu (C=O) gerilme titreşimi görülmektedir. Sırasıyla 1560 ve 1240 cm^{-1} deki piklerin, aromatik C=C titreşimlerine ve tersiyer bütül grubu titreşimlerine ait olabileceği düşünülmüştür. 1000 cm^{-1} in altındaki parmak izi bölgesindeki en belirgin bant,

739 cm⁻¹ de görülmüş ve aromatik halkaya bağlı klor grubunun gerilme titreşimlerine ait olduğu düşünülmüştür.

Farmakolojik özellikleri

Antidepresan etki

Majör depresyon; yoğun üzüntü, umutsuzluk, karamsarlık, ilgisizlik, suçluluk duygusu, zihinsel yavaşlama, konsantrasyon kaybı gibi belirtiler ile, uykusuzluk/aşırı uyku, iştahsızlık/aşırı iştah, enerji ve libido azalmasının yanı sıra normal günlük aktivite ritmi, beden ısısı ve pek çok endokrin fonksiyon değişikliklerinin eşlik ettiği ciddi bir hastalıktır. Genel nüfus ortamında yaşam boyu morbidite riski %10'un üstündedir ve hastaların %10-15'i intihar davranışı gösterir (Bökesoy ve ark., 2000).

Yıllardır yapılan yoğun araştırmalara karşın, depresyonun altında yatan neden/nedenler açıklık kazanamamıştır. En çok kabul gören monoamin hipotezi, depresyonun beyin monoaminlerinin işlevsel yetersizliğinden kaynaklandığını ön görür. Depresyonda eksikliği söz konusu olan monoaminler, serotonin (SE) ve noradrenalin (NA)'dir (Bökesoy ve ark., 2000; Kayaalp, 2000).

Dopamin (DA) eksikliğinin depresyona katkısının sınırlı olduğu düşünülse de DA-depresyon ilişkisini gösteren çalışmalar da mevcuttur (Willner, 1983). Antidepresan etkinlik için serotonerjik aktivite artışının gerekli olduğu, noradrenerjik aktivitenin antidepresan etkinin sürekliliğini sağladığı, DA'nın ise uyarıcı etkiden sorumlu olduğu benimsenmektedir (Bökesoy ve ark., 2000; Kayaalp, 2000).

BUP, zayıf fakat oldukça seçici bir DA geri alım (re-uptake) inhibitörüdür. Sinaptik aralığa salınan DA etkisinin, geri alım mekanizması (sinir ucu tarafından) ile sonlandırılmasını, böylece DA eliminasyonunu önler. BUP'un NA geri alım inhibisyonundaki rolü ise, DA için olanın yarısı kadardır ve etkin maddenin serotonerjik sisteme olan ilgisi çok düşüktür. BUP'un etki mekanizması tam olarak açıklanamamıştır, fakat noradrenerjik kaynaklı olduğu düşünülmektedir. BUP'un antidepresan etkisine DA katkısını gösteren bazı kanıtlar mevcutsa da bunlar çok açık değildir. BUP'un antidepresan etkisinin serotonerjik kaynaklı olmadığı bilinmektedir (Ascher ve ark., 1995).

Sigara bıraktırma etkisi

Nikotin, ufak moleküllü ve lipofilik bir madde olması nedeniyle cilt ve mukozalardan kolayca ve hızlı absorbe edilir. Absorbe edilen nikotin, dolaşım yoluyla hızlı bir şekilde beyne girer (Kayaalp, 2000).

Nikotin hedef hücrelerdeki özgül etkilerini, nikotinik tipteki asetilkolin reseptörlerini (nAChR) aktive etmek suretiyle yapar. Nikotin, sinir uçlarını kendi reseptörlerini aktive ederek depolarize eder, bu uçlarda voltaja bağımlı kalsiyum kanallarını açar ve böylece nöromediyatör (DA, SE, NA, opioid peptidler ve diğerleri gibi) salınmasını artırır.

Nikotinin psikomotor uyarıcı ve pozitif pekiştirici (keyif verici) etkisi, mezensefalonda *ventral tegmental* alanı uyatarak, nikotinik reseptörler aracılığı ile mezolimbik dopaminerjik nöronları aktive etmesine ve böylece *nucleus*

accumbens ve diğer limbik yapılarıdaki dopaminerjik sinir uçlarından DA salıverilmesini artırmasına bağlıdır (Kayaalp, 2000).

BUP'un sigara bağımlılığı tedavisindeki rolü, DA ve NA geri alım blokajına bağlanmaktadır. Ayrıca bu durum, BUP'un yüksek afinite nikotinik asetilkolin ($nA\kappa R$) reseptörlerine olan antagonist etkisi ile de ilişkili olabilir. Yukarıda açıklandığı gibi, nikotin'in keyif verici etkisinden dopaminerjik yollar sorumludur. Nikotin ve bağımlılık yapan diğer maddeler, beyin sapından *n. accumbens*'e kadar uzanan DA salgılayıcı nöronların aktivitesini artırmaktadır. BUP'un DA salgılayıcı nöronların aktivitesini azaltıcı etkisi gösterilmiş ve böylece bağımlılıkla ilişkili döngüyü deaktive edip, sigara arzusunun azaltıldığı açıklanmıştır. Buna ek olarak, BUP'un NA salgılayıcı nöronların aktivitesini azalttığı da bilinmektedir. Bu noradrenerjik etkiler, BUP'un sigara yoksunluk semptomlarını hafifletmesine katkıda bulunmaktadır (Johnston ve ark., 2002). Yukarıda verilen literatür bilgilerine göre, BUP'un sigarayı bırakırma ve antidepresan etkilerinin birbirinden bağımsız olduğu söylenebilir.

Farmakokinetik özellikleri

Sağlıklı bir gönüllüye BUP sürekli salım (SR) tableti uygulanmasından sonra 3 saat içinde BUP C_{maks} değerine ulaşılır. Her 12 saat için 150 mg lık doz sonrası, kararlı faz C_{maks} değeri yaklaşık olarak $136 \mu g \cdot L^{-1}$ dir (Johnston ve ark., 2002). BUP karaciğerde üç aktif ana metabolitine dönüşür. Bunlar hidroksibupropion (HBUP), treohidrobupropion (TBUP) ve eritrohidrobupropion (EBUP) dur. Önceden morfolinol olarak bilinen ana metaboliti HBUP, sitokrom P450 izoenzimi CYP2B6 tarafından oluşturulur. Aktif metabolitlerinin hepsi plazmada ana bileşiğe göre daha yüksek derişimde bulunur. Farelerde yapılan deneylerde HBUP'un etkisi BUP'a hemen hemen eşit düzeyde bulunmuştur, diğer metabolitlerin etki güçleri ana bileşiğin yarısı ile onda biri arasında değişir. SR farmasötik formlarının terminal yarı ömrü 21 saattir. HBUP, TBUP ve EBUP'un yarı ömür değerleri sırasıyla 20 saat, 33 saat ve 37 saattir. BUP'un proteinlere bağlanma oranı ise yaklaşık olarak % 84'tür (Johnston ve ark., 2002).

BUP Analizi Çalışmaları

Loboz ve ark., (2005) BUP ve metabolitlerinin (HBUP, TBUP ve EBUP) insan plazmasındaki tayini için seçici ve tekrar edilebilir bir YPSK yöntemi geliştirmişlerdir. Analiz, Aqua C_{18} YPSK kolon üzerinde gerçekleştirilmiş, 45:55 hacim oranında metanol ve 0.05 M fosfat tamponun (pH: 5.5) dan oluşan bir hareketli faz kullanılmıştır. UV saptama için kullanılan dalga boyları, BUP metabolitleri için 214 nm, BUP ve iç standart (IS) timolol maleat için 254 nm'dir. Ekstraksiyon geri kazanımı her analit için tekrar edilebilir ve % 55'den fazla bulunmuştur; ayrıca gün içi ve günler arası değişkenlik % 15'den azdır. Tayin alt sınırı BUP için $2.5 ng \cdot mL^{-1}$, TBUP için $5 ng \cdot mL^{-1}$, HBUP ve EBUP için $10 ng \cdot mL^{-1}$ olarak bulunmuştur. Yöntem tek doz BUP'u takiben CYP2B6 aktivitesini saptamak için önerilmektedir.

Diğer bir çalışmada Borges ve ark., (2004) BUP ve metabolitlerinin insan, fare ve sıçan plazmasında tayini için Chromolith RP 18 (50 mm x 4.6 mm) monolitik kolonun kullanıldığı SK/KS/KS metodu geliştirmişlerdir. İlave edilmiş kontrol plazma kalibrasyon standartları ve kalite kontrol numuneleri, etil asetat ile ekstrakte edilerek, 8 mM amonyum asetat ve asetonitril (55:45, h/h) den oluşan

hareketli faz $5 \text{ mL} \cdot \text{dk}^{-1}$ hızla izokratik olarak geçirilmiştir. Yöntem, BUP ve TBUP için $0.25-200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, HBUP için ise $1.25-1000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ aralığında doğrusaldır.

Zhang ve ark., (2003) BUP'un köpek plazmasındaki tayini için duyarlı ve hızlı bir YPSK yöntemi geliştirmişlerdir. Ayrıca bu yöntemle, yeni geliştirilen SR formülasyonun farmakokinetiği ve biyoeşdeğerliği araştırılmış ve normal tablet formu ile karşılaştırılmıştır. Çalışma sırasında, BUP ve IS'nin (hidroksietilfludiazepam) plazma numunelerinden ekstraksiyonu, sıvı-sıvı ekstraksiyon ile gerçekleştirilmiş ve ekstreler, 50 mmol fosfat tamponu ($\text{pH}:5.5$)-metanol ($45:55, \text{h/h}$)'ün hareketli faz olarak kullanıldığı ters faz YPSK yöntemi ile analiz edilmiştir. Yöntem BUP için seçici olup, kalibrasyon eğrileri $1-750 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ aralığında doğrusal bulunmuştur. En düşük tayin sınırı $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ dir. Yöntem iki formülasyondaki BUP'un biyoeşdeğerlik çalışmasına başarıyla uygulanmıştır.

Suckow ve ark., (1997) BUP'un fenilmorfolinol (HBUP) metabolitinin enantiyomerlerini ayırmak ve plazmadaki tayinleri için bir çift aşiral-şiral sabit faz sıvı kromatografi tekniği geliştirmişlerdir. Protein bağlı şiral sabit faz üzerinde, fenilmorfolinol (+) ve (-) stereoizomerleri, potasyum fosfat ($\text{pH} = 6.25$) ve % 5'lik 2-propanol'den oluşan hareketli faz kullanılarak ayrılmıştır. Elüe olan tüm bileşikler, UV saptama kullanılarak 214 nm 'de görüntülenmiş ve plazma kaynaklı ya da diğer psikotropik ilaçlardan gelen herhangi bir bozucu etki gözlenmemiştir. Gün içi ve günler arası değişkenlikler, çalışılan derişim aralığında % 6'dan düşük olup, fenilmorfolinol tayin alt sınırı $125 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ dir. 17 hastadan alınan plazma örneklerinin kararlı fazdayken, toplam fenilmorfolinol'ün yaklaşık % 96'sı kadar olacak şekilde, (-) enantiyomer içerdiği bulunmuştur. Bu sonuçların klinik anlamı açık değildir, çünkü önceki farmakolojik çalışmaların tümü rasemik fenilmorfolinol ile yapılmıştır.

Diğer bir çalışmada Munro ve ark., (2001) BUP enantiyomerlerinin ovomukoid bir sabit faz üzerinde ayırımı araştırmışlardır. Enantiyomerlerin şiral ayırımı 10 dakikadan kısa bir sürede gerçekleştirilmiştir. İki enantiyomer için de 0.999'lık bir korelasyon katsayısı ile, $0.27-53.0 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (ppm) derişim aralığında kalibrasyon eğrileri doğrusaldır. Yöntemin saptama sınırı ve tayin alt sınırı, sırasıyla $0.13 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ve $0.27 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ olup, sistem kesinliği % 0.2 dolayındadır.

Laizure ve DeVane'in (1985) çalışmasının amacı, ilacın plazma kararlılığını değerlendirmek, BUP ve ana metabolitlerinin farmakokinetik çalışmalarını yapabilmek için en iyi saklama koşullarını belirlemektir. Bu amaçla, insan plazmasına belirli derişimlerdeki BUP ve metabolitleri eklenmiş ve karışımlar, farklı sıcaklık, pH şartları altında inkübe edilmiştir. BUP, sıcaklık ve pH'ya bağımlı olan logaritmik doğrusal bir bozulma göstermiştir. BUP'un pH 7.4 plazmadaki yarı ömrü 22 ve 37°C 'lerde sırasıyla, 54.2 ve 11.4 saattir. 37°C 'deki inkübasyon, pH 2.5'dan 10'a kadar 48 saat için metabolit derişimleri üzerine minimum etki göstermiştir. Sonuçlar göstermiştir ki, protein bağlanma tayinlerini ve terapötik ilaç izleme sırasında ilaç derişim analizleri için plazma numunelerinin toplanması ve saklanması gerektiren çalışmalarda ilaç bozulması göz önünde tutulmalıdır.

Cooper ve ark., (1984) BUP ve üç ana metabolitinin plazmadaki tayini için bir yöntem geliştirmişlerdir. Alkali plazmadan n-heptan içindeki % 1.5 izoamil alkole (h/h) ekstraksiyonunu takiben, asitle geri yıkanmış ekstrakt, trimetilsilil ters faz materyalle kaplı kolona enjekte edilmiştir. Elüsyon, iyon çifti ajanı ve trietilamin içeren fosfat tamponu-asetonitril (80:20) hareketli fazı ile yapılmıştır. Bileşikler, UV detektör kullanılarak 214 ve 254 nm'lerde görüntülenmiştir. Yöntem, BUP için yaklaşık % 85'lik, metabolitleri için de % 98'lik bir geri kazanım sağlamaktadır. Tüm bileşenler için günler arası tekrar edilebilirlik % 4'ü geçmemektedir. Saptama sınırı, BUP için 5 ng.mL⁻¹, metabolitleri için ise 100 ng.mL⁻¹ dir. Metabolit tayini için 100 ng.mL⁻¹lik sınır, kararlı durum çalışmaları için seçilen IS derişimi ile belirlenmiştir. Tek doz farmakokinetik çalışmalarda, IS'nin kararlı durum derişiminin % 10'u kullanılmış, bu da 10 ng.mL⁻¹lik daha düşük saptama sınırına imkan sağlamıştır. BUP ve metabolitleri için kararlı durum plazma seviyeleri, sekiz farklı hasta için gösterilmiştir.

Son çalışmalar, üç halkalı antidepresanlardan farklı yapıdaki BUP'un belli hayvan türlerinde farklı şekilde metabolize edildiğini göstermektedir. Bundan yola çıkarak, Suckow ve ark.'nın (1986) yaptığı diğer bir çalışmada, hayvan modeli olarak sıçan, fare ve kobay kullanılarak BUP metabolizması değerlendirilmiştir. BUP ve ana metabolitleri olan BW 306U ve BW A494U'nun farmakokinetik profilleri, sözü edilen hayvanlara karın içi yolla 40 mg.kg⁻¹ BUP verilmesini takiben belirlenmiştir. BUP ve ana metabolitlerinin farmakokinetik profili, plazma ve beyin numunelerinden bir sıvı kromatografi prosedürü kullanılarak elde edilmiştir. İndirgenmiş BUP metaboliti BW A494U için araştırma, bu metaboliti hayvanlara karın içi yolla uygulayarak ve plazma, beyin numuneleri verilen dozdan 90 dakika sonra analiz edilerek yapılmıştır. Farmakokinetik verilerin analizi, BUP'un sıçanlarda çok hızlı metabolize edildiğini fakat herhangi bir metabolitin birikmediğini göstermiştir. BUP farelerde esas olarak BW 306U'ya metabolize edilirken, kobayda ise BW 306U'nun yanında BW A494U'ya da dönüşmektedir. Bu hayvanlarda BUP'un plazma/beyin oranları önemli bir değişiklik göstermemektedir. Fakat metabolitlerin, türler arasında plazma/beyin oranı açısından dramatik olarak değiştiği bildirilmektedir. Sıçanlarda indirgenmiş BUP (BW A494U) enjekte edildiği zaman, BW A494U plazma derişiminin yaklaşık % 3'ü BUP olarak tayin edilmiştir. Fare ve kobayda ise, daha düşük miktarlar çevrilmiştir. Bundan yola çıkarak, yapılan çalışmada BUP metabolizmasının değişik hayvan türleri arasında önemli farklılıklar gösterdiği gösterilmiştir. Kobay, sıçan ve fareyle karşılaştırıldığında insan BUP metabolizmasını yansıtan daha iyi bir model oluşturmaktadır.

Diğer bir grup çalışmada ise BUP ve üç metabolitinin farmakokinetiği incelenmiştir (Laizure ve ark., 1985; Hsyu ve ark., 1997; Stewart ve ark., 2001). Bu çalışmalardan birinde, 6 sağlıklı erkek gönüllüye oral yoldan verilen 200 mg'lık tek doz BUP sonrası, 21 adet plazma numunesi 56 saat boyunca toplanmış, Cooper ve ark.'nın (1984) geliştirdiği YPSK yöntemi ile analiz edilmiştir. Farmakokinetik analizler sonucunda, BUP, TBUP, EBUP ve HBUP'un ortalama yarı ömürleri sırasıyla 9.8, 19.8, 26.8 ve 22.2 saat olarak bulunmuştur. TBUP ve HBUP için eğri altında kalan alanlar ise, BUP için olanın sırasıyla 2.4 ve 10.3 katıdır. Bu çalışma ile, metabolitlerin sistemik dolaşımında yüksek oranda bulunduğu ve bunun sonucunda metabolitlerin ilacın klinik profilindeki olası

rollerini açıklayabilmek için ileri düzeyde çalışmaların gerekliliği ortaya konmuştur (Laizure ve ark., 1985).

Bir başka farmakokinetik çalışmada ise, sigara içme alışkanlığının genellikle ergenlik çağında başladığından yola çıkılarak, BUP'un yaşları 13 ve 18 arasında olan 75 ergen gönüllüdeki tek doz farmakokinetiği incelenmiştir (Stewart ve ark., 2001). Gönüllüler, 37'si sigara içen (18 erkek, 19 bayan) ve 38'si sigara içmeyen (19 erkek, 19 bayan) olacak şekilde sigara içme durumlarına göre sınıflandırılmıştır. 150 mg'lık tek doz BUP tablet alımını takiben 0, ½, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24, 48 ve 72 saat sonrasında plazma numuneleri toplanmıştır. Plazma numuneleri BUP ve üç metaboliti için katı faz ekstraksiyonunu takiben SK/KS/KS yöntemi ile analiz edilmiştir. Sigara içme alışkanlığının ve yaşın farmakokinetik parametreler üzerindeki etkisini değerlendirmek için faktoriyel varyans analizi kullanılmıştır. Yapılan analizler sonucunda BUP ve HBUP'un farmakokinetik parametrelerinin sigara içme alışkanlığına göre değişiklik göstermediği, fakat erkek ve bayan gönüllüler arasında önemli farklar olduğu bulunmuştur. BUP için zamana karşı plazma derişimi eğrisi altında kalan alan ($AUC_{0 \rightarrow \infty}$) değeri, dağılım hacmi, maksimum plazma derişimi (C_{maks}) ve eliminasyon yarı ömrü ($t_{1/2\beta}$) değerleri bayanlarda erkeklere göre önemli ölçüde ($p < 0.05$) yüksek bulunurken, vücut ağırlığına karşı normalize BUP atılımı (CL/f) bayanlar ve erkekler arasında değişiklik göstermemiştir. Bayanlar ayrıca HBUP için, erkeklere göre önemli ölçüde ($p < 0.05$) yüksek $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ ve C_{maks} değerleri göstermişlerdir. HBUP için AUC değerinin, BUP için olana oranı ergenlerde yaklaşık olarak 4-5 olarak bulunurken, bu değer önceki çalışmada yetişkinler için bulunan değerden düşüktür. Sonuç olarak, bu çalışma ile sigara içme durumunun ergenlerdeki tek doz BUP farmakokinetiğini etkilemediği fakat bayanların erkeklere göre BUP ve ana metaboliti HBUP'un bazı önemli farmakokinetik parametreleri yönünden farklılık gösterdiği vurgulanmıştır.

Literatürde, 150 mg'lık oral tek doz sürekli salım BUP uygulanması sonrası, sigara içme durumu bakımından farklılık gösteren iki ayrı grup gönüllüde ilaç farmakokinetiğinin incelendiği başka bir çalışma daha bulunmaktadır (Hsyu ve ark., 1997). BUP ve üç metaboliti için farmakokinetik parametreler hesaplanmış ve BUP için zamana karşı plazma derişimi eğrisi altında kalan alan ($AUC_{0 \rightarrow \infty}$) değeri, maksimum plazma derişimi (C_{maks}), C_{maks} değerine ulaşabilmek için gereken zaman (t_{maks}) ve eliminasyon yarı ömrü ($t_{1/2}$) değerleri, sigara içen ve içmeyenlerde sırasıyla $1164 \pm 220 \text{ ng.s.mL}^{-1}$ ve $1161 \pm 292 \text{ ng.s.mL}^{-1}$; $144 \pm 28 \text{ ng.mL}^{-1}$ ve $143 \pm 39 \text{ ng.mL}^{-1}$; 3.00 ± 0.50 saat ve 2.88 ± 0.49 saat; 19 ± 5 saat ve 18 ± 3 saat olarak bulunmuştur. Bu çalışmada, sigara içen ve içmeyen veya erkek ve bayan gönüllüler arasında BUP ve metabolitlerinin farmakokinetiği açısından önemli klinik farklar bulunmadığı belirtilmiştir. Bu durumdan, hasta sigara içme durumu ve cinsiyetine göre BUP dozunu ayarlamak gerekmediği sonucu çıkarılmıştır.

Önceden bahsedildiği gibi, USP 29'daki BUP monografında, BUP safsızlığı olan m-klorobenzoik asit tayini için geliştirilmiş bir İTK yöntemi bulunmaktadır. Bu çalışmada, dalga boyu olarak 235 nm kullanılmış ve toluen, sikloheksan ve glasiyel asetik asitten (47:47:6, h/h/h) oluşan hareketli faz ile İTK yöntemi uygulanmıştır (USP 29, 2006).

Ayrıca literatürde, BUP'un hücre dışı katekolamin düzeylerine olan etkisinin araştırıldığı mikrodializ çalışmaları da bulunmaktadır (Gazzara ve Andersen, 1997; Xi-Ming Li ve ark., 2002; Kusaka ve ark., 2006). Bu çalışmalarda özellikle, depresyon ve antidepresan etki ile ilişkisi bilinen ve sigara bağımlılığı ile ilgili olduğu tahmin edilen beyindeki *hypothalamus*, *frontal cortex* ve *nucleus accumbens* gibi mezokortikolimbik alanlar seçilmiştir. Çalışmalar sonucunda, BUP'un bu alanlardaki hücre dışı DA ve NA düzeyini artırdığı, SE düzeyini değiştirmediği bulunmuştur. Bu özelliklerin, bir antidepresan ve sigara bıraktırıcı ajan olarak, BUP'un klinik etkinliğini oluşturduğu düşünülmektedir (Xi-Ming Li ve ark., 2002; Kusaka ve ark., 2006).

Plazma Numunesi Hazırlamak için Kullanılan Yöntemler

Liyofilizasyon (Dondurarak kurutma)

Liyofilizasyon materyali önce dondurma, sonra süblimasyon ile su buharını dışarı çekerek kurutma işlemi olarak tanımlanabilir. Uygulanan yöntemlere bağlı olarak dondurma işlemi önceden yapılabileceği gibi doğrudan vakum altında tutarak materyalin donması da sağlanabilir.

Bu yöntem özellikle mikrobiyoloji alanında, kültürlerin korunması amacı ile yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Mikroorganizmalar ve başta çeşitli aşular olmak üzere, sperm, eritrosit, plazma, serum, organ naklinde kullanılacak çeşitli dokular, enzimler, proteinler gibi pek çok biyolojik materyal bu yöntemle korunabilmekte ve gıda sanayinde pek çok ürün bu yöntem ile elde edilmektedir. Bunların dışında, çeşitli biyolojik çalışmalarda özellikle hastalıklı dokuların saklanması gibi uygulamalarda dondurarak kurutma yönteminden yararlanılmaktadır (http-2).

Liyofilizasyon işlemi genellikle koruma yöntemi olarak bilinmesine karşın, doktora tezi kapsamında yapılan çalışmalarda, plazma bileşimindeki su ve plazma proteinlerini çöktürme sırasında eklenen çözücüyü uzaklaştırmak, yani numuneyi deriştirmek amacı ile kullanılmıştır. Liyofilizasyon işlemi için öncelikle numunenin dondurulması gerektiğinden çözücünün cinsi büyük önem taşımaktadır. Örneğin plazma proteinlerini çöktürmek amacıyla yaygın olarak kullanılan organik çözücülerden biri olan metanol, donma noktasının çok düşük olması (DN: -98°C) ve -80°C'de dondurulamaması nedeniyle bu çalışmada kullanılamamıştır (http-3). Aynı amaçla asetonytril kullanılabilir olmasına karşın (DN: -48°C), etkin maddenin plazmadaki kararlılığını sağlamak amacıyla organik çözücülere göre daha az miktarı yeterli olan kuvvetli asitlerden TCA, (%10, a/h) tercih edilmiştir. Plazma proteinleri çöktürme işlemi ve bu amaçla kullanılan ajanlar, aşağıda geniş olarak açıklanmaktadır.

Plazma proteinlerini çöktürme işlemi

Prensip

Biyoanalizlerde kullanılan numuneler; endojen makromoleküller, küçük moleküller, metabolik ürünler ve tuzların yanında büyük ölçüde protein içerirler. Seçici bir yöntem geliştirebilmek için sözü edilen bileşenlerin numuneden uzaklaştırılması gerekmektedir ve çoğunlukla seçiciliği sağlamak için kullanılan ekstraksiyon yöntemleri, optimum çözücü ve pH şartlarını gerektirmekte, dolayısıyla karmaşık ve zaman alıcı olmaktadır.

Proteinlerin biyolojik numuneden uzaklaştırılması önemlidir; çünkü bu proteinler kromatografik sisteme verildiğinde, hareketli faz içeriğinde bulunan organik çözücüler ve tampon tuzları ile etkileşerek çökmekte ve bu durum, geri basıncı artırarak analitik kolonun ömrünün azalmasına neden olmaktadır.

Proteinleri numuneden uzaklaştırmak amacı ile yaygın olarak kullanılan yöntem, organik çözücüler, iyonik tuzlar ve inorganik asitler yardımıyla proteinlerin çöktürülmesi işlemidir. Çöktürülen kütle, santrifüjle veya süzerek ayrılmakta ve süzüntü kullanılarak analiz gerçekleştirilmektedir (Wells, 2003).

Çöktürücü ajan olarak kullanılan asitler

Trikloroasetik asit (TCA; %10, a/h), perklorik asit (%6, a/h) ve metafosforik asit (%5, a/h) gibi bazı asitler, belirtilen derişimlerde proteinlerin bazik bölgelerinin protonlanmasını sağlayarak konformasyonlarını değiştirip, izoelektrik noktalarının altındaki bir pH'da çözünmeyen tuzlar meydana getirirler. Bilindiği gibi, izoelektrik nokta protein molekülünün yüksüz olduğu pH'dır. Bu noktanın üzerindeki pH'larda protein molekülü baz olarak hareket ederken, altındaki pH'larda asit olarak davranır. İzoelektrik noktaya karşılık gelen pH değerinde bir protein minimum viskoziteye sahiptir ve daha kolay topaklaşabilir. Yukarıda sözü edilen asitler, çok etkili protein çöktürücü ajanlardır, fakat genellikle SK ve SK-KS sistemlerine doğrudan enjekte edilen dayanıksız moleküller için sert ve aşındırıcı oldukları düşünölmektedir. Buna karşın, çok küçük miktarlarda yüksek verim sağlamaları nedeniyle, özellikle TCA'nın kullanıldığı çok sayıda SK ve SK-KS çalışması bulunmaktadır (Wells, 2003).

Çöktürücü ajan olarak kullanılan organik çözücüler

Organik çözücüler, protein çözeltilerinin dielektrik sabitlerini azaltarak protein-protein etkileşimini artırır. Metanol, etanol, asetonitril ve aseton gibi çözücüler protein çöktürme derecesi bakımından asitlere göre daha az etkili olmalarına karşın, bozunmaya neden olmadıkları ve daha yumuşak ortam şartları sağladıkları için tercih edilirler. Bu organik çözücüler, SK hareketli fazlarıyla geçimlidirler ve kromatografik sisteme doğrudan enjekte edilebilirler.

Organik çözücüler arasında metanol ve asetonitril en sıklıkla kullanılanlardır. Metanol, proteini uzaklaştırılacak matriks ile eşit oranda kullanıldığı zaman asetonitril kadar etkili olmamasına karşın; beyaz, floküle bir çökelti oluşturmakta, bu da karıştırmayı kolaylaştırarak süzüntünün daha berrak olmasını sağlamaktadır (Wells, 2003).

Çöktürücü ajanların kullanılan miktarları

Proteinlerin etkin şekilde uzaklaştırılması için, çöktürücü ajan miktarının numune matriksine (plazma gibi) oranı önemlidir. Asitler, 1 hacim plazmaya karşı 0.2 hacim TCA veya 0.4 hacim HClO₄ gibi düşük oranlarda yüksek verim (>% 98) sağlamaktadırlar. Organik çözücüler ise, **Çizelge 1**'de açıklandığı gibi daha yüksek hacimler gerektirmektedir. Proteinlerin uzaklaştırılması için 1 hacim plazma ile 1 hacim asetonitril kullanıldığı zaman, % 97.2'lik bir verim elde edilirken, 1 hacim plazma ile 3 hacim asetonitril kullanıldığında % 99.8 değerinde maksimum verim oluşmaktadır. Metanol kullanıldığı zaman, 1:1 oranında % 73.4'lük düşük bir verim, 1:3 oranında ise % 98.9'luk bir verim elde edilmekte, ancak 1:4 oranı ile, % 99.2'lik verime ulaşabilmektedir. Plazmadan proteinlerin çöktürülmesi için en iyi sonuçlar, 1 hacim plazmaya karşı 3 hacim asetonitril veya 4 hacim metanol kullanıldığında elde edilmektedir (Wells, 2003).

Çizelge1. Çöktürücü Ajanların, Çöktürülen Plazma Proteini Oranında % Bağlı Etkinlikleri (Wells, 2003)

Çöktürücü	Süzüntünün pH'sı	0.6 hacim	1 hacim	2 hacim	3 hacim	4 hacim
Asetonitril	8.5-9.5	45.8	97.2	99.7	99.8	99.8
Aseton	9.0-10	33.6	96.2	99.4	99.2	99.1
Metanol	8.5-9.5	32.2	73.4	98.7	98.9	99.2
Etanol	9.0-10	41.7	91.4	98.3	99.1	99.3
%10 TCA	1.4-2.0	99.6	99.5	99.8	99.8	99.8
%10 HClO ₄	<1.5	98.9	99.1	99.1	99.1	99.0
%5 HPO ₄	1.6-2.7	98.1	98.3	98.4	98.2	98.1

Diğer protein çöktürücü ajanlar

Doymuş sulu amonyum sülfat gibi hidrate tuz iyonları, protein-su etkileşimi için gerekli olan su moleküllerini azaltarak protein çözünürlüğünü düşürürler. Çinko ve bakır gibi kuvvetli metal katyon tuzları, (-) yüklü karboksil grupları ile etkileşerek proteinin net yükünü ve çözünürlüğünü değiştirirler. Bu metal tuzları, çok etkili çöktürücü ajanlar olmalarına karşın, biyoanalizler için fazla tercih edilmezler; çünkü uçucu olmayan bu tuzlar SK-KS teknikleriyle geçimli değildir. Protein çöktürmek amacıyla kullanılan en tipik metal tuzu, 0.5 N NaOH içerisinde hazırlanan çinko sülfat heptahidrat (%10, a/h) dir. Ayrıca, çinko tuzunun organik bir çözücü ile kombinasyonunun, organik çözücünün (örn. asetonitril) tek başına kullanıldığı duruma göre daha etkili olduğu görülmüştür.

Çinko ve bakır tuzları kromatografik sisteme doğrudan enjekte edilemeyeceği için, diğer teknikler için numune hazırlama ön basamağı olarak kullanılabilir.

Literatürde bazı yararlı çöktürücü ajan kombinasyonları verilmiştir. Bunlardan biri, 1 hacim numune için 1:5 oranında kullanılmış olan, % 0.1 formik asit içeren asetonitril ve etanol (9:1) karışımıdır. Başka bir çalışmada, aynı kombinasyona % 0.1 asetik asit eklenmiştir. Ayrıca, 1:1 oranında % 1 asetik asit içeren metanol veya asetonitril karışımları da kullanılmıştır. Diğer örnekler; 1:2 numune-çözücü oranında kullanılmış olan % 0.1 trifluoroasetik asit içeren asetonitril ve 250 µL plazma için 200 µL metanol ve 25 µL HClO₄ karışımıdır (Wells, 2003).

Protein çöktürme yönteminin yararları

Protein çöktürme yöntemi, basitliği ve geniş uygulama alanı nedeniyle, özellikle plazmadaki küçük ilaç molekülleri için tercih edilmektedir. Genellikle, diğer yöntemlerin aksine, pH ayarlaması gerektirmez; çünkü maddenin iyonize olması veya olmaması yöntemin başarısı için önemli değildir. Bu yöntem için hızlı olması önemli bir özellik olup, validasyon öncesi yöntem geliştirmek için çok az zaman harcanmasını sağlar.

Protein çöktürme yöntemi, pahalı çözücü ve ekipman gerektirmediği gibi her laboratuvarında kolaylıkla uygulanabilir ve analiz maliyeti düşüktür. Yöntemin diğer bir özelliği, numuneye zarar vermemesidir.

Bu yöntem ile, yüksek oranda (% 99) proteinlere bağlanan analitler için % 95'in üzerinde yüksek geri kazanım elde edilmektedir. Ayrıca, numune izolasyon ve transfer basamakları gerekmediğinden, proteinler çok küçük miktardaki numuneden (20-50 µL plazma) etkili bir şekilde uzaklaştırılmaktadır (Wells, 2003).

Protein çöktürme yönteminin sakıncaları

Protein çöktürme yönteminin en önemli sakıncası, numuneyi 3 veya daha fazla oranda seyreltmesidir. Bu nedenle, genellikle analit derişiminin yüksek olduğu ve saptama sınırının tayine izin verdiği durumlarda yararlıdır. Ancak seyreltme etkisini önlemek için süzütünün azot veya ısı uygulamasıyla uçurulması mümkündür. Isı uygulaması, kararlı olmayan moleküller için mümkün olamamaktadır.

Literatürde ayrıca, protein uzaklaştırılmasının tamamlanamadığı durumlarda (%95-99), diğer yöntemlere gerek duyulabileceği belirtilmiştir. Bu nedenle, çöktürücü ajan seçiminde dikkatli olma gerekliliği ortaya çıkmakta ve bu çalışmada kullanılmış olan TCA gibi çok etkili bir ajan gerekmektedir (Wells, 2003).

GEREÇLER

Kimyasal Maddeler

Asetonitril	: Merck, Almanya
BUP	: GlaxoSmithKline, Türkiye
CBZ	: Sigma, Amerika
Etanol	: Tekel, Türkiye
Etil Asetat	: Merck, Almanya
Glasiyel Asetik Asit	: Merck, Almanya
HBUP	: GlaxoSmithKline, Türkiye
HCl (% 37)	: Carlo Erba, İtalya
HClO ₄ (% 60)	: Merck, Almanya
Hidroksi Metil Selüloz	: Sigma, Amerika
H ₂ O ₂ (% 30)	: Merck, Almanya
1-HSA	: Merck, Almanya
Kloroform	: Merck, Almanya
Laktoz Monohidrat	: Sigma, Amerika
Magnezyum Stearat	: Sigma, Amerika
Metanol	: Merck, Almanya
NaOH	: Riedel-de Haen, Almanya
NH ₃	: Merck, Almanya
Nişasta	: Sigma, Amerika
O-Fosforik Asit (% 85)	: Merck, Almanya
Petrol Eteri	: Merck, Almanya
Polietilen Glikol 4000	: Sigma, Amerika
Povidon	: Sigma, Amerika
Sodyum Dihidrojen Fosfat	: Merck, Almanya
Talk	: Sigma, Amerika
TCA	: Merck, Almanya
Titanyum dioksit	: Sigma, Amerika
Wellbutrin® Tablet	: GlaxoSmithKline, Amerika
Zyban® Tablet	: GlaxoSmithKline, Türkiye

Cihazlar ve Diğer Gereçler

Buzdolabı	: Arçelik, No Frost&Electronic, Türkiye
FT-IR Spektrometresi	: Perkin Elmer, Spectrum 100, Almanya
Hassas Terazi	: Ohaus, E12140, İsviçre
YPSK	: Shimadzu, LC-10AT, Japonya Shimadzu CBM-10A sistem kontrol ünitesi Shimadzu SPD-M10A detektör
YPSK Kolonu	: Agilent Technologies, Zorbax Eclipse XDB- C ₈ 4.6 x 150 mm, 3.5µm, Amerika
İTK	: Camag, Linomat V, İsviçre Camag İTK III tarayıcı Camag şırınga
Kondüktometre	: MultiLine, P4, Almanya
pH Metre	: Electro-mag, M822, Türkiye
Santrifüj	: Hettich, EBA 20, Almanya
Spektrofotometre	: Shimadzu, UV-2401 PC, Japonya
Su Banyosu	: Memmert, WB14, Almanya
İTK Plağı	: Merck, silika jel 60F-254, 20x10 cm, 250 µm, Almanya
Ultra Saf Su Cihazı	: Millipore, Synthesis A 10, Fransa
Ultrasonik Banyo	: Ultrasonic, LC30, Almanya
Vorteks Karıştırıcı	: Nüvemiks, NM110, Türkiye

YÖNTEMLER

BUP'un Potansiyometrik ve Kondüktometrik Titrasyon Yöntemleri ile Farmasötik Tabletlerinde Miktar Tayini

Tablet numune çözeltilerinin hazırlanması

Tablet numunelerinin hazırlanması için, 150 mg BUP içeren 10 adet Wellbutrin® tablet ağırlığı tam olarak tartıldıktan sonra tabletler havanda toz edilmiş ve ağız sıkı kapanan ve ışık geçirmeyen bir kaba konulmuştur. Bir tabletin ortalama ağırlığı hesaplanarak bu ağırlığa karşılık gelen miktar tam tartıldıktan sonra, üzerine 30 mL ultra saf su ilave edilerek iyice karışması sağlanmış ve normalitesi okzalik asit kullanılarak ayarlanmış olan, 0.1000 N NaOH ile titre edilmiştir.

Kondüktometrik titrasyon ile ilgili deneysel koşullar

150 mg BUP içerdiği bilinen farmasötik tabletlerde kondüktometrik titrasyon ile miktar tayini için, hazırlanan tablet numuneleri 0.1000 N NaOH ile titre edilmiş ve eklenen NaOH hacmine karşı, kondüktometrede okunan iletkenlik değerleri kaydedilmiştir. Daha sonra buradan hareketle, düzeltilmiş iletkenlik değerleri aşağıda verilen formül ile hesaplanmıştır.

$$\Lambda = \frac{V + v}{V} \cdot \Lambda_0$$

Burada, V : çözeltilinin başlangıç hacmini (mL), v : eklenen titrant hacmini (mL), $V+v/V$: düzeltilmiş hacim değerini, Λ_0 : kondüktometrede okunan iletkenlik değerini, Λ ise düzeltilmiş iletkenlik değerini ifade etmektedir.

Düzeltilmiş NaOH hacmine karşı, düzeltilmiş iletkenlik değerleri grafiğe geçirildiğinde birbirini kesen iki doğru elde edilmektedir. Bu iki doğru üzerinden seçilen 5'er noktanın doğrusal regresyon ile doğru denklemlerinin ($y=ax+b$) bulunması ve bulunan iki doğru denkleminin eşitlenmesiyle elde edilen x değeri, dönüm noktasını vermektedir. Bulunan dönüm noktaları ve bu dönüm noktalarından yola çıkarak tablet içerikleri hesaplanmıştır. Aynı deneyler, tablet yardımcı maddelerinin kondüktometrik titrasyonu etkilemediğini göstermek için, bir kere de tablet matriksi ile yapılmıştır.

Ayrıca hücre sabiti (k), derişimi ve öziletkenlik değeri bilinen standart KCl çözeltisi yardımıyla $6.82 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Potansiyometrik titrasyon ile ilgili deneysel koşullar

Öncelikle pH metre pH 4, pH 7 ve pH 10 standart tamponları ile kalibre edilmiştir. Hazırlanan tablet numuneleri 0.1000 N NaOH ile titre edilmiş ve eklenen NaOH hacmine karşı, okunan pH değerleri kaydedilmiştir. Bu işlem sırasında, NaOH'in dönüm noktası civarında daha sık aralıklarla ilave edilmesi ve eklenen NaOH sonrası pH metrenin sabit bir pH değerini göstermesi için beklenmesi gerekmektedir.

Eklenen NaOH hacmine karşılık gelen pH değerleri grafiğe geçirildiğinde sigmoidal bir eğri elde edilmektedir. Eğrinin I. ve II. türevi hesaplanarak, eklenen NaOH hacmine karşı grafiğe geçirilmiş ve dönüm noktaları bulunmuştur.

İletkenlik titrasyonlarında olduğu gibi, deneyler tablet matriksi ile tekrarlanmıştır.

BUP'un UV-Spektrofotometri ve İkinci Türev Spektrofotometri Yöntemleri ile Farmasötik Tabletlerinde Miktar Tayini

DeneySEL koşulların hazırlanması

Çözeltilerin UV ve türev spektrumları, 1 cm'lik kuartz hücreler içinde, 200-350 nm dalga boyu aralığında, 1 nm yarık genişliği ve 2 nm türev aralığı ($\Delta\lambda$) kullanılarak kaydedilmiştir.

Spektrofotometrik yöntemlerin validasyonu

Spektrofotometrik yöntemlerin validasyonu için kesinlik, doğrusallık, duyarlılık (saptama sınırı ve tayin alt sınırı) ve doğruluk çalışmaları yapılmıştır (ICH Q2(R1), 2005).

Kesinlik (Precision)

Spektrofotometrik tayin için öncelikle 3.8×10^{-3} M derişimde % 100 metanol içeren bir stok çözelti hazırlanmıştır ve bu çözeltilerden gerekli seyreltme yapılarak, BUP'un 200-350 nm aralığındaki UV ve II. türev spektrumunun kaydedilmesi için 5×10^{-5} M derişimdeki BUP çözeltisi kullanılmıştır. Tüm çözeltiler, hacimce % 2'lik metanol içerisinde hazırlanmış ve kör olarak hacimce % 2'lik metanol çözeltisi kullanılmıştır. Yöntem kesinliği, 4.14×10^{-5} M'lık derişimde BUP kullanılarak gün içi ve günler arası tekrar edilebilirliği belirlemek için incelenmiş ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Doğrusallık (Linearity)

UV-spektrofotometri yönteminin doğrusallığını incelemek amacıyla, 2.07×10^{-5} - 7.25×10^{-5} M derişim aralığında BUP'un beş ayrı çözeltisi hazırlanmış ve birbirini takip eden üç gün için 252 nm'deki absorbans değerleri ölçülmüştür. II. türev spektrofotometrik analizler için ise, aynı kalibrasyon aralığındaki çözeltilerin 217.4 nm dalga boyundaki minimum absorbans değeri ile 221.8 nm dalga boyundaki maksimum absorbans değeri ölçülmüş ve bu absorbans değerlerinin farkı alınarak, birbirini takip eden üç gün için iki pik arasındaki uzaklıklar hesaplanmıştır.

Saptama sınırı ve tayin alt sınırı (LOD and LOQ)

BUP'un iki farklı spektrofotometrik yöntemle saptama sınırı (Limit of Detection, LOD) ve tayin alt sınırı (Limit of Quantification, LOQ) değerlerinin belirlenmesi amacıyla, [kalibrasyon denkleminin kesim değerlerinin standart sapması/kalibrasyon denkleminin eğimi] oranı sırasıyla 3.3 ve 10 ile çarpılarak spektrofotometrik yöntemlerin saptama sınırı ve tayin alt sınırı değerleri hesaplanmıştır.

Doğruluk (Accuracy)

Yöntemlerin doğruluğunu araştırmak için, tableti oluşturan etkin madde dışındaki maddelerden oluşan bir matriks ortamı hazırlanması, etkin maddenin bu matrikse eklenmesi ve yapılan ölçüm sonunda matriks ortamındaki yüzde geri kazanımın belirlenmesi yolu izlenmiştir (Shabir, 2003). BUP'un farmasötik şekli olan Zyban® ve Wellbutrin® tablet için yapılan literatür araştırmasında, yardımcı madde olarak karnauba mumu, sistein hidroklorür, mikrokristalin selüloz, hypromellose, magnezyum stearat, polietilen glikol, polisorbitat 80, titanyum

dioksit ve ayrıca FD&C boyadan oluşan aynı tablet içeriği verilmektedir (http-1). **Çizelge 2'**de verilen yardımcı maddeler; ortalama tablet ağırlığı ve BUP içeriği göz önüne alınarak belirtilen oranlarda karıştırılmış ve tablet matriks çözeltisi hazırlanmıştır.

Çizelge 2. Tablet Matriks Çözeltisini Hazırlamak için Kullanılan Yardımcı Maddeler ve Yüzdeleri

Kullanılan Yardımcı Maddeler	Yüzdeleri (%)
Hidroksi Propil Metil Selüloz	7
Laktoz Monohidrat	60
Magnezyum Stearat	1
Polietilen Glikol 4000	5
Nişasta	5
Povidon	5
Talk	1
Titanyum Dioksit	1

Matriks çözeltisinin hazırlanması sırasında, standart BUP çözeltisi ile aynı analitik koşulların sağlanmasına özen gösterilmiştir. Kalibrasyon eğrisinin verilen aralığında bulunan üç farklı derişimdeki standart BUP çözeltisi (2.07×10^{-5} , 4.14×10^{-5} , 6.21×10^{-5} M) matriks çözeltisine eklenerek karıştırılmış ve önerilmiş olan spektrofotometrik yöntemler kullanılarak ölçümler yapılmıştır. BUP içeriğine karşılık gelen absorbans ve absorbans farkı değerleri kalibrasyon eşitliğinde çözülerek; yüzde geri kazanım, yüzde bağıl hata ve tekrar edilebilirlik hesaplanmıştır. Yüzde bağıl hata değerlerinin hesaplanması için,

$$\% \text{ BH} = [(\text{ölçülen derişim} - \text{eklenen derişim}) / \text{eklenen derişim}] \times 100$$

eşitliği kullanılmıştır.

Tablet numune çözeltilerinin hazırlanması

150 mg BUP içerdiği bilinen farmasötik tabletlerde miktar tayini için hazırlanan tablet numuneleri optimum koşullarda analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, doğrusallık bölümünde, iki farklı yöntem için verilen kalibrasyon eşitliklerinde çözülerek BUP içeren tabletlerdeki miktarlar ve karşılık gelen yüzdeleri hesaplanmıştır. Wellbutrin® tablet için spektrofotometrik yöntemlerle elde edilen tablet analizi sonuçlarının, potansiyometrik ve kondüktometrik titrasyon sonuçları ile karşılaştırılması amacıyla, GraphPAD istatistiksel analiz yazılımı kullanılarak ANOVA testi yapılmıştır.

BUP'un İTK Yöntemi ile Farmasötik Tabletlerinde Miktar Tayini

İTK yöntemi ile ilgili deneysel koşullar

Numuneler alüminyum plaklar üzerine, 5 mm genişliğinde bantlar halinde, 150 nL.s⁻¹ lik sabit bir uygulama hızı ile iki bant arası uzaklık 9.4 mm olacak şekilde ayarlanarak uygulanmıştır. Etanol-kloroform-glasiyel asetik asit (30:10:1, h/h/h) den oluşan hareketli faz, kromatografi için 20 mL'lik hacimlerde kullanılmıştır. Sürüklenme, hareketli faz ile doyurulmuş 20x10 cm'lik cam tanklarda gerçekleştirilmiştir. Tankın hareketli faz ile oda sıcaklığında doygunluk zamanı 30 dakika ve maddenin sürüklenme uzunluğu 8 cm olarak belirlenmiştir. Sürüklenme sonrası, plaklar kurutucu yardımıyla kurutulmuş, densitometrik tarama 254 nm'de döteryum lamba kullanılarak, 20 mm.s⁻¹'lik sabit bir tarama hızı ile gerçekleştirilmiştir. Yarık boyutları 3.00x0.45 mm'dir.

İTK yönteminin validasyonu

İTK yönteminin validasyonu için kesinlik, doğrusalılık, duyarlılık (saptama sınırı ve tayin alt sınırı), doğruluk, özgünlük, sağlamlık ve tutarlılık çalışmaları yapılmıştır (ICH Q2(R1), 2005).

Kesinlik (Precision)

İTK deneyleri için öncelikle metanol içerisinde 1 mg.mL⁻¹'lik BUP stok çözeltisi hazırlanmış ve bu çözelti metanol ile 1/10 oranında seyreltilerek, 100 µg.mL⁻¹'lik çözelti elde edilmiştir. Bu çözelti kullanılarak 6, 8 ve 10 µL olmak üzere üç ayrı hacimde uygulama yapılmış, BUP'un 600, 800 ve 1000 ng.spot⁻¹'lik derişimlerde gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlikleri araştırılmıştır.

Verilen derişimlerde elde edilen pik alanı sinyalleri, yöntemin kesinliğinin gösterilmesi için istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Doğrusallık (Linearity)

100 µg.mL⁻¹'lik BUP çözeltisinden 2-10 µL arasında beş ayrı hacimde uygulama yapılarak, 200-1000 ng.spot⁻¹ derişim aralığındaki BUP çözeltilerinin birbirini takip eden 3 günde pik sinyalleri kaydedilmiş ve artan BUP derişimleri ile karşılık gelen pik alanı değerleri arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Saptama sınırı ve tayin alt sınırı (LOD and LOQ)

BUP'un İTK yöntemiyle LOD ve LOQ değerlerinin belirlenmesi amacıyla, kör madde olan metanol beş defa uygulanmış ve sinyal/gürültü oranı belirlenmiştir. Bu oran, sırasıyla 3 ve 10 ile çarpılarak, hesaplamalar yapılmıştır.

Doğruluk (Accuracy)

İTK yönteminin doğruluğunu araştırmak için, spektrofotometrik yöntemlerle aynı yol izlenmiş ve matris çözeltilerinin hazırlanması için, aynı yardımcı maddeler kullanılmıştır. Kalibrasyon eğrisinin verilen aralığında bulunan üç farklı derişimdeki standart BUP çözeltisi (600, 800 ve 1000 ng.spot⁻¹) matris çözeltilerine eklenerek karıştırılmış ve İTK yöntemi kullanılarak her bir set için 5 uygulama yapılmak suretiyle optimum koşullarda ölçülmüştür. BUP içeriğine karşılık gelen pik alanı değerleri kalibrasyon eşitliğinde çözülerek; yüzde geri kazanım, doğruluk ve tekrar edilebilirlik hesaplanmıştır.

Özgünlük (Specificity)

Yöntem özgünlüğü, standart BUP ve tablet numunesi analiz edilerek değerlendirilmiştir. Numunenin spektrumu ile standart maddenin spektrumu pik başlangıç noktası, tepe noktası ve bitiş noktası olmak üzere üç ayrı noktada karşılaştırılmış ve aralarındaki ilişki korelasyon değeri ile ifade edilmiştir.

Sağlamlık (Robustness)

Yöntem sağlamlığı için; hareketli faz bileşimi, glasiyel asetik asit miktarı, hareketli faz hacmi ve tankın doyumluk süresinde küçük değişiklikler yapılarak, sonuçlar incelenmiştir. Değişik bileşimlerde etanol-kloroform-glasiyel asetik asitten oluşan hareketli fazlar (31:9:1 ve 29:11:1, h/h/h) denenmiş ve kromatogramlar elde edilmiştir. Ayrıca, hareketli faz içerisindeki glasiyel asetik asit miktarı, hareketli faz hacmi ve tankın doyumluk süresi sırasıyla 1.0 ± 0.5 mL (0.5, 1 ve 1.5 mL), 20 ± 2 mL (18, 20 ve 22 mL) ve 30 ± 10 dakika (20, 30 ve 40 dakika) olarak değiştirilmiştir. Yöntem sağlamlığı için 1000 ng.spot⁻¹'lik derişimlerde her parametre için üç ayrı uygulama yapılmış ve pik alanlarının % BSS ve SH değerleri hesaplanmıştır.

Tutarlılık (Ruggedness)

1000 ng.spot⁻¹'lik derişimde BUP çözeltisi hazırlanmış, 0. gün ve 6, 12, 24, 48 ve 72 saat sonra olmak üzere değişik zamanlarda analiz edilmiştir. Her zaman dilimi için üçer uygulama yapılmış ve yöntem tutarlılığını değerlendirmek amacıyla pik alanlarının % BSS değerleri hesaplanmıştır.

BUP için hızlandırılmış kararlılık testi

BUP metanol içerisinde çözülerek, 1 mg.mL⁻¹'lik bir stok çözelti hazırlanmış ve bu çözelti hızlandırılmış kararlılık testleri için kullanılmıştır. Bu çözelti; asit, baz, hidrojen peroksit, kuru ve nemli ısı, fotokimyasal ve UV (254 nm) ışık ile muamele edilmiş, elde edilen sonuçlar bozunma ürünlerinin R_f değerleri, BUP için yüzde geri kazanım ve % BSS değerleri yönünden değerlendirilmiştir.

Asit ve baz etkisi

2.5 mL stok çözelti üzerine 2.5 mL 1N HCl ve 1N NaOH'den ayrı ayrı eklenmiş ve bu karışımlar 70°C sıcaklıkta 30 dakika bekletilmiştir. Diğer yandan asit ve baz etkisini kaldırmak ve numunenin polaritesini azaltmak için bu prosedüre bir nötralizasyon basamağı eklenmiştir. 2.5 mL stok çözelti üzerine 2.5 mL 1N HCl ve 1N NaOH'den eklenip, bu karışımlar 70°C sıcaklıkta 30 dakika bekletildikten sonra çözeltiler pH 7'ye 1N HCl ve 1N NaOH yardımıyla getirilmiştir. Asit ve bazla muamele, ışık etkisini ortadan kaldırabilmek için karanlık ortamda gerçekleştirilmiş ve İTK plakları üzerine bu nötral ve nötral olmayan çözeltilerden 2 µL uygulanarak (1000 ng.spot⁻¹), hareketli faz yardımıyla yürütülmüş ve densitometrik tarama yapılarak, sonuçlar elde edilmiştir.

Hidrojen peroksit etkisi

2.5 mL stok çözelti üzerine 2.5 mL % 30'luk hidrojen peroksit çözeltisi eklenmiş ve bu çözelti (500 µg.mL⁻¹ BUP) hidrojen peroksit fazlasını uzaklaştırmak için 10 dakika süreyle kaynar su banyosunda bekletilmiştir. Aynı çözelti daha sonra, 80°C sıcaklıkta 1 saat 15 dakika süreyle bekletilerek, İTK plakları üzerine 2 µL

hacimlerde ($1000 \text{ ng.spot}^{-1}$) uygulanmıştır. Deneyler, asit ve bazla muamele deneylerinde olduğu gibi, ışık etkisini ortadan kaldırmak için karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir.

Kuru ve nemli ısı etkisi

Toz madde 100°C 'lik etüvde 2 saat bekletilmiş ve kuru ısıya maruz bırakılmış BUP'un metanoldeki stok çözeltisi hazırlanmış ve $\frac{1}{2}$ oranında seyreltilerek, $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ 'lik çözelti elde edilmiştir. Bu çözeltilerden, İTK plakları üzerine $2 \mu\text{L}$ hacimlerde uygulanarak ($1000 \text{ ng.spot}^{-1}$) hareketli faz yardımıyla yürütülmüştür.

Nemli ısı etkisi için ise, $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ 'lik BUP çözeltisi 1 saat süreyle kaynar su banyosunda bekletilmiş ve $2 \mu\text{L}$ hacimlerde ($1000 \text{ ng.spot}^{-1}$) İTK plakları üzerine uygulanmıştır.

Fotokimyasal ve UV ışık etkisi

İlacın fotokimyasal kararlılığını araştırmak için, stok çözeltilerden hazırlanan $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ 'lik BUP çözeltisi 3 gün süreyle (9:00'dan 17:00'a kadar, toplam 24 saat) doğrudan güneş ışığına maruz bırakılmış, UV etkisini araştırmak için ise, BUP çözeltisi UV lamba altında (254 nm) 8 saat bekletilmiştir. Her iki çözelti de $2 \mu\text{L}$ hacimlerde ($1000 \text{ ng.spot}^{-1}$) İTK plakları üzerine uygulanmış ve ortalama pik alanları hesaplanmıştır.

Tüm kararlılık çalışmalarında, her uygulama sonrası ($1000 \text{ ng.spot}^{-1}$) ortalama BUP pik alanı beş tekrar sonrası belirlenmiştir.

BUP farmasötik dozaj şeklinin kararlılığının araştırılması

BUP farmasötik dozaj şeklinin kararlılığının araştırılması amacıyla tablet analizleri bir de son kullanma tarihi geçmiş Wellbutrin SR[®] tabletlerle (150 mg BUP, LOT: 1J1889, SKT: 05/2003) gerçekleştirilmiş ve sonuçlar BUP içeriği ve olası bozunma olaylarına karşı değerlendirilmiştir.

İlgili safsızlıkların saptanması

İlgili safsızlıkların saptayabilmek için, yüksek derişimde BUP uygulaması yapılmıştır. 1 mg.mL^{-1} 'lik BUP çözeltisi hazırlanarak, bu çözelti numune çözeltisi olarak adlandırılmış ve numune çözeltisi $1/10$ oranında seyreltilerek standart çözelti oluşturulmuştur. Numune çözeltilerinden $5 \mu\text{L}$ ($5000 \text{ ng.spot}^{-1}$), standart çözeltilerden de $1 \mu\text{L}$ (500 ng.spot^{-1}) hacimde olacak şekilde İTK plağına 5'er kez uygulanmış, elde edilen pik alanları istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Tablet numune çözeltilerinin hazırlanması

Tablet numunelerinin hazırlanması için, 150 mg BUP içeren 10 adet Zyban[®] tablet ağırlığı tam olarak tartıldıktan sonra tabletler havanda toz edilmiş ve ağız sıkı kapanan ve ışık geçirmeyen bir kaba konulmuştur. Bir tabletin ortalama ağırlığı hesaplanıp, bu ağırlığa karşılık gelen miktar üzerinden tartım alınarak metanol ile çözülmüş ve ağız kapalı bir kaptaki 30 dakika sonike edildikten sonra 5000 devir/dakika da santrifüj edilerek 1 mg.mL^{-1} 'lik stok çözelti hazırlanmıştır. Daha sonra, standart çözeltilerde olduğu gibi metanol ile $1/10$ oranında seyreltilerek, $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ 'lik numuneler elde edilmiştir. Numuneler, plaklara $10 \mu\text{L}$ 'lik hacimlerde uygulanmış, yürütme ve densitometrik tarama işlemlerinden sonra

elde edilen pik alanları, karşılık geldikleri derişimi belirlemek için kalibrasyon eşitliğinde çözümlenerek tablet içerikleri hesaplanmıştır.

BUP'un İTK Yöntemi ile Plazmada Miktar Tayini

DeneySEL koşullar

BUP'un farmasötik tabletlerindeki miktar tayini için kullanılan deneysel şartlar kullanılmıştır. Boş plazma örnekleri, Anadolu Üniversitesi Hastanesi Laboratuvarı'ndan temin edilmiş ve analiz edilene kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Örnek hazırlama

Plazma ile çalışılırken, girişim yapan maddelerin uzaklaştırılması için öncelikle plazma proteinlerinin çöktürülmesi gerekmektedir. Bu amaçla, metanol gibi organik bir çöktürücü ile TCA (% 10) ve HClO₄ gibi asitler denenmiştir. BUP çözeltisi katılmış olan plazma örneklerine, çöktürücü ajanlardan uygun oranlarda katıldıktan sonra, karışım 1 dakika süreyle vorteks yardımıyla karıştırılmış ve 10 dakika süreyle 5000 devir/dakika'da santrifüj edilmiştir. Oluşan çökelti uzaklaştırıldıktan sonra, üstteki berrak kısımdan alınan çözelti vakum altında buharlaştırılmıştır. Bu işlemin çok uzun sürmesi ve BUP'un plazma içerisinde yalnız asidik pH'da kararlı olup, diğer pH'larda ısıya duyarlı olduğunun bilinmesi nedeniyle, çözücünün uçurulması amacıyla liyofilizasyon işlemi tercih edilmiştir (Laizure ve Devane, 1985). Liyofilizasyon işleminde, çözücünün donmuş olması gerektiğinden, proteinlerin çöktürülmesi amacıyla metanol kullanılamamış, en uygun sonuçlar, TCA (% 10, a/h) ile elde edilmiştir (Wells, 2003). Böylece BUP'un plazma içerisindeki kararlılığı da sağlanmıştır.

İTK yönteminin plazmadaki validasyonu

İTK yönteminin plazmadaki validasyonu için doğrusalılık, kesinlik, geri kazanım ve duyarlılık (saptama sınırı ve tayin alt sınırı) çalışmaları yapılmıştır (Shah ve ark., 2000).

Doğrusallık (Linearity)

Öncelikle, BUP'un ultra saf su içerisinde 1 mg.mL⁻¹'lik stok çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra, 300 µL plazma örneğine bu stok çözeltiden 30 µL katılarak, plazma proteinleri 170 µL TCA (% 10, a/h) ile çöktürülmüştür. Alınan 250 µL'lik süzüntü liyofilizasyon işleminden sonra 250 µL metanol içerisinde çözümlenerek, 60 µg.mL⁻¹'lik BUP çözeltisi elde edilmiştir. İTK plaklarına bu çözeltiden 2-10 µL arasında değişik hacimlerde uygulanarak, 120-600 ng.spot⁻¹ derişim aralığındaki kalibrasyon seti belirlenmiş ve analizler gerçekleştirilmiştir.

Kesinlik ve geri kazanım oranı (Precision and Recovery)

Plazmadan mutlak geri kazanım oranı, kalibrasyon doğrusunu kapsayan derişim aralığında 3 farklı derişimdeki (360, 480 ve 600 ng.spot⁻¹) standart BUP katılmış plazma örneklerinin 3 farklı günde, her biri için beşer kez olacak şekilde analiz edilmesiyle belirlenmiştir. TCA (% 10, a/h) ile proteinlerin çöktürülmesi, liyofilizasyon ve kromatografi işlemlerinden sonra pik alanları, aynı şekilde hazırlanan aynı derişimdeki BUP'un sudaki çözeltileri için elde edilen pik alanları ile kıyaslanmıştır.

Yöntemin kesinliğinin incelenmesi amacıyla, aynı şekilde hazırlanmış olan 360, 480 ve 600 ng.spot⁻¹'lik derişimlerde BUP katılmış plazma örnekleri kullanılmıştır. Analizler gün içerisinde 5 kez tekrarlanmış ve günler arası tekrar edilebilirlik aynı plazma örnekleri ile 3 farklı günde çalışılarak belirlenmiştir.

Saptama sınırı ve tayin alt sınırı (LOD and LOQ)

BUP'un plazmada İTK yöntemiyle saptama sınırı ve tayin alt sınırı değerlerinin belirlenmesi amacıyla, [kalibrasyon denkleminin kesim değerlerinin standart sapması/kalibrasyon denkleminin eğimi] oranı hesaplanmış ve bu oran, sırasıyla 3.3 ve 10 ile çarpılarak, yöntemin LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır.

BUP'un YPSK Yöntemi ile Farmasötik Tabletlerinde Miktar Tayini

YPSK yöntemi ile ilgili deneysel koşullar

BUP ve CBZ (IS)'nin kromatografik ayrımı, C₈ kolon üzerinde ve 10 mM 1-heptansülfonik asit (1-HSA) içeren metanol/asetonitril/fosfat tamponundan (20 mM, pH 3.0) (40:10:50, h/h/h) oluşan hareketli faz kullanılarak yapılmıştır. 1.0 mL.dk⁻¹'lik akış hızında çalışılmış ve diyot dizisi detektörü kullanılarak 254 nm'de saptama yapılmıştır. CBZ, metanol içinde çözülerek hazırlanmış ve analizlerin tümünde 8.38x10⁻⁶ M'lik derişimde kullanılmıştır.

Geliştirilmiş olan YPSK yönteminin sistem uygunluğu, LC10A veritabanı kullanılarak değerlendirilmiştir. Enjeksiyon tekrar edilebilirliği, aynı çözeltiyi (7.16x10⁻⁶ M) sekiz defa enjekte ederek, % BSS'nin hesaplanması yoluyla belirlenmiştir. Sistem uygunluk testleri, BUP piki için kapasite faktörü, ayırım (resolution), kuyruklanma faktörü, teorik tabaka sayısı, alıkonma zamanı ve enjeksiyon tekrar edilebilirliğinin % BSS'si gibi parametreleri içermektedir.

YPSK yönteminin validasyonu

YPSK yönteminin validasyonu için kesinlik, doğrusalılık, duyarlılık (saptama sınırı ve tayin alt sınırı), doğruluk, özgünlük, sağlamlık ve tutarlılık çalışmaları yapılmıştır (ICH Q2(R1), 2005).

Kesinlik (Precision)

Ultra saf su içerisinde ve 3.58x10⁻⁵ M ve 3.58x10⁻⁶ M derişimlerde iki ayrı BUP stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden gerekli seyreltmeler yapılarak BUP'un 1.79x10⁻⁶, 5.37x10⁻⁶ ve 8.95x10⁻⁶ M derişimlerde çözeltileri hazırlanmış ve gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlikler araştırılmıştır. Verilen derişimlerde elde edilen alan oranları, yöntemin kesinliğinin gösterilmesi için istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Doğrusallık (Linearity)

Yöntem doğrusallığını incelemek amacıyla, 3.58x10⁻⁵ M ve 3.58x10⁻⁶ M derişimlerdeki BUP stok çözeltilerinden 50-300 µL arasında yedi ayrı hacimde alınarak, 4.48x10⁻⁷-1.78x10⁻⁵ M derişim aralığındaki kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur. Birbirini takip eden 3 günde BUP çözeltilerinin pik sinyalleri kaydedilerek, artan BUP derişimleri ile karşılık gelen pik alan oranı (BUP pik alanı/ IS pik alanı) değerleri istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Saptama sınırı ve tayin alt sınırı (LOD and LOQ)

BUP'un YPSK yöntemiyle LOD ve LOQ değerlerinin belirlenmesi amacıyla, spektrofotometrik yöntemler ve İTK yöntemi ile aynı yol izlenmiştir.

Doğruluk (Accuracy)

Yöntemin doğruluğunu araştırmak için, spektrofotometrik yöntemler ve İTK yöntemi ile benzer yol izlenmiştir. Kalibrasyon eğrisinin verilen aralığında bulunan üç farklı derişimdeki standart BUP çözeltisi (1.79×10^{-6} , 5.37×10^{-6} ve 8.95×10^{-6} M) matriks çözeltisine eklenerek karıştırılmış ve YPSK yöntemi kullanılarak her bir set için 7 uygulama yapılmak suretiyle optimum koşullarda ölçülmüştür. BUP içeriğine karşılık gelen alan oranı değerleri kalibrasyon eşitliğinde çözülerek, yüzde geri kazanım, doğruluk ve tekrar edilebilirlik değerleri hesaplanmıştır.

Özgünlük (Specificity)

Yöntem özgünlüğünü incelemek amacıyla, standart BUP çözeltileri (3.58×10^{-5} M) ayrı ayrı 0.1 N HCl, 0.1 N NaOH ve % 3'lük H_2O_2 içerisinde hazırlanmış ve bu çözeltiler hem oda sıcaklığında hem de $60^\circ C$ sıcaklıkta muamele edilmiştir. Daha sonra 15, 30, 45, 60, 90 ve 120 dakika gibi değişik zamanlarda numune alınarak, IS eklenmiş ve son derişimi 8.95×10^{-6} M olacak şekilde seyreltikten sonra, analiz edilmiştir.

Sağlamlık (Robustness)

5.37×10^{-6} M derişimde ve üçlü uygulamalarla; pH (2.9 ve 3.1), akış hızı (0.9 ve 1.1 mL.dk⁻¹), fosfat derişimi (18 ve 22 mM), 1-HSA derişimi (8 ve 12 mM) ve dalga boyu (252 ve 256 nm) olmak üzere önemli parametrelerdeki küçük değişiklikler sonucunda pik alan oranlarının % BSS ve SH değerleri hesaplanmıştır.

Tutarlılık (Ruggedness)

Yöntem tutarlılığı, geliştirilen metodun 5.37×10^{-6} M'lık BUP derişiminde, aynı cihaz ile farklı analizciler tarafından farklı günlerde uygulanması ile gösterilmiştir.

Tablet numune çözeltilerinin hazırlanması

Zyban® tablet numunelerinin hazırlanması için, İTK yönteminde belirtilen yol izlenmiştir. Daha sonra, standart çözeltilerde olduğu gibi ultra saf su ile seyreltilerek, kalibrasyon eğrisinin orta noktasına karşılık gelen derişimde (5.37×10^{-6} M) numuneler elde edilmiştir. Tablet numuneleri söz edilen optimum koşullarda analiz edilmiş, sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

BUP ve HBUP'un YPSK Yöntemi ile Plazmada Miktar Tayini

DeneySEL koşullar

BUP'un farmasötik tabletlerindeki miktar tayini sırasında kullanılmış olan YPSK cihazı ve analitik kolon ile deneyler gerçekleştirilmiştir. DeneySEL şartlar, BUP ve HBUP'un ayırımına izin verecek şekilde değiştirilerek, metanol-asetonitril-fosfat tamponu (10 mM, pH=3) (40:10:50, h/h/h) ve 20 mM 1-HSA içeren hareketli faz ile 1 mL.dk⁻¹ akış hızında, 254 ve 214 nm dalga boyları kullanılarak analizler

yapılmış ve bu koşullarda IS olarak tablet analizinde olduğu gibi CBZ (8.38×10^{-6} M) kullanılmıştır.

Örnek hazırlama

Plazma örnekleri hazırlanırken, İTK yönteminde belirtildiği gibi TCA (% 10, a/h) ile plazma proteinlerinin çöktürülmesi, bu proteinler uzaklaştırıldıktan sonra liyofilizasyon işlemi ile çözücünün uçurulması yani numunenin deriştirilmesi işlemi uygulanmıştır. Literatürde en iyi sonucun, 1:0.6 oranında plazma ve TCA ile elde edildiği fakat protein çöktürme işlemi için 1:0.2 oranında TCA'nın yeterli olduğu belirtildiği için, 650 µL plazma üzerine 300 µL TCA ve toplam hacmi 50 µL olacak şekilde BUP ve HBUP çözeltisi eklenerek, karışım 1 dakika süreyle vorteks yardımıyla karıştırılmış ve 10 dakika süreyle 5000 devir/dakika'da santrifüj edilmiştir (Wells, 2003). Oluşan çökelti uzaklaştırıldıktan sonra, liyofilizasyon işlemi uygulanmış ve içerik 60 µL CBZ (IS) çözeltisi ve 240 µL metanol içerisinde çözülerek sisteme enjekte edilmiştir.

YPSK yönteminin plazmadaki validasyonu

YPSK yönteminin plazmadaki validasyonu için doğrusalılık, kesinlik, geri kazanım ve duyarlılık (saptama sınırı ve tayin alt sınırı) çalışmaları yapılmıştır (Shah ve ark., 2000).

Doğrusallık (Linearity)

Yöntem doğrusalığını incelemek amacıyla, 5.38×10^{-4} M ve 5.38×10^{-5} M derişimlerde iki ayrı BUP stok çözeltisi, aynı zamanda 1.22×10^{-3} M ve 1.22×10^{-4} M derişimlerde HBUP stok çözeltileri kullanılmıştır. Çözeltilerin hepsi ultra saf su içerisinde hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden BUP ve HBUP'un toplam hacmi 50 µL olmak üzere, çeşitli derişimlere karşılık gelecek şekilde farklı hacimlerde 650 µL plazmaya eklenmiş ve 300 µL TCA ile plazma proteinleri çöktürülmüştür. Süzütüden 500 µL alınarak, dondurulmuş, liyofilize edilmiş ve liyofilizasyondan sonra 60 µL'si IS çözeltisi olacak şekilde, 300 µL metanolde çözülerek sisteme enjekte edilmiştir. Böylece BUP için 8.97×10^{-7} - 1.79×10^{-5} M derişim aralığında, HBUP için ise, 2.03×10^{-6} - 5.49×10^{-5} M derişim aralığında kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur. Aynı işlem bir kez de plazma yerine ultra saf su kullanılarak tekrarlanmış ve standart BUP ve HBUP'un doğrusalıkları araştırılmıştır.

Birbirini takip eden 3 günde, plazmaya eklenmiş olan BUP ve HBUP çözeltilerinin pik sinyalleri kaydedilerek, artan derişimler ile karşılık gelen pik alan oranı değerleri istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Kesinlik ve geri kazanım oranı (Precision and Recovery)

Yöntem kesinliğinin incelenmesi amacıyla, plazmaya aynı anda eklenen BUP'un 1.43×10^{-6} , 3.59×10^{-6} ve 1.79×10^{-5} M derişimlerde, HBUP'un ise 2.03×10^{-6} , 4.88×10^{-6} ve 6.10×10^{-5} M derişimlerde gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlikleri araştırılmış ve elde edilen alan oranları, yöntemin kesinliğinin gösterilmesi için istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Saptama sınırı ve tayin alt sınırı (LOD and LOQ)

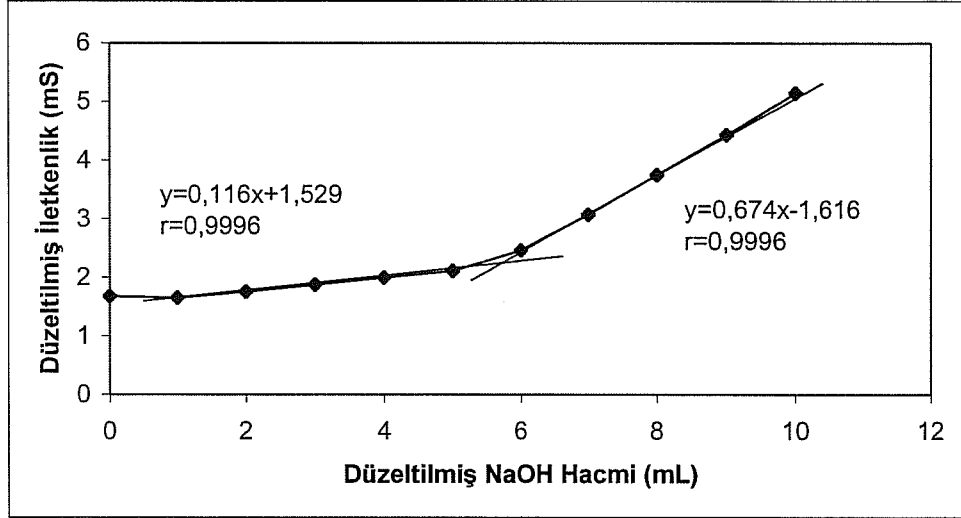
Bu amaçla, BUP'un YPSK yöntemiyle farmasötik tabletlerindeki tayini için kullanılan yöntem kullanılmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

BUP'un Potansiyometrik ve Kondüktometrik Titrasyon Yöntemleri ile Farmasötik Tabletlerinde Miktar Tayini

Kondüktometrik titrasyon yönteminin farmasötik tabletlerdeki uygulaması

Düzeltilmiş NaOH hacmine karşı, düzeltilmiş iletkenlik değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle, oldukça yüksek korelasyon katsayısına sahip doğru denklemleri ve buradan elde edilen doğru denklemlerinin eşitlenmesiyle birbirine çok yakın dönüm noktaları elde edilmiştir (n=6) (Şekil 3).



Şekil 3. BUP Tablet Numunesinin (150 mg) 0.1000 N NaOH ile Kondüktometrik Titrasyon Grafiği

Dönüm noktaları eşitlikte yerine konularak tablet içeriği hesaplanmış ve elde edilen dönüm noktaları ile birlikte Çizelge 3'de gösterilmiştir.

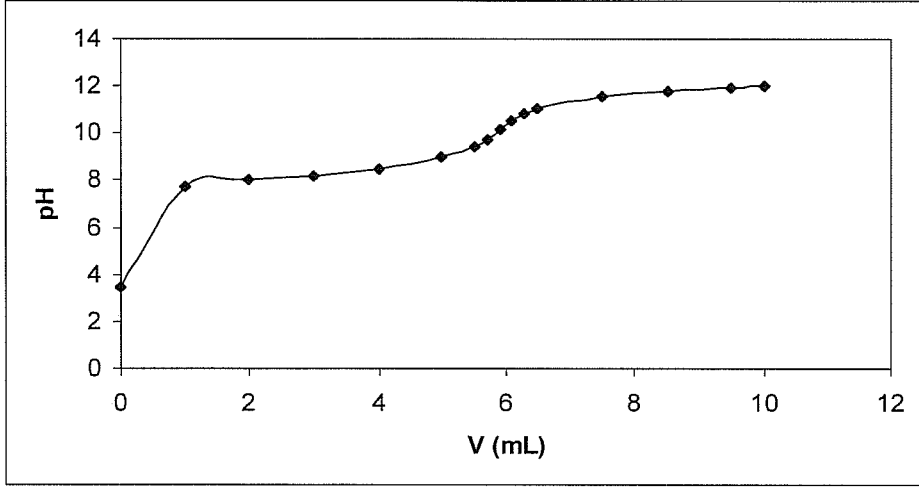
Çizelge 3. Kondüktometrik Titrasyon ile Elde Edilen Dönüm Noktaları ve BUP'un Farmasötik Tabletlerindeki Miktar Tayini Sonuçları

	Dönüm Noktaları (mL)	Tablet İçeriği
Ortalama (n=6)	5.86	160.2
SS	0.10	2.70
% BSS	1.74	1.69

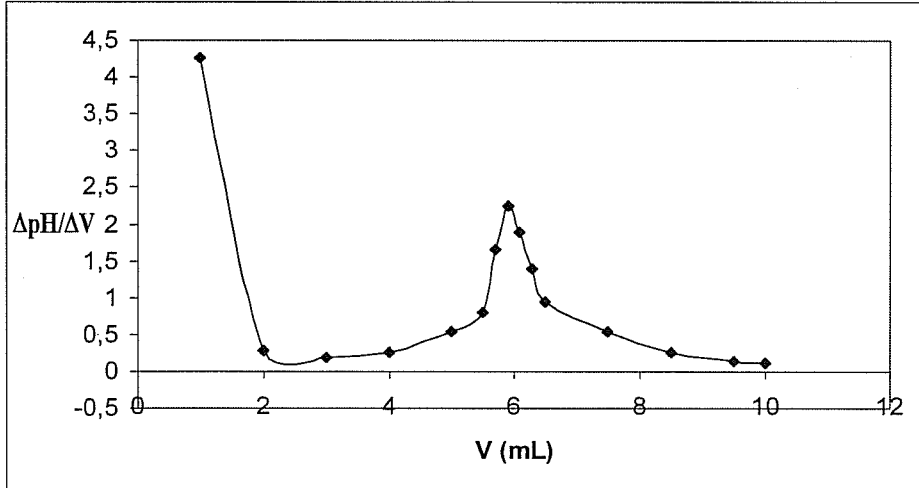
Deneyler, seçiciliği göstermek amacıyla tablet matriksi ile tekrarlanıp, düzeltilmiş iletkenlik değerleri düzeltilmiş NaOH hacmine karşı grafiğe geçirildiğinde, beklenildiği şekilde sadece eklenen NaOH'den kaynaklanan iletkenlik artışı ve tek bir doğru grafiği elde edilmiştir. Böylece, iletkenliğe tablet yardımcı maddelerinin katkısının olmadığına ve BUP'un seçici olarak titre edildiğine karar verilmiştir.

Potansiyometrik titrasyon yönteminin farmasötik tabletlerdeki uygulaması

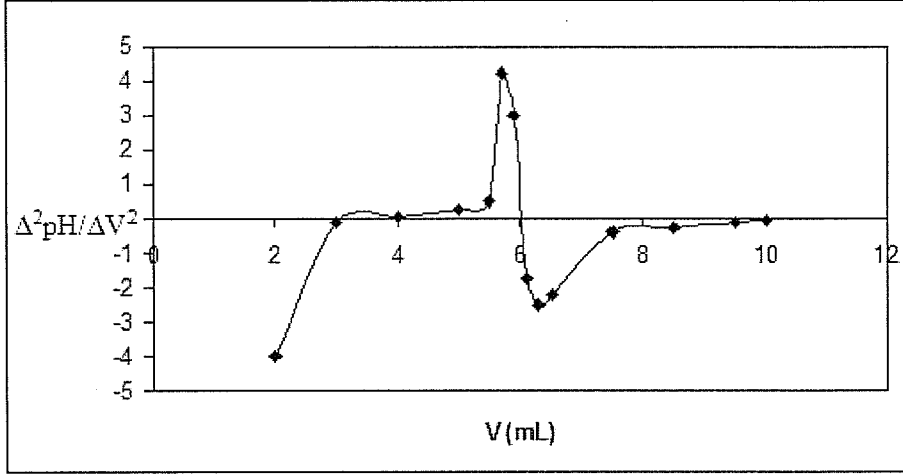
Eklenen NaOH hacmine karşı, pH değerleri grafiğe geçirildiğinde S eğrisi elde edilmektedir. Daha sonra pH değerlerinin I. ve II. türevleri hesaplanarak, eklenen NaOH hacmine karşı grafiğe geçirilmiş ve dönüm noktaları bulunmuştur. Grafikler, **Şekil 4-6'**da verilmiştir. Grafiklerdeki V (mL), düzeltilmiş hacim değerlerini göstermektedir.



Şekil 4. BUP Tablet Numunesinin (150 mg) 0.1000 N NaOH ile Potansiyometrik Titrasyon Eğrisi



Şekil 5. BUP Tablet Numunesinin (150 mg) 0.1000 N NaOH ile Potansiyometrik Titrasyonunda I. Türev Eğrisi



Şekil 6. BUP Tablet Numunesinin (150 mg) 0.1000 N NaOH ile Potansiyometrik Titrasyonunda II. Türev Eğrisi

Dönüm noktaları eşitlikte yerine konularak tablet içeriği hesaplanmış ve elde edilen dönüm noktaları ile birlikte Çizelge 4’de gösterilmiştir.

Çizelge 4. Potansiyometrik Titrasyon ile Elde Edilen Dönüm Noktaları ve BUP’un Farmasötik Tabletlerindeki Miktar Tayini Sonuçları

	Dönüm Noktaları (mL)	Tablet İçeriği
Ortalama (n=5)	6.00	164.9
SS	0.07	1.39
% BSS	1.18	0.84

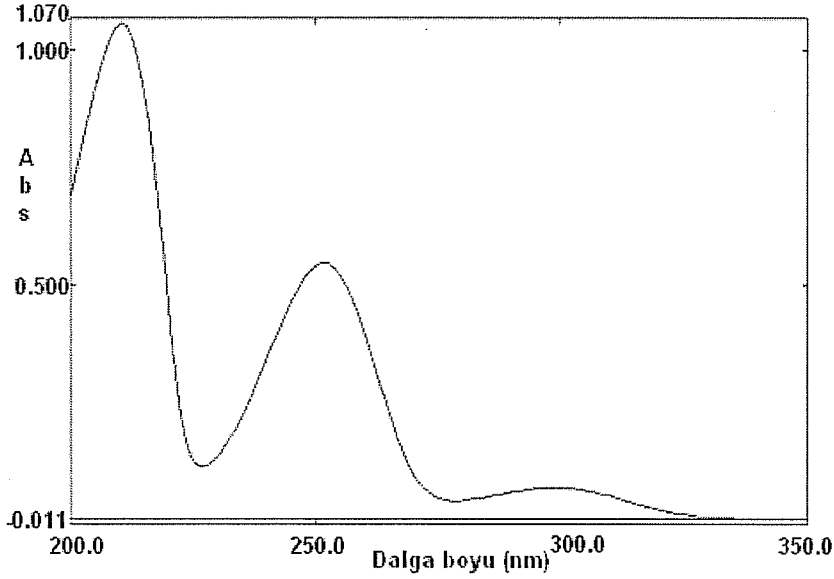
USP 29, (2006)’da birim etkin madde içeriği için sağlanması gerekli bulunan koşullar bildirilmektedir. Farmakopeye göre, 10 adet tablet ölçümü yapılmasının ardından etkin madde içeriğinin % 90-110 aralığında bulunması gereklidir. Potansiyometrik ve kondüktometrik yöntemlerle yapılan ölçümlerde, Wellbutrin® tablet içeriği farmakopenin gerektirdiği aralıkta bulunmuştur.

Tablet matriksi ile yapılan potansiyometrik titrasyon değerlendirildiğinde **Şekil 4**’deki gibi bir eğri elde edilememiş; NaOH ilavelerine karşılık okunan pH değerleri önce hafif bir artış göstermiş, daha sonra sabit kalmıştır. Sonuç olarak, tablet yardımcı maddelerinin yapılan potansiyometrik titrasyonu etkilemediği söylenebilir.

BUP’un UV-Spektrofotometri ve İkinci Türev Spektrofotometri Yöntemleri ile Farmasötik Tabletlerinde Miktar Tayini

Spektroskopik yöntemlerin optimizasyonu

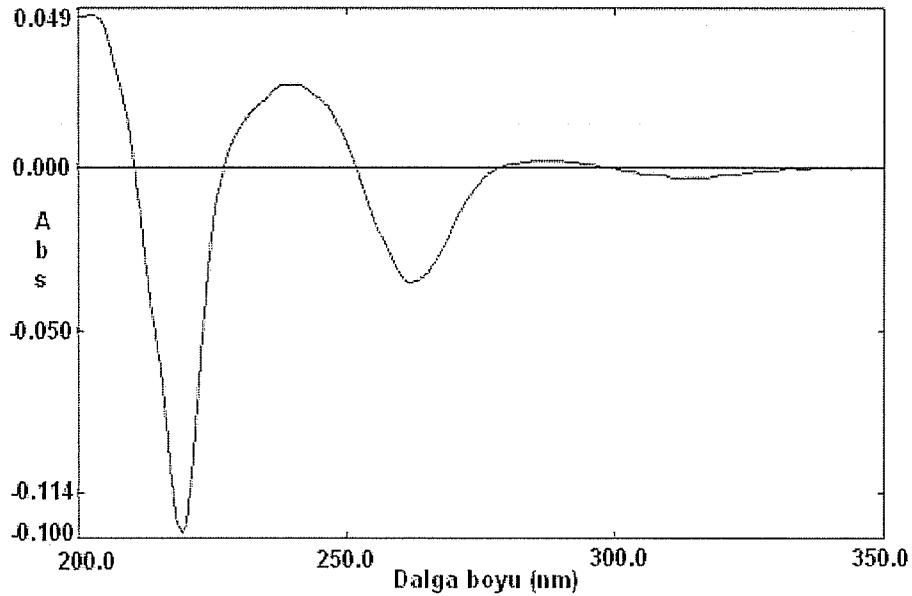
Öncelikle UV alandaki çalışma dalga boyunu belirlemek için, 5×10^{-5} M BUP çözeltisinin 200-350 nm dalga boyu aralığında UV spektrumu kaydedilmiştir. BUP’un 200-350 nm dalga boyu aralığında, % 2 metanol (h/h) içeren çözücü ortamındaki absorbans spektrumu **Şekil 7**’de verilmektedir.



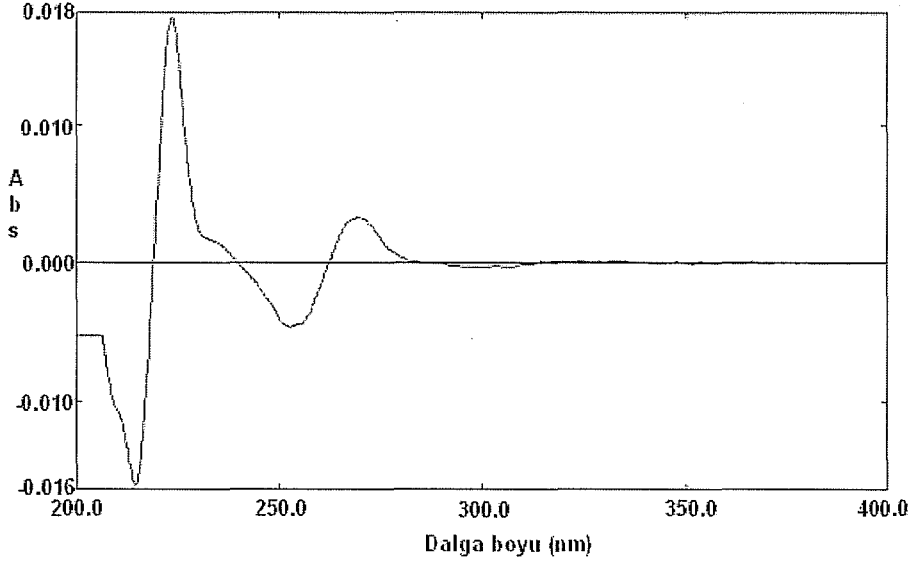
Şekil 7. % 2 Metanol İçerisindeki Standart BUP (5×10^{-5} M) Çözeltisinin 200-350 nm Aralığındaki UV-Spektrumu

Şekil 7’de görüldüğü gibi, 200-350 nm dalga boyu aralığında BUP’un en yüksek absorbans verdiği dalga boyları, 210 ve 252 nm olarak gözlenmiş ve olası girişimlerden kaçınmak için UV alandaki dalga boyu değeri olarak 252 nm seçilmiştir.

Türev spektrofotometri yöntemi için ise, alınan UV spektrumundan hareketle 1 nm yarı genişliği ve 2 nm türev aralığında ($\Delta\lambda$) maddenin I. ve II. türev spektrumları kaydedilmiştir. BUP’un 200-350 nm dalga boyu aralığında, % 2 metanol (h/h) içeren çözücü ortamındaki I. ve II. türev spektrumları Şekil 8 ve 9’da verilmektedir.



Şekil 8. % 2 Metanol İçerisindeki Standart BUP (5×10^{-5} M) Çözeltisinin 200-350 nm Aralığındaki I. Türev Spektrumu



Şekil 9. % 2 Metanol İçerisindeki Standart BUP (5×10^{-5} M) Çözeltisinin 200-400 nm Aralığındaki II. Türev Spektrumu

Şekil 8’de görüldüğü gibi, 200-350 nm dalga boyu aralığındaki I. türev spektrumunda 219.2, 239.8 ve 262.4 nm dalga boylarında sırasıyla -0.112 , 0.026 , ve -0.035 absorbans değerleri kaydedilmiştir. Bu absorbans değerleri kullanılabilir nitelikte olmasına karşın, II. türev spektrumunun daha keskin pikler vermesi nedeniyle ve literatürdeki bir çalışmadan yola çıkarak, “pikten pike” metodu için BUP’un II. türev spektrumu dikkate alınmıştır (Tatar ve Sağlık, 2002). BUP’un II. türev spektrumunda en düşük ve en yüksek absorbans verdiği dalga boyları 217.4 ve 221.8 nm’de gözlenmiş ve bu dalga boylarındaki iki pik arası uzaklık ölçülerek değerlendirilmeler yapılmıştır.

Spektroskopik yöntemlerin validasyonu

Keskinlik (Precision)

UV-spektrofotometri yöntemi için, 4.14×10^{-5} M’lık derişimde gün içi ve günler arası kesinlik değerleri sırasıyla 0.80 ve 0.22 dir. II. türev spektrofotometri yöntemi için ise yine aynı derişimde 1.91 ve 5.53 değerleri elde edilmiştir. II. türev spektrofotometri yönteminin günler arası kesinlik değeri yüksek olmakla birlikte diğer sonuçlar, geliştirilen spektrofotometrik yöntemlerle yüksek düzeyde tekrar edilebilirlik elde edildiğini göstermektedir.

Doğrusallık (Linearity)

BUP’un 2.07×10^{-5} - 7.25×10^{-5} M derişim aralığındaki beş ayrı çözeltisinin iki ayrı spektrofotometrik yöntemle analiz sonuçları ve bu yöntemler için yapılan karşılaştırmalı istatistiksel değerlendirmeler, **Çizelge 5**’de verilmektedir.

Çizelge 5. 2.07×10^{-5} - 7.25×10^{-5} M Derişim Aralığındaki BUP'un İki Farklı Spektrofotometrik Yöntemle Doğrusallık Sonuçları

Parametreler	UV-Spektrofotometri (gün=3, n=5)	II. Türev Spektrofotometri (gün=3, n=5)
Eğim, a	10980	838.2
Kesim, b	-0.045	-0.005
Korelasyon Katsayısı, r	0.9993	0.9993
Eğimin Standart Hatası	85.92	6.62
Kesimin Standart Hatası	0.004	0.0003
LOD (M)	2.73×10^{-6}	8.20×10^{-7}
LOQ (M)	8.26×10^{-6}	2.48×10^{-6}

Çizelge 5'de görüldüğü gibi yapılan istatistiksel hesaplamalarda, BUP'un tabletlerdeki miktar tayinine izin verecek ölçüde, oldukça yüksek korelasyon katsayısına sahip, kesim değeri sıfıra yakın doğrusal eşitlikler elde edilmiştir.

Saptama sınırı ve tayin alt sınırı (LOD and LOQ)

UV-spektrofotometri yöntemi için, saptama sınırı 2.73×10^{-6} M ve tayin alt sınırı 8.26×10^{-6} M olarak hesaplanmıştır. II. türev spektrofotometri yöntemi için ise aynı şekilde hesaplama yapılarak saptama sınırı 8.20×10^{-7} M, tayin alt sınırı 2.48×10^{-6} M olarak bulunmuştur. Görüldüğü gibi, II. türev spektrofotometri yöntemi ile UV-spektrofotometri yöntemine göre daha düşük saptama sınırı ve tayin alt sınırına ulaşılabilmektedir.

Doğruluk (Accuracy)

Kalibrasyon eğrisinin verilen aralığında bulunan üç farklı derişimdeki standart BUP çözeltisi (2.07×10^{-5} , 4.14×10^{-5} , 6.21×10^{-5} M) için yüzde geri kazanım ve yüzde bağıl hata değerleri, UV-spektrofotometri ve II. türev spektrofotometri yöntemleri için sırasıyla **Çizelge 6 ve 7'**de verilmiştir.

Çizelge 6. UV-Spektrofotometri Yöntemi ile Standart BUP ve BUP Eklenmiş Matris için Doğruluk Sonuçları

Standart BUP (n=6)	Bulunan BUP(M) (ortalama ± SS)	Geri Kazanım (%)	BH (%)	BSS (%)
2.07×10^{-5}	$2.06 \times 10^{-5} \pm 1.29 \times 10^{-7}$	99.43	-0.48	0.63
4.14×10^{-5}	$4.08 \times 10^{-5} \pm 3.52 \times 10^{-7}$	98.52	-1.45	0.86
6.21×10^{-5}	$6.13 \times 10^{-5} \pm 3.58 \times 10^{-7}$	98.65	-1.29	0.58
Matrikse Eklenen BUP (n=6)	Bulunan BUP(M) (ortalama ± SS)	Geri Kazanım (%)	BH (%)	BSS (%)
2.07×10^{-5}	$2.10 \times 10^{-5} \pm 7.44 \times 10^{-8}$	101.34	1.34	0.35
4.14×10^{-5}	$4.18 \times 10^{-5} \pm 1.06 \times 10^{-7}$	100.94	0.94	0.25
6.21×10^{-5}	$6.21 \times 10^{-5} \pm 1.97 \times 10^{-7}$	99.95	-0.05	0.32

Çizelge 7. II. Türev Spektrofotometri Yöntemi ile Standart BUP ve BUP Eklenmiş Matris için Doğruluk Sonuçları

Standart BUP (n=6)	Bulunan BUP(M) (ortalama ± SS)	Geri Kazanım (%)	BH (%)	BSS (%)
2.07×10^{-5}	$2.06 \times 10^{-5} \pm 3.02 \times 10^{-7}$	99.40	-0.60	1.47
4.14×10^{-5}	$4.09 \times 10^{-5} \pm 6.53 \times 10^{-7}$	98.84	-1.21	1.60
6.21×10^{-5}	$6.08 \times 10^{-5} \pm 4.87 \times 10^{-7}$	97.91	-2.09	0.80
Matrikse Eklenen BUP (n=6)	Bulunan BUP(M) (ortalama ± SS)	Geri Kazanım (%)	BH (%)	BSS (%)
2.07×10^{-5}	$2.05 \times 10^{-5} \pm 3.82 \times 10^{-7}$	98.81	-1.19	1.87
4.14×10^{-5}	$4.09 \times 10^{-5} \pm 6.54 \times 10^{-7}$	98.84	-1.16	1.60
6.21×10^{-5}	$6.30 \times 10^{-5} \pm 7.55 \times 10^{-7}$	101.44	1.44	1.20

Çizelge 6 ve 7'de görüldüğü gibi, her iki yöntem için doğruluğu gösteren % BH ve kesinliği gösteren % BSS değerleri % 2'nin altındadır ve validasyon kriterlerine uygun bulunmaktadır (ICH Q2(R1), 2005). Sonuç olarak, tablet içerisindeki yardımcı maddelerin BUP tayininin doğruluğuna etkisinin olmadığı söylenebilir.

Spektroskopik yöntemlerin farmasötik tabletlerdeki uygulaması

BUP tablet içeriği için yapılan karşılaştırmalı analiz sonuçları Çizelge 8'de verilmiştir. Yöntemlerin doğruluğunu karşılaştırmak için Student t-testi, kesinliğini karşılaştırmak için F-testi yapılarak, sonuçlar % 95 önem düzeyinde istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 8. İki Farklı Spektrofotometrik Yöntemle BUP'un Farmasötik Tabletlerindeki Miktar Tayini Sonuçları

	UV-Spektrofotometri (mg)	II.Türev Spektrofotometri (mg)
Ortalama (n=6)	162.4	161.1
SS	4.72	3.66
% BSS	2.90	2.27
t-Testi (p<0.05)	-	0.52
F Testi (p<0.05)	-	1.66

Bulunan t- değerinin, tablo $t_{0.05}$ değerinden ($0.52 < 2.23$) ve F- değerinin, tablo $F_{0.05}$ değerinden ($1.66 < 5.05$) küçük olduğu gösterilerek, yöntemler arasındaki farkın doğruluk ve kesinlik açısından % 95 önem düzeyinde istatistiksel olarak önemsiz olduğu bulunmuştur. Ayrıca, iki farklı spektrofotometrik yöntem ile elde edilen tablet içeriği sonuçları, Wilcoxon testiyle de istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Hesaplamalar, GraphPAD istatistiksel analiz yazılımı kullanılarak yapılmış ve P_H değeri 0.6875 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, Wilcoxon testi de t- ve F- testi sonucunu desteklemektedir. Ayrıca geliştirilen spektrofotometrik yöntemlerle yapılan ölçümlerde, Wellbutrin® tablet içeriği farmakopenin gerektirdiği aralıktadır (USP 29, 2006).

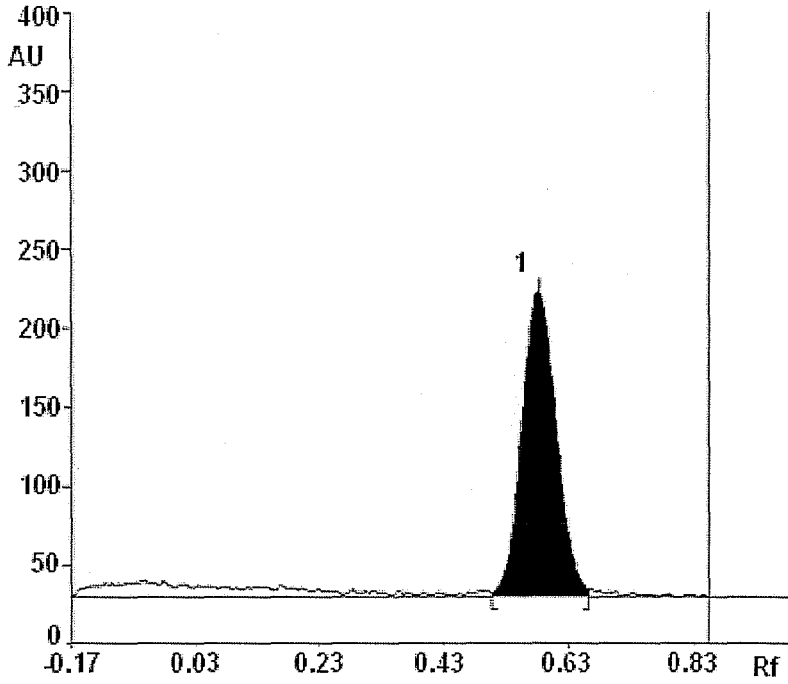
Wellbutrin® tablet için spektrofotometrik yöntemlerle elde edilen tablet analizi sonuçlarının potansiyometrik ve kondüktometrik titrasyon sonuçları ile karşılaştırılması amacıyla yapılan ANOVA testi sonucunda, yöntemler arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı bulunmuştur ($F_{4,23} = 1.902$, $p < 0.05$).

BUP'un İTK Yöntemi ile Farmasötik Tabletlerinde Miktar Tayini

İTK yönteminin optimizasyonu

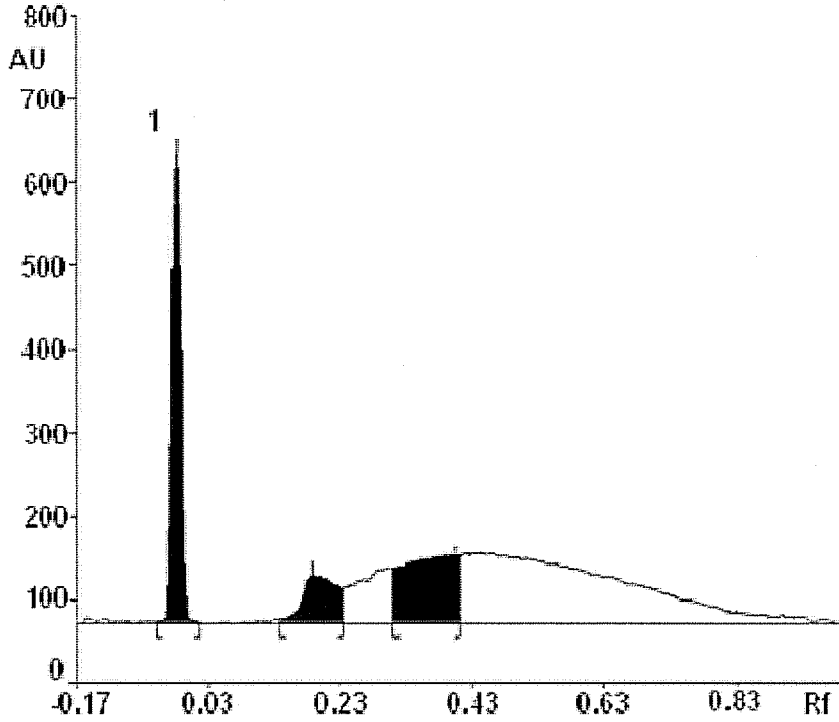
İTK yönteminin optimizasyonuna, değişik özellikteki çözücü sistemleri denenerek başlanmıştır. İlk olarak, 3:1 ve 1:1 (h/h) oranlarında petrol eteri ve etil asetat karışımı kullanılmış ve bu çözücü sistemleri, BUP'un polar yapısına uygun olmadığı için sürüklenme gerçekleşmemiştir. Daha polar hareketli faz olarak, etil asetat-etanol karışımı 1:1 (h/h) oranında uygulandığında, UV lambada uygun R_f değerinde fakat kuyruklu, dağınık bir leke görülmüştür. Bu durumun maddenin HCl tuzu olmasından kaynaklandığı düşünülerek, karışıma 500 μ L kadar NH_3 (% 25'lik) ilave edilmiş ve lekenin şeklinin düzeldiği görülmüştür fakat BUP, bu hareketli fazda sürüklendikten sonra, plakların İTK tarama cihazında taranması ile uygun pik şekli elde edilememiştir. Daha sonra etil asetat yerine benzer polarite indisine sahip olan kloroform kullanılarak, kloroform-etanol çözücü sistemi 1:1, 1:2 ve 2:1 (h/h) oranlarında denenmiştir. BUP'un bu hareketli fazlarda sürüklenmesi ile simetrik bir pik elde edilmesine karşın, kloroformun yüksek

oranda (2:1, h/h) kullanıldığı sistemde, 0.85 dolayında çok yüksek bir R_f değeri elde edilmiş ve çözücü piki ile iyi bir ayırım sağlanamamıştır. Çözücü sisteminde etanolün artırılması ile R_f değerinin daha küçük değerlere kaydığı gözlenmiştir. Uygun R_f değerini elde edebilmek için, kloroform-etanol karışımı 1:3 (h/h) oranında hazırlanmış ve maddenin asidik ortamdaki kararlılığı düşünülerek, bu sisteme glasiyel asetik asit ilave edilmiştir. Sonuç olarak, en uygun R_f değeri (0.56 ± 0.01), en düzgün pik şekli ve ayırım, etanol-kloroform-glasiyel asetik asit (30:10:1, h/h/h)'den oluşan hareketli faz kullanıldığında ve İTK tankı hareketli faz ile 30 dakika süreyle doyurulduğunda elde edilmiştir (**Şekil 10**).



Şekil 10. Optimum Koşullarda Standart BUP'un (500 ng.spot^{-1}) İTK Kromatogramı (Pik 1: BUP)

Yöntem optimizasyonunun devamında, USP 29, (2006)'daki BUP monografında m-klorobenzoik asit tayini için geliştirilmiş İTK yönteminin BUP tayini için uygun olup olmadığını denemek amacıyla, toluen, sikloheksan ve glasiyel asetik asit (47:47:6, h/h/h) içeren hareketli faz kullanılarak, 254 nm'de BUP tayini yapılmış ve **Şekil 11**'deki kromatogram elde edilmiştir.



Şekil 11. USP 29'da Belirtilen Koşullarda ve Toluene, Sikloheksan ve Glasiyel Asetik Asit (47:47:6, h/h/h) İçeren Hareketli Faz Kullanılarak, 254 nm'de Standart BUP'un (500 ng.spot⁻¹) İTK Kromatogramı (Pik 1: BUP)

Şekil 11'de görüldüğü gibi, BUP pikinin R_f değeri (0.01) tayin için uygun olmayıp, ölü hacimden ayırım sağlanamamıştır, böylece BUP piki çevresel şartlardan etkilenebilmektedir. Ayrıca, bu yöntem ile düzgün bir zemin gürültüsü elde edilememiştir. Sonuç olarak, USP 29'da belirtilmiş olan İTK yönteminin, BUP tayini için uygun olmadığı ve bu amaçla kullanılamayacağı söylenebilir.

İTK yönteminin validasyonu

Keskinlik (Precision)

Yöntemin keskinliğinin incelenmesi amacıyla, 100 µg.mL⁻¹'lik BUP çözeltisi kullanılarak 6, 8 ve 10 µL olmak üzere üç ayrı hacimde uygulama yapılmış, BUP'un 600, 800 ve 1000 ng.spot⁻¹'lik derişimlerde gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlikleri araştırılmıştır.

Verilen derişimlerde elde edilen pik alanı sinyalleri, yöntemin keskinliğinin gösterilmesi için istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar, **Çizelge 9'**da verilmektedir.

Keskinlik sonuçlarına göre, % 2'den düşük BSS değerleri ile yüksek düzeyde tekrar edilebilirlik elde edilmiş, sadece 600 ng.spot⁻¹'lik derişimde günler arası keskinlik % BSS değeri biraz yüksek bulunmuştur (ICH Q2(R1), 2005).

Çizelge 9. BUP'un Gün İçi ve Günler Arası Tekrar Edilebilirlik Sonuçları

600 ng.spot ⁻¹	Gün İçi Ortalama Kesinlik			Günler Arası Kesinlik
	I. Gün (n=5)	II. Gün (n=5)	III. Gün (n=5)	
OPA	3997	3424	3687	3806
SS	73.59	40.30	58.64	95.62
% BSS	1.84	1.18	1.59	2.51
SH	32.91	18.02	26.22	39.04

800 ng.spot ⁻¹	Gün İçi Ortalama Kesinlik			Günler Arası Kesinlik
	I. Gün (n=5)	II. Gün (n=5)	III. Gün (n=5)	
OPA	7079	6936	6500	7007
SS	62.11	81.35	68.34	101.8
% BSS	0.88	1.17	1.05	1.45
SH	27.78	36.38	30.56	32.20

1000 ng.spot ⁻¹	Gün İçi Ortalama Kesinlik			Günler Arası Kesinlik
	I. Gün (n=5)	II. Gün (n=5)	III. Gün (n=5)	
OPA	7666	7969	8211	8042
SS	107.2	99.12	82.14	145.9
% BSS	1.40	1.24	1.00	1.81
SH	47.94	44.33	36.74	46.14

Doğrusallık (Linearity)

100 µg.mL⁻¹'lik BUP çözeltisinden 2-10 µL arasında beş ayrı hacimde uygulama yapılarak, 200-1000 ng.spot⁻¹ derişim aralığındaki BUP çözeltilerinin birbirini takip eden 3 günde pik sinyalleri kaydedilmiştir. Artan BUP derişimleri ile karşılık gelen pik alanı değerleri arasında yapılan istatistiksel değerlendirmeye göre elde edilen sonuçlar, **Çizelge 10**'da verilmektedir.

Çizelge 10. 200-1000 ng.spot⁻¹ Derişim Aralığındaki BUP'un 254 nm'deki Pik Alanı Sinyallerinin Doğrusallığı

	Gün İçi			Günler Arası
	1.Gün (n=5)	2.Gün (n=5)	3.Gün (n=5)	Tüm Günler (n=15)
Eğim, a	4.433	6.441	8.481	6.623
Kesim, b	182.8	263.8	-453.0	232.5
Korelasyon Katsayısı, r	0.9990	0.9993	0.9988	0.9950
Eğimin Standart Hatası	0.1125	0.1318	0.2328	0.2761
Kesimin Standart Hatası	77.61	67.22	162.0	134.9

Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda, literatürdeki İTK çalışmalarına göre daha yüksek korelasyon katsayısına sahip doğrusal eşitlikler elde edilmiştir (Agrawal ve ark., 2003; Kaul ve ark., 2004; Motwani ve ark., 2006; Venkatachalam ve Chatterjee, 2007).

Saptama sınırı ve tayin alt sınırı (LOD and LOQ)

BUP'un İTK yöntemiyle LOD ve LOQ değerlerinin belirlenmesi amacıyla, kör madde olan metanol beş defa uygulanmış ve sinyal/gürültü oranı belirlenmiştir. Bu oran, sırasıyla 3 ve 10 ile çarpılarak, yöntemin LOD ve LOQ değerleri, sırasıyla 10.41 ng.spot⁻¹ ve 34.71 ng.spot⁻¹ olarak bulunmuştur.

Doğruluk (Accuracy)

Kalibrasyon eğrisinin verilen aralığında bulunan üç farklı derişimdeki standart BUP çözeltisi (600, 800 ve 1000 ng.spot⁻¹) için yüzde geri kazanım ve yüzde bağlı hata değerleri, **Çizelge 11**'de verilmiştir.

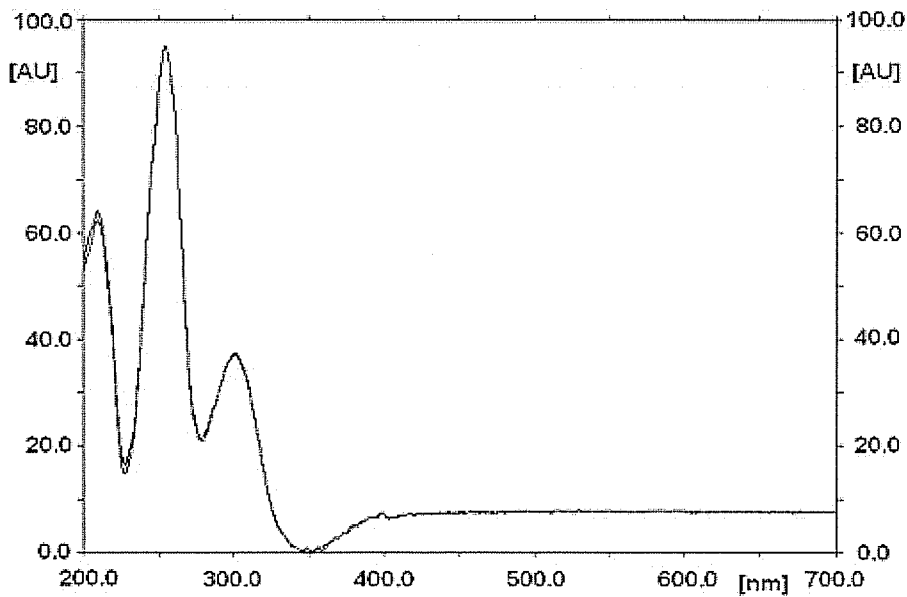
Çizelge 11. İTK Yönteminin Doğruluk Sonuçları (n=5)

Standart BUP (ng.spot ⁻¹)	Bulunan BUP (ng.spot ⁻¹) (ortalama ± SS)	Geri Kazanım (%)	BH (%)	BSS (%)
600	611.32 ± 11.26	101.89	1.89	1.84
800	810.94 ± 7.12	101.37	1.37	0.88
1000	1015.85 ± 10.16	101.58	1.58	1.00
Matrikse Eklenen BUP (ng.spot ⁻¹)	Bulunan BUP (ng.spot ⁻¹) (ortalama ± SS)	Geri Kazanım (%)	BH (%)	BSS (%)
600	598.83 ± 6.29	99.81	-0.19	1.05
800	787.63 ± 13.07	98.45	-1.55	1.66
1000	1014.98 ± 17.79	101.50	1.50	1.75

Çizelge 11'de görüldüğü gibi, doğruluk sonuçları kabul kriteri dahilinde bulunmuştur ve tablet içeriğinde bulunan etkin madde dışındaki yardımcı maddelerin BUP tayininin doğruluğuna etkisinin olmadığı söylenebilir (ICH Q2(R1), 2005).

Özgünlük (Specificity)

Yöntem özgünlüğü, standart BUP ve tablet numunesi analiz edilerek bulunmuştur. Numunenin spektrumu ile standart maddenin spektrumu pik başlangıç noktası, tepe noktası ve bitiş noktası olmak üzere üç ayrı noktada değerlendirildiğinde, $r=0.9999$ gibi oldukça iyi bir korelasyon değeri elde edilmiştir (Şekil 12).



Şekil 12. Standart BUP Çözeltisi ve Tablet Numunesinin Spektrum Karşılaştırması

Sağlamlık (Robustness)

1000 ng.spot⁻¹'lik derişimde, üçlü uygulamalarla hareketli faz bileşiminde, glasiyel asetik asit miktarında, hareketli faz hacminde ve tankın doygunluk süresindeki küçük değişiklikler sonucunda pik alanlarının % BSS ve SH değerleri hesaplanmıştır. **Çizelge 12**'de görüldüğü gibi, elde edilen düşük % BSS değerleri (<2) yöntemin sağlamlığını göstermektedir (Dejaegher ve Vander Heyden, 2007).

Çizelge 12. İTK Yönteminin Sağlamlık Sonuçları (n=3, 1000 ng.spot⁻¹ BUP)

Parametre	% BSS	SH
1) Hareketli Faz Bileşimi (etanol-kloroform-glasiyel asetik asit)		
• 29:11:1 (h/h/h)	1.29	40.20
• 30:10:1 (h/h/h)		
• 31: 9: 1 (h/h/h)		
2) Glasiyel Asetik Asit Miktarı (0.5, 1 ve 1.5 mL)	0.74	18.17
3) Hareketli Faz Hacmi (18, 20 ve 22 mL)	0.81	22.93
4) Doygunluk Süresi (20, 30 ve 40 dakika)	1.20	35.93

Tutarlılık (Ruggedness)

1000 ng.spot⁻¹'lik derişimdeki BUP çözeltilisinin 0, 6, 12, 24, 48 ve 72 saat sonra, üçerli analizi ile pik alanları için 1.60 gibi düşük bir % BSS (<2) elde edilmiştir. Sonuçlar, yöntemin tutarlılığını ve BUP'un analiz boyunca kararlı olduğunu kanıtlamaktadır (Dejaegher ve Vander Heyden, 2007).

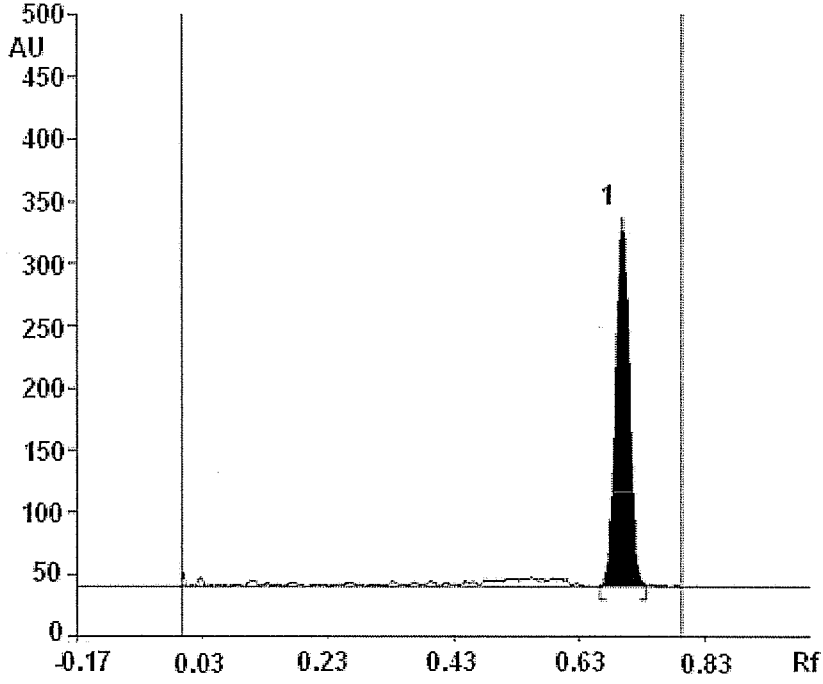
BUP için hızlandırılmış kararlılık testi

Standart BUP çözeltilisi asit, baz, hidrojen peroksit, kuru ve nemli ısı, fotokimyasal ve UV (254 nm) ışık ile muamele edilmiş ve **Şekil 13-16**'da görüldüğü gibi bozunma ürünü pikleri ile standart BUP piki iyi bir şekilde ayrılmıştır. Bozunma ürünlerinin R_f değerleri, BUP için yüzde geri kazanım ve % BSS değerleri **Çizelge 13**'de verilmiştir.

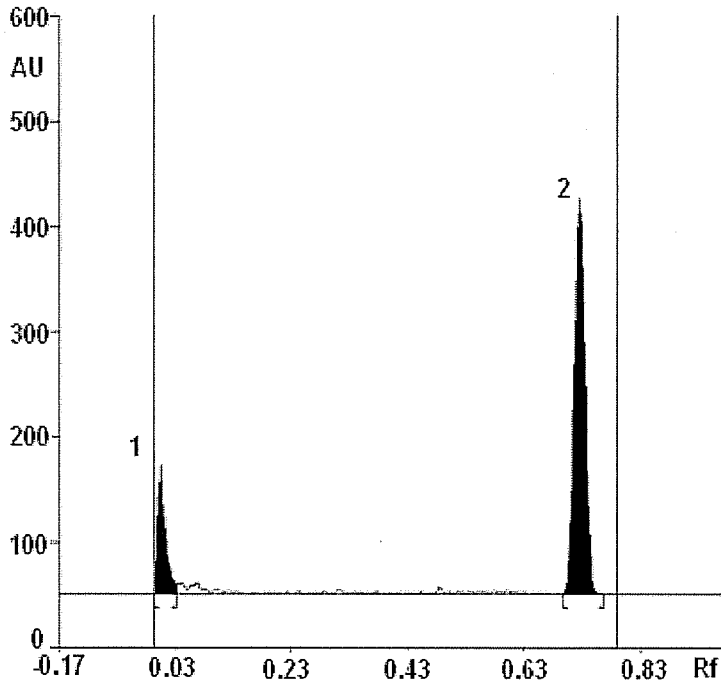
Asit ve baz etkisi

Şekil 13a ve **13b**'de görüldüğü gibi, asitle muamele edilmiş numuneler, nötral olup olmamalarına göre farklı kromatogramlar göstermişlerdir. Nötral numune kromatogramında, BUP dışında başka bir pik gözlenmemesine karşın, nötral olmayan numunenin kromatogramında R_f değeri 0.01 olan bir pik görülmektedir. Asit muamelesi sonucu, BUP pik morfolojisi düzgünleşmekle birlikte; nötral olmayan numunede BUP piki daha az polar hale gelerek, R_f değeri 0.73'e kaymış ve % 88.58 ± 0.32 (n=5)'lik bir geri kazanım elde edilmiştir. Asitle muamele edilen numune nötralize edildiğinde ise BUP polaritesindeki azalmadan dolayı, hem R_f değeri (0.70), hem de geri kazanım değerinde (% 79.56 ± 1.68, n=5) değişme görülmüştür. Asitle muamele sonucunda R_f değerinde meydana gelen değişiklikten dolayı, BUP pikinin doğrulanmasına gerek duyulmuş ve bu amaçla

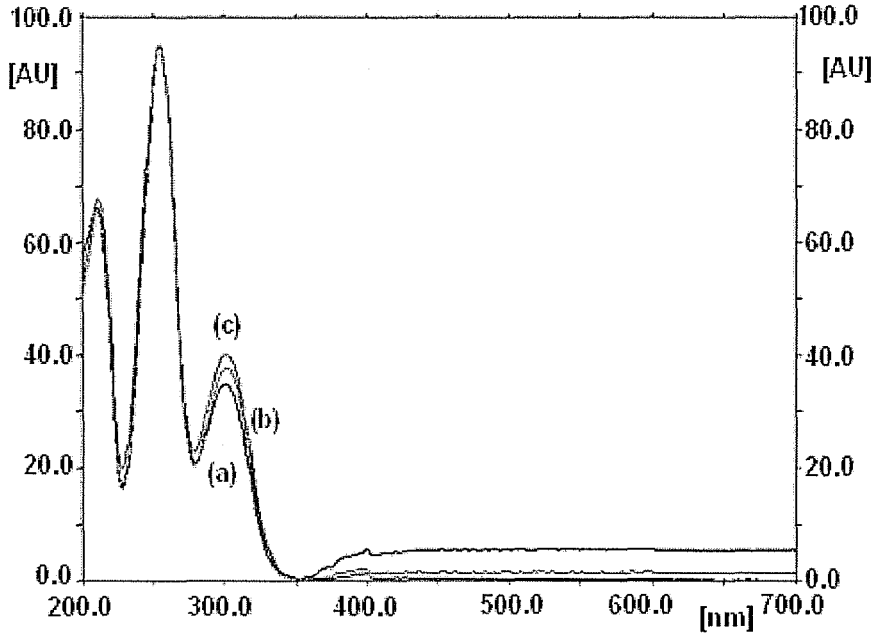
nötral ve nötral olmayan numunelerin spektrumları, asit ile muamele edilmemiş standart BUP çözeltisinin spektrumu ile karşılaştırılmıştır (Şekil 13c).



Şekil 13a. Asit (1N HCl, 70°C Sıcaklıkta 30 Dakika) ile Muamele Edilmiş Nötral BUP Numunesi (1000 ng.spot⁻¹) Kromatogramı (Pik 1: BUP)



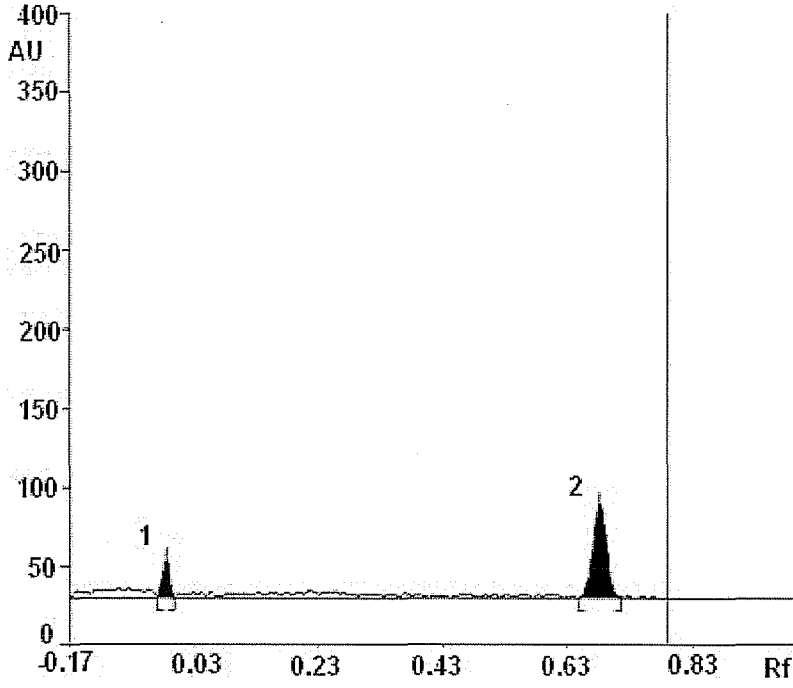
Şekil 13b. Asit (1N HCl, 70°C Sıcaklıkta 30 Dakika) ile Muamele Edilmiş Nötral Olmayan BUP Numunesi (1000 ng.spot⁻¹) Kromatogramı (Pik 1: Bozunma Ürünü, Pik 2: BUP)



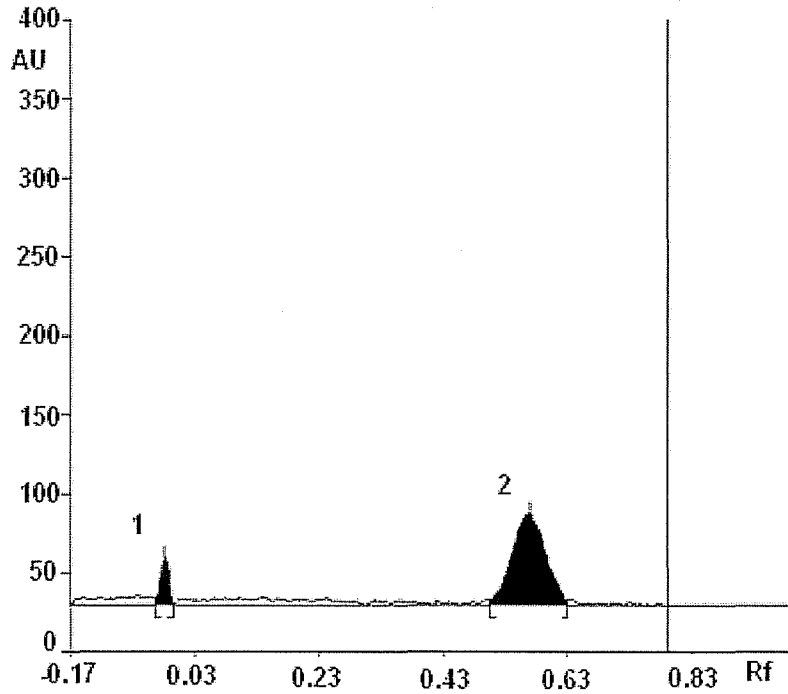
Şekil 13c. Asit Muamelesine Tabi Tutulmamış Standart BUP Çözeltisinin Spektrumu ile Nötral ve Nötral Olmayan Numunelerin Spektrumlarının Karşılaştırması (1000 ng.spot⁻¹)
a: Standart BUP, b: Nötral Numune, c: Nötral Olmayan Numune

Şekil 13c’de görüldüğü gibi, spektrumlar arasında herhangi bir fark bulunamamıştır.

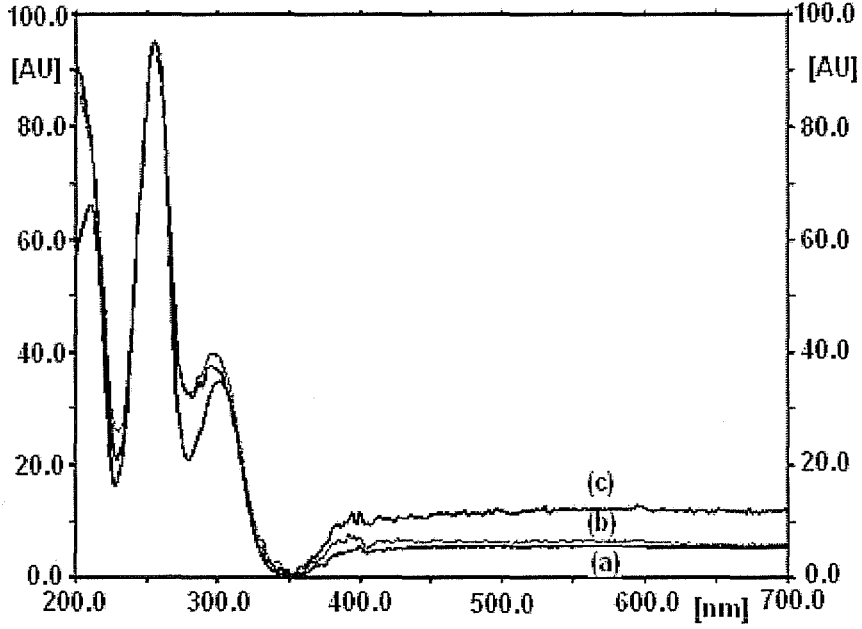
Bazla muamele edilen nötral ve nötral olmayan numuneler büyük ölçüde bozunmaya uğramış ve R_f değeri 0.01 olan bir bozunma ürünü oluşmuştur (Şekil 14a ve 14b). Numunenin nötralize edildiği durumda, bazik şartlardaki BUP pikinin R_f değeri (0.69), asidik şartlardaki BUP pikinin R_f değeriyle (0.70) neredeyse aynı iken, nötral olmayan numunenin R_f değeri (0.56 ± 0.01) standart BUP çözeltisine göre değişmemiştir. Asidik koşullarla benzer şekilde, numune nötralize edildiğinde BUP geri kazanımı azalmaktadır. Nötral ve nötral olmayan numunelerin spektrumları, baz muamelesine tabi tutulmamış standart BUP çözeltisinin spektrumu ile karşılaştırılmış ve spektrumlar arasında herhangi bir fark bulunamamıştır (Şekil 14c).



Şekil 14a. Baz (1N NaOH, 70°C Sıcaklıkta 30 Dakika) ile Muamele Edilmiş Nötral BUP Numunesi (1000 ng.spot⁻¹) Kromatogramı (Pik 1: Bozunma Ürünü, Pik 2: BUP)



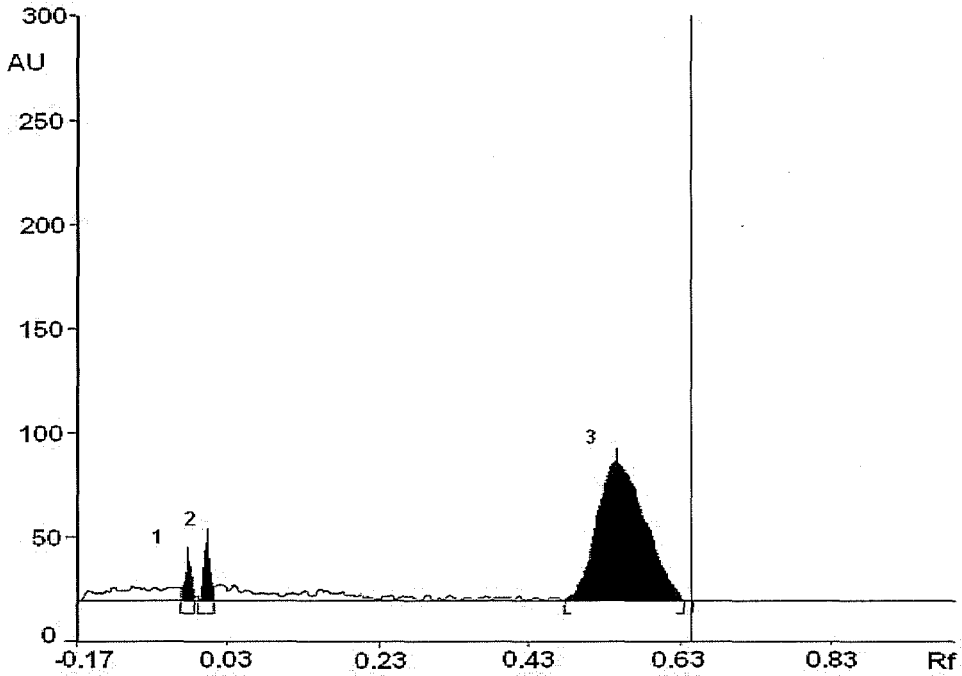
Şekil 14b. Baz (1N NaOH, 70°C Sıcaklıkta 30 Dakika) ile Muamele Edilmiş Nötral Olmayan BUP Numunesi (1000 ng.spot⁻¹) Kromatogramı (Pik 1: Bozunma Ürünü, Pik 2: BUP)



Şekil 14c. Baz Muamelesine Tabi Tutulmamış Standart BUP Çözeltisinin Spektrumu ile Nötral ve Nötral Olmayan Numunelerin Spektrumlarının Karşılaştırması ($1000 \text{ ng.spot}^{-1}$)
a: Standart BUP, b: Nötral Numune, c: Nötral Olmayan Numune

Hidrojen peroksit etkisi

% 30'luk H_2O_2 çözeltisi ile muamele edilmiş BUP kromatogramında ilave iki pik görülmektedir (Şekil 15). Muamele sonucu, BUP pik morfolojisi bozulmuş olmasına karşın, geri kazanım çok düşük değildir ($\% 83.07 \pm 2.28$, $n=5$).



Şekil 15. Hidrojen Peroksit (% 30, h/h; 80°C Sıcaklıkta 1 Saat 15 Dakika) ile Muamele Edilmiş BUP Numunesi ($1000 \text{ ng.spot}^{-1}$) Kromatogramı (Pik 1 ve 2: Bozunma Ürünü, Pik 3: BUP)

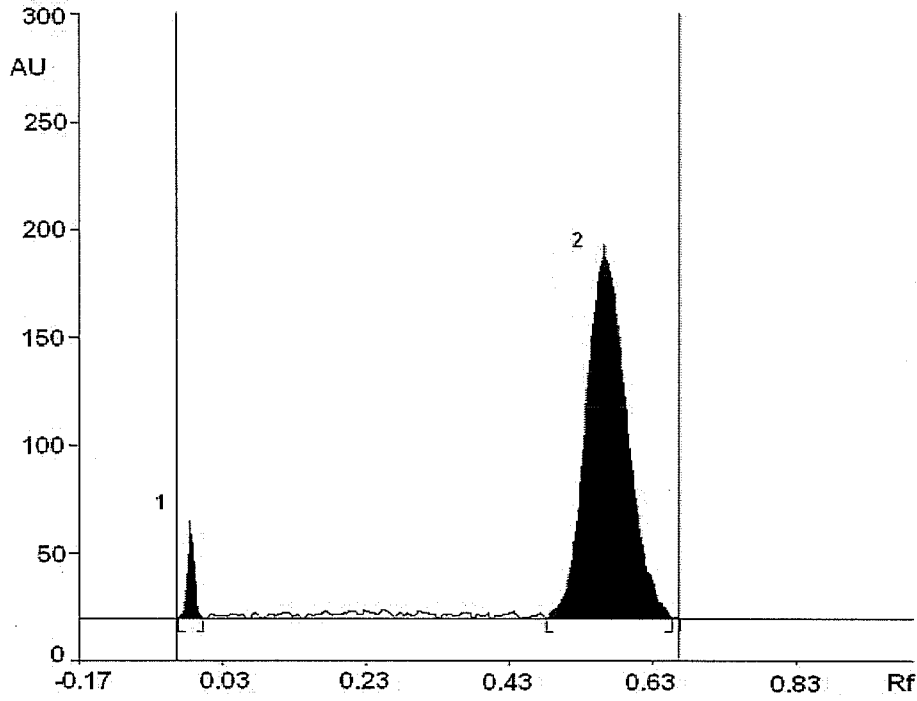
Kuru ve nemli ısı etkisi

Kuru ısı ile muamele edilmiş BUP kromatogramında, $R_f=0.55 \pm 0.01$ değerindeki BUP pikinden başka ilave bir pik görülmemiştir. Buna karşın geri kazanım, % 82.17 ± 0.91 olarak bulunmuştur.

Bir saat süreyle kaynar su banyosunda bekletilen BUP numunesinin kromatogramında da aynı şekilde bozunma ürünü görülmemektedir.

Fotokimyasal ve UV ışık etkisi

8 saat süreyle UV ışık ile muamele edilen BUP numunesinin kromatogramında $0.01 R_f$ değerinde bir bozunma ürünü görülmektedir (Şekil 16). 24 saat güneş ışığında bekletilen BUP numunesi kromatogramında ise ilave bir pik görülmemiştir.



Şekil 16. UV Işığı (UV Lamba Altında 8 Saat) ile Muamele Edilmiş BUP Numunesi ($1000 \text{ ng.spot}^{-1}$) Kromatogramı (Pik 1: Bozunma Ürünü, Pik 2: BUP)

Hızlandırılmış kararlılık çalışmalarında, her parametre için 5 ayrı uygulama yapılmış, yüzde geri kazanım ve % BSS değerleri hesaplanmıştır. Sonuç olarak, en yüksek geri kazanım değeri, gün ışığında bekletilen numune için elde edilmiş ve BUP'un normal çalışma koşullarında diğer ortamlara göre daha kararlı olduğu bulunmuştur (Çizelge 13).

Çizelge 13. Hızlandırılmış Kararlılık Testi Sonuçları (n=5, 1000 ng.spot⁻¹ BUP)

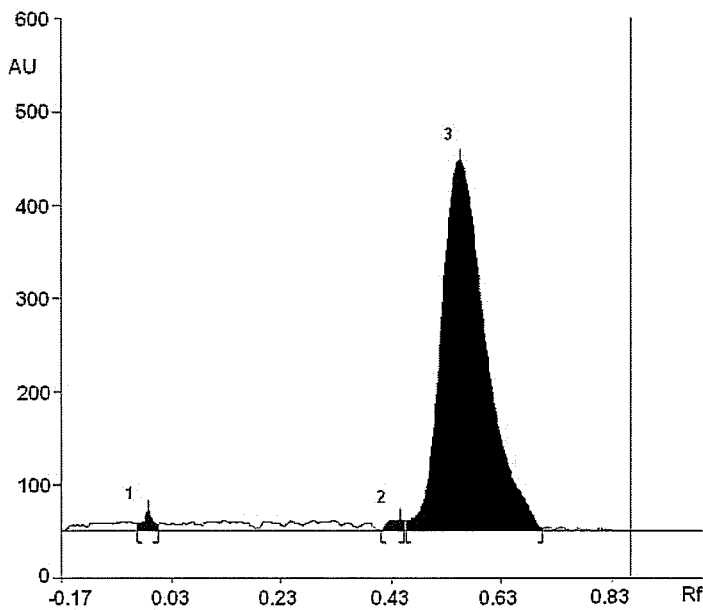
Koşullar	Bozunma Ürünlerinin R _f Değeri	% Geri Kazanım	% BSS
1) 1N HCl	0.01	88.58	0.37
2) 1N HCl, nötral numune	-	79.56	2.11
3) 1N NaOH	0.01	35.14	2.39
4) 1N NaOH, nötral numune	0.01	16.02	1.81
5) % 30'luk H ₂ O ₂	0.01, 0.02	83.07	2.74
6) Kuru ısı	-	82.17	1.11
7) Nemli ısı	-	91.55	0.71
8) Işık kararlılığı (gün ışığı)	-	94.72	1.14
9) UV (254 nm)	0.01	92.72	0.63

BUP farmasötik dozaj şeklinin kararlılığının araştırılması

Wellbutrin SR[®] tablet numunelerinin kromatogramında, Zyban[®] tablet numunelerinin kromatogramında olduğu gibi sadece R_f değeri 0.56 ± 0.01 olan BUP piki görülmektedir, herhangi bir bozunma piki oluşmamıştır. Tablet içeriği % 109.32 ± 0.71 (n=6, BSS=% 0.65) olup, farmakopenin gerektirdiği aralıkta bulunmuştur (USP 29, 2006).

İlgili safsızlıkların saptanması

Numune çözeltisi ve standart çözeltinin analizi sonucunda, numune çözeltisi kromatogramında 0.01 ve 0.45'lik R_f değerine sahip, ilave iki pik bulunmuştur (Şekil 17).



Şekil 17. BUP ve Safsızlıkların Kromatogramı (Pik 1 ve 2: Safsızlık, Pik 3: BUP)

Çizelge 14'de görüldüğü gibi, safsızlık pikinin alanı standart çözeltideki BUP pikinden oldukça düşüktür.

Çizelge 14. İlgili Safsızlıklar (n=5)

Derişim (ng.spot ⁻¹)	R _f Değeri	Alan
500	0.56	5436.02
5000	0.56	22595.4
İlgili safsızlık		
5000	0.01 ve 0.45	280.1 ve 241.2

BUP içeren tabletlerde miktar tayini

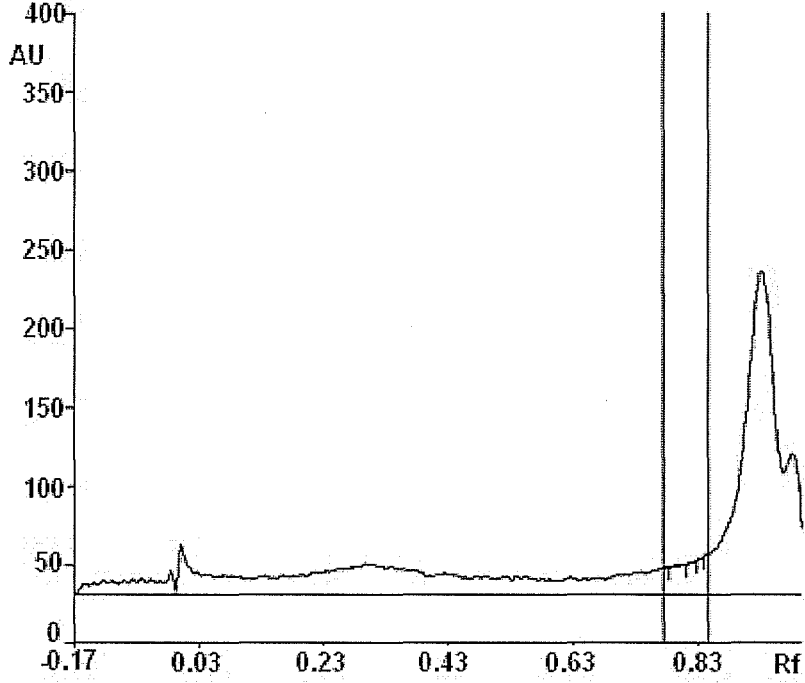
Validasyonu gösterilen İTK yönteminin uygulaması, 150 mg BUP içerdiği bilinen Zyban® tabletlerde yapılmış ve istatistiksel değerlendirmeler sonucu, tablet içeriği % 101.48 ± 0.86 (n=6, BSS=% 0.85) olarak farmakopenin gerektirdiği aralıkta bulunmuştur (USP 29, 2006).

BUP'un İTK Yöntemi ile Plazmada Miktar Tayini

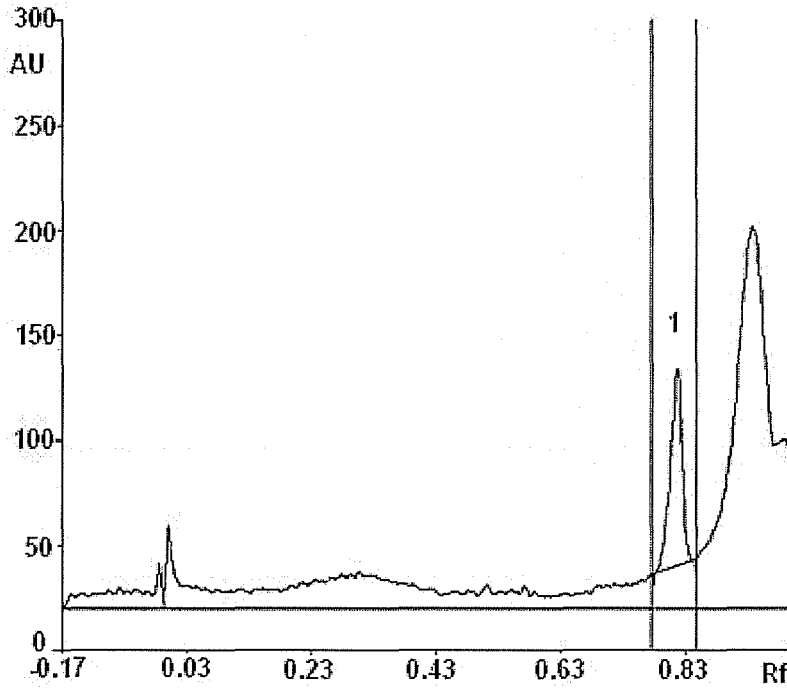
İTK yönteminin optimizasyonu

BUP'un plazmadaki analizi için önceden geliştirilmiş olan İTK prosedürü kullanılmıştır. Plazma içerisindeki BUP'un etanol-kloroform-glasiyel asetik asit (30:10:1, h/h/h) den oluşan hareketli fazda sürüklenmesi ile simetrik bir pik elde edilmiş fakat matriksin değişmiş olması ve numune hazırlama basamağındaki asit ilavesi (TCA) nedeniyle R_f değeri ileriye kaymıştır (R_f=0.80 ± 0.02, n=5).

Şekil 18a ve **18b**'de görüldüğü gibi, çözücü piki (solvent front) tüm İTK çalışmalarında olduğu gibi kromatogramın sonundadır. BUP ve çözücü pikinin R_f değerleri birbirine çok yakın olup, bu durum normal koşullar altında istenmez. Çünkü bu koşullarda madde pikinin çevre şartlarından etkilenme derecesi artmakta ve R_f değerindeki herhangi bir değişme durumunda çözücü piki ile olan ayırım ortadan kalkmaktadır. Tüm çalışma boyunca, BUP pikinin R_f değerinde analizi etkileyecek nitelikte bir kayma ve plazmadan kaynaklanan bir girişim gözlenmemiştir (**Şekil 18a** ve **18b**). Dolayısıyla, bu koşullarda yöntem validasyonuna geçilmiştir.



Şekil 18a. BUP Eklenmemiş Plazma Örneğinin İTK Kromatogramı



Şekil 18b. 240 ng.spot⁻¹ Derişimde BUP Eklenmiş Plazma Örneğinin İTK Kromatogramı (Pik 1: BUP)

İTK yönteminin plazmadaki validasyonu

Kesinlik ve geri kazanım oranı (Precision and Recovery)

Yöntemin kesinliğinin incelenmesi amacıyla, plazmaya eklenmiş 60 µg.mL⁻¹'lik BUP çözeltisi kullanılarak 6, 8 ve 10 µL olmak üzere üç ayrı hacimde uygulama yapılmış, BUP'un 360, 480 ve 600 ng.spot⁻¹'lik derişimlerde gün içi ve günler

arası tekrar edilebilirlikleri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar aynı şekilde hazırlanan, plazma katılmamış standart BUP çözeltisi sonuçları ile karşılaştırılarak, geri kazanım oranları belirlenmiştir. Sonuçlar, **Çizelge 15**'de verilmektedir.

Ortalama olarak % 87 dolayında, oldukça yüksek bir geri kazanım elde edilmiştir. BSS değerleri ise, % 1-2 dolayındadır. Sadece 600 ng.spot⁻¹'lik derişimde günler arası % BSS değeri daha yüksek bulunmuştur.

Çizelge 15. BUP'un Plazmada Kesinliği ve Geri Kazanım Oranı (gün=3, n=5)

	Derişim (ng.spot ⁻¹)		Geri kazanım (%)	BSS (%)
	Eklene	Bulunan (ortalama ± SS)		
Gün içi	360	318.10 ± 2.70	88.36	0.85
	480	421.45 ± 4.90	87.80	1.16
	600	516.86 ± 7.84	86.14	1.52
Günler arası	360	316.49 ± 8.86	87.91	2.80
	480	418.23 ± 9.58	87.13	2.29
	600	513.68 ± 16.23	85.61	3.16

Doğrusallık (Linearity)

Plazmaya katılmış 60 µg.mL⁻¹'lik BUP çözeltisinden 2-10 µL arasında altı ayrı hacimde uygulama yapılarak, 120-600 ng.spot⁻¹ derişim aralığındaki BUP çözeltilerinin birbirini takip eden 3 günde pik sinyalleri kaydedilmiştir. Artan BUP derişimleri ile karşılık gelen pik alanı değerleri arasında yapılan istatistiksel değerlendirmeye göre elde edilen sonuçlar **Çizelge 16**'da verilmektedir.

Çizelge 16. Plazma İçerisinde 120-600 ng.spot⁻¹ Derişim Aralığındaki BUP'un 254 nm'deki Pik Alanı Sinyallerinin Doğrusallığı

	Gün İçi			Günler Arası Tüm Günler (n=18)
	1.Gün (n=6)	2.Gün (n=6)	3.Gün (n=6)	
Eğim, a	4.997	5.046	5.387	5.155
Kesim, b	78.99	-33.55	-208	-61.40
Korelasyon Katsayısı, r	0.9989	0.9995	0.9990	0.997
Eğimin Standart Hatası	0.1169	0.0753	0.1190	0.1046
Kesimin Standart Hatası	54.61	30.24	47.79	44.42

Çizelge 16' da görüldüğü gibi plazmada yapılmış olmasına karşın, İTK yöntemiyle tablet analizinde bulunan sonuçlarla karşılaştırılabilir düzeyde, yüksek korelasyon katsayısına sahip doğrusal eşitlikler elde edilmiştir.

Saptama sınırı ve tayin alt sınırı (LOD and LOQ)

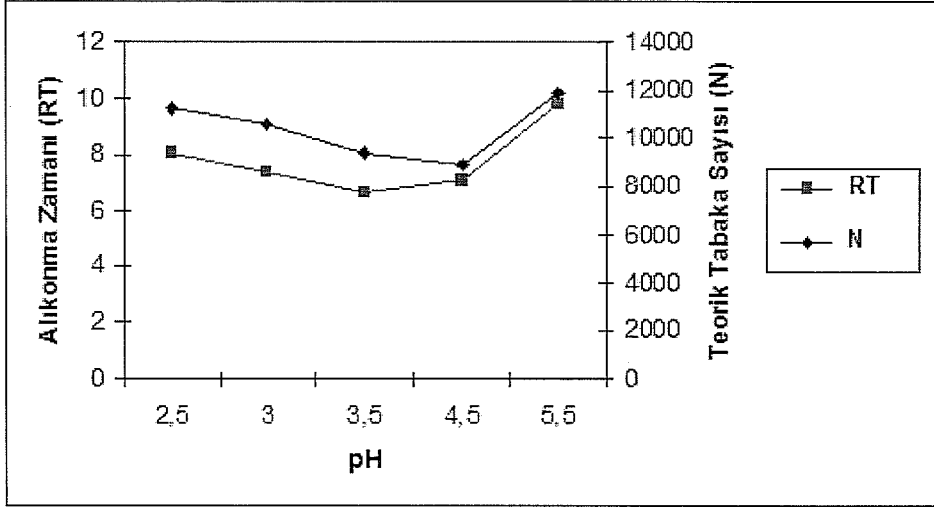
Yöntemin saptama sınırı 12.04 ng.spot⁻¹ ve tayin alt sınırı 36.47 ng.spot⁻¹ olarak hesaplanmıştır.

BUP'un YPSK Yöntemi ile Farmasötik Tabletlerinde Miktar Tayini

YPSK yönteminin optimizasyonu

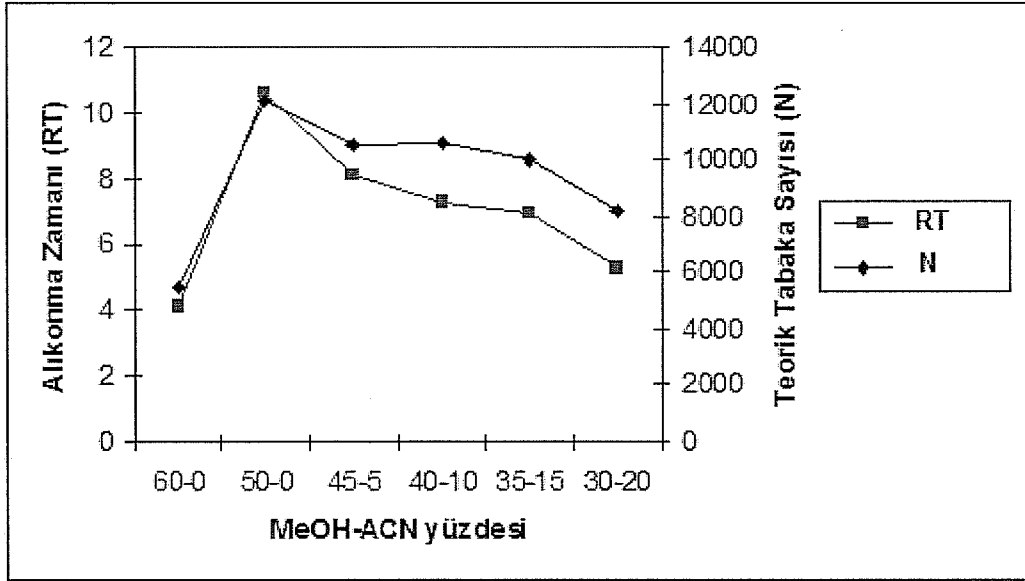
YPSK prosedürünün optimizasyonuna, % 70 oranında metanol içeren hareketli faz ile başlanmış fakat uygun pik şekli elde edilememiştir. Daha sonra, BUP'un molekül büyüklüğü ve yapısı bakımından nikotine benzemesi ve pKa'sının (pKa=7.9) nikotin molekülündeki pirolidin halkasının pKa'sına (pKa=8.02) yakın olması nedeniyle, nikotin ile yapılan bir çalışmadan yola çıkılarak, pH'ı 3 olan bir tampon sistemi kullanılmış ve 1-heptan sülfonik asit (1-HSA) ile iyon çifti oluşturulması düşünülmüştür (Ciolino ve ark., 1999). Ayrıca literatürde, pKa'sı 9 dan küçük olan, primer veya sekonder amin grubu içeren zayıf bazik bileşiklerin YPSK ile analizinde bozuk pik şeklini ve kuyruklanmayı düzeltmek için hareketli fazda organik çözücü olarak metanol ve asetonyitril'in birlikte kullanılması önerilmektedir (Başçı ve ark., 1998). Böylece, metanol-asetonyitril-fosfat tamponu (20 mM, pH=3) (40:10:50, h/h/h) ve 10 mM 1-HSA içeren hareketli fazla çalışmalara başlanmış ve ilk olarak sonuçlar, literatürde daha kolay iyon çifti oluşturduğu belirtilen asetat tamponu ile karşılaştırılmıştır (Yardımcı ve ark., 2007). Asetat tamponu ile uygun koşullar elde edilememesi ve teorik tabaka sayısı düşerken kuyruklanma faktörünün artması üzerine, çalışmalara fosfat tamponu ile devam edilmiştir.

İlk olarak, pH 2.5-5.5 aralığında, her pH değeri için üçer enjeksiyon yapmak suretiyle pH taraması yapılmıştır. pH değerlerine karşı, alıkonma zamanları grafiğe geçirildiğinde BUP'un pH 2.5-3.5 aralığında iyon çifti varlığındaki tipik bazik madde davranışı gösterdiği, 3.5 dan sonra ise iyon çifti yokmuş gibi davrandığı görülmektedir (Ciolino ve ark., 1999). Ayrıca artan pH değerlerine karşı BUP pikinin teorik tabaka sayısı (N) değişim grafiği incelendiğinde, teorik tabaka sayısı, alıkonma zamanı ile benzer şekilde değişmektedir. Alıkonma zamanı ve teorik tabaka sayısı göz önüne alınarak, optimum pH değeri olarak 3.0 seçilmiştir (**Şekil 19**). Ayrıca pik simetrisi incelendiğinde, pH 3.0 değerinde kuyruklanma faktörü en düşük değerini almış (tailing factor=1.28) ve en simetrik pikler elde edilmiştir.



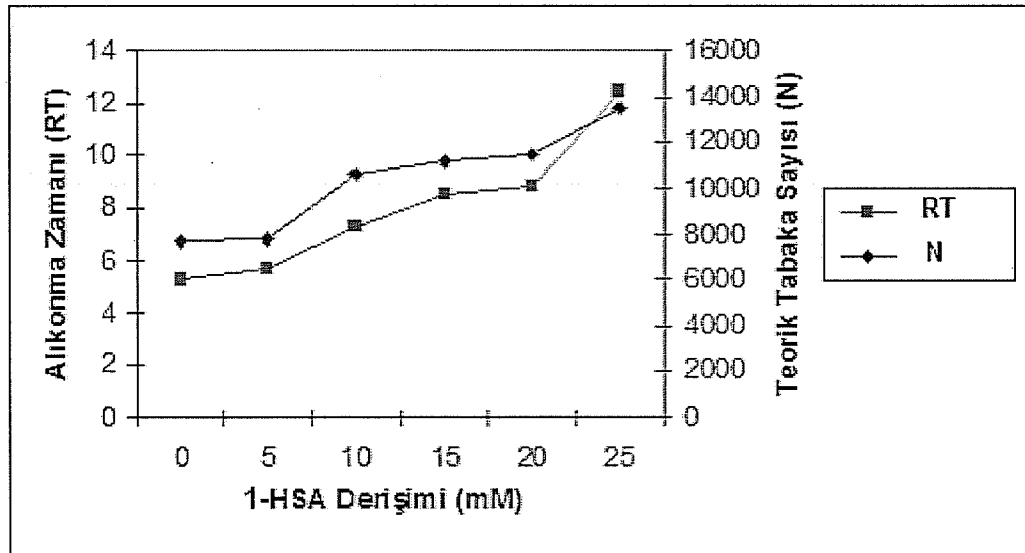
Şekil 19. Alıkonma Zamanı (RT) ve Teorik Tabaka Sayısının (N) pH'a Göre Değişim Grafiği (Koşullar:Metanol-Asetonitril-Fosfat Tamponu (20 mM) (40:10:50, h/h/h) ve 10 mM 1-HSA)

Daha sonra, optimum organik çözücü yüzdesini bulabilmek için, değişik çözücü sistemleri denenmiş ve ilk olarak, asetonitril içermeyen ve 20 mM fosfat tamponu (pH=3), 10 mM 1-HSA ve % 50 oranında metanol'den oluşan bir hareketli faz hazırlanmıştır. Bu sistemde yapılan analiz sonucunda, toplam organik çözücü yüzdesi değişmemesine karşın, % 10'luk asetonitril'in yerine metanol'ün kullanılmasının BUP'un alıkonma zamanını büyük ölçüde etkilediği ve 7.3 dakikada gözlenen alıkonma zamanınının 10.8 dakikaya kaydığı görülmüştür. Bu durum, literatürde belirtilen asetonitril ve metanol'ün birer polarite ölçüsü olan çözünürlük parametresi (δ) ve polarite indisi (P') yönünden farklılık gösterdiği ve metanol-su (50:50, h/h) karışımından oluşan bir hareketli faz ile asetonitril-su (38.5:61.5, h/h) karışımından oluşan bir hareketli fazın ancak izoelotropik olduğu gerçeğini kanıtlamaktadır (Lindsay, 1992). Daha sonra, BUP alıkonma zamanını öne çekmek ve dolayısıyla genişlemiş durumda görülen pik şeklini düzeltmek için 20 mM fosfat tamponu (pH=3), 10 mM 1-HSA ve % 60 oranında metanol içeren hareketli faz denenmiştir. Bu durumda da IS ve BUP'un alıkonma zamanları aşırı şekilde azalmış, ayırım sağlanamamış ve dolayısıyla teorik tabaka sayısı azalmıştır. Bunun üzerine, toplam organik çözücü yüzdesi % 50, h/h değerinde tutulmak suretiyle asetonitril oranı % 5 ve % 20 arasında değiştirilerek her bir çözücü sistemi için kromatogramlar incelenmiş ve % 20 gibi yüksek oranda asetonitril içeren hareketli faz kullanıldığında BUP'un alıkonma zamanı azalmış olmasına karşın, asetonitril'den kaynaklanan difüzyon nedeniyle BUP pik taban genişliğinin arttığı ve dolayısıyla teorik tabaka sayısının azaldığı bulunmuştur. % 45:5 ve % 40:10 oranlarında metanol-asetonitril içeren hareketli fazların her ikisi için de alıkonma zamanları ve teorik tabaka sayıları birbirine yakın ve optimum düzeyde bulunmasına karşın, % 40:10 oranında metanol-asetonitril içeren hareketli faz, alıkonma zamanınının daha da düşük olması bakımından tercih edilmiştir (Şekil 20).



Şekil 20. Alıkonma Zamanı (RT) ve Teorik Tabaka Sayısının (N) Çözücü Yüzdesine Göre Değişim Grafiği (Koşullar: Fosfat Tamponu (20 mM, % 50, pH:3) ve 10 mM 1-HSA)

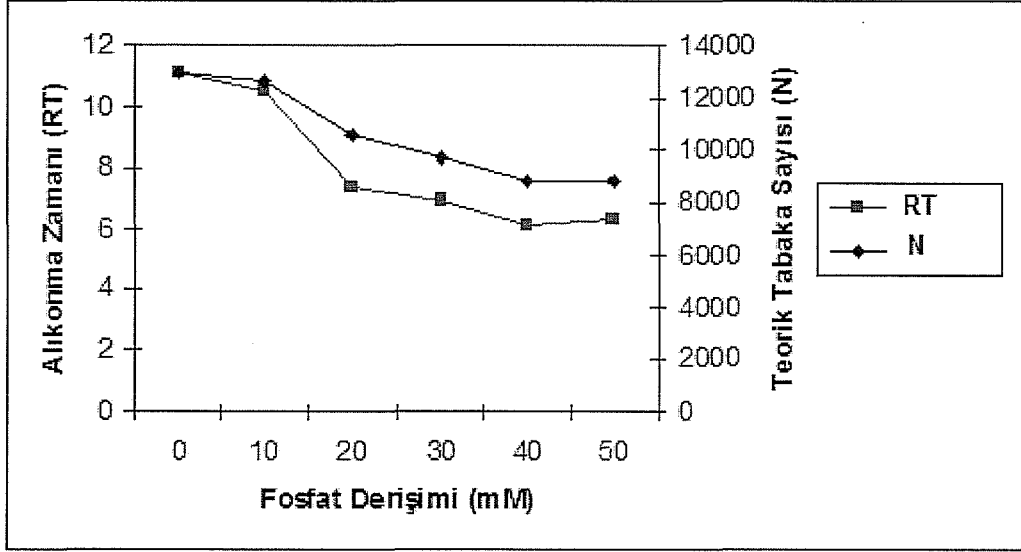
Daha sonra 1-HSA derişimi (0-25 mM) taraması yapılmış ve metanol-asetonitril-fosfat tamponun'dan (20 mM, pH:3) (40:10:50, h/h/h) oluşan hareketli faza 1-HSA eklenmediği zaman piklerin çok fazla öne geldiği, IS'nin safsızlıklarla birleştiği ve BUP pikinin 5.2 dakika olan alıkonma zamanı ile teorik tabaka sayısının azaldığı görülmüştür. Ayrıca, 1-HSA miktarı arttıkça, kuyruklanma faktörü azalmakta, alıkonma zamanı ve dolayısıyla teorik tabaka sayısı artmaktadır. Tüm değişkenler göz önüne alınarak, sonraki deneysel çalışmalarda 10 mM'lık derişimde 1-HSA kullanılmasına karar verilmiştir (Şekil 21).



Şekil 21. Alıkonma Zamanı (RT) ve Teorik Tabaka Sayısının (N) 1-HSA Derişimine (mM) Göre Değişim Grafiği (Koşullar: Metanol-Asetonitril-Fosfat Tamponu (20 mM, pH:3) (40:10:50, h/h/h))

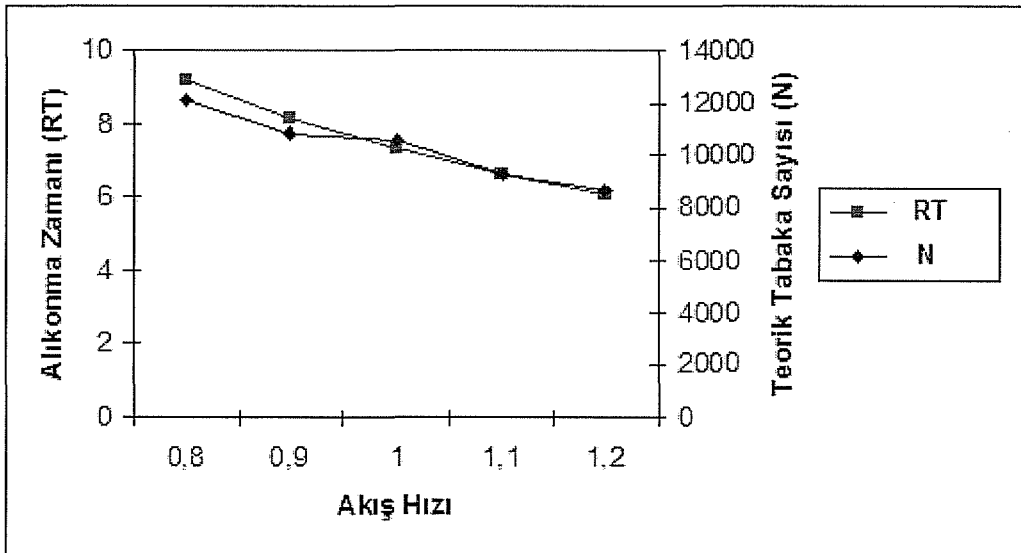
Optimizasyonun en önemli basamaklarından biri de fosfat tamponu derişiminin, pik yapısı ve alıkonma zamanına etkisinin incelenmesidir ve bu işlem 0 ile 50 mM

aralığında yapılmıştır (Şekil 22). Fosfat tamponu eklenmediği zaman, alıkonma zamanları oldukça artmakta, yüksek tampon derişimlerinde ise alıkonma zamanları azalmasına karşın, kuyruklanma faktörü artışı ile birlikte oldukça düşük teorik tabaka sayısı elde edilmektedir. Ayrıca kolonun yüksek fosfat derişimleri ile yüklenmesinin önlenmesi durumu da düşünülerek, 20 mM fosfat derişimine karar verilmiştir.



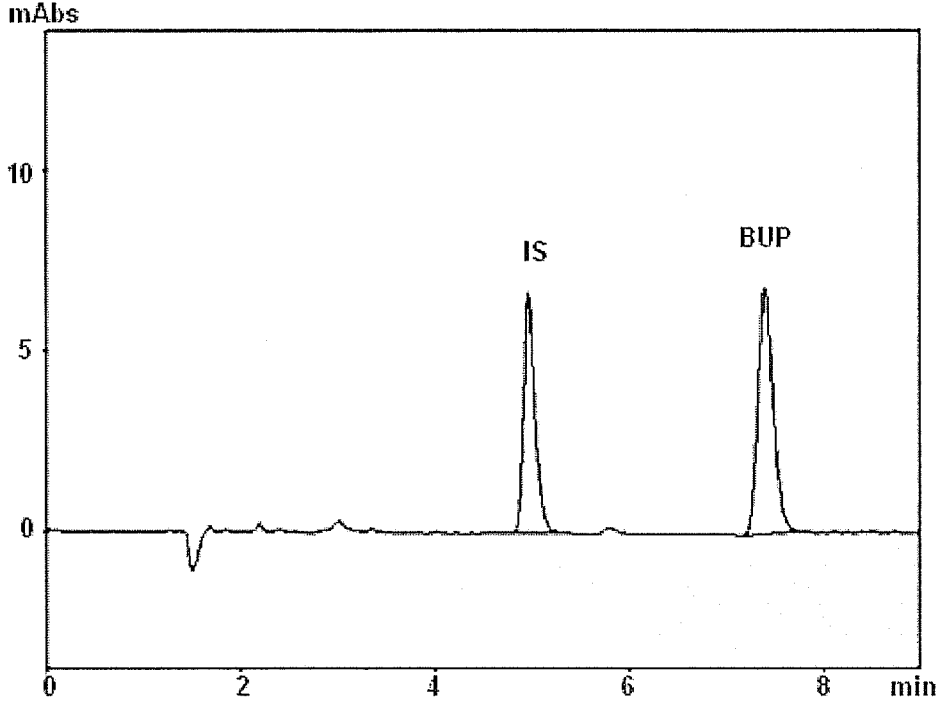
Şekil 22. Alıkonma Zamanı (RT) ve Teorik Tabaka Sayısının (N) Fosfat Derişimine (mM) Göre Değişim Grafiği (Koşullar: Metanol-Asetonitril-Fosfat Tamponu (pH:3) (40:10:50, h/h/h) ve 10 mM 1-HSA)

Yöntem optimizasyonunun son basamağı olarak, cihaz ile ilgili bir parametre olan akış hızı taranmış ve 0.8-1.2 mL.dk⁻¹ aralığında yapılan tarama sonuçlarına göre, en uygun şartlar 1 mL.dk⁻¹ akış hızı ile sağlanmıştır (Şekil 23).



Şekil 23. Alıkonma Zamanı (RT) ve Teorik Tabaka Sayısının (N) Akış Hızına Göre Değişim Grafiği (Koşullar: Metanol-Asetonitril-Fosfat Tamponu (20 mM, pH:3) (40:10:50, h/h/h), 10 mM 1-HSA)

Optimizasyon çalışmalarının sonucunda, metanol-asetonitril-fosfat tamponu (20 mM, pH=3) (40:10:50, h/h/h) ve 10 mM 1-HSA içeren hareketli faz ile 1 mL.dk⁻¹ akış hızında ve 254 nm dalga boyu kullanılarak, analizler yapılmış ve bu koşullarda IS olarak kullanılan CBZ ve BUP'un alıkonma zamanları sırasıyla 4.97 ± 0.02 dakika (n=8, BSS=% 0.46) ve 7.42 ± 0.04 dakika (n=8, BSS=% 0.60) olarak bulunmuştur (Şekil 24).



Şekil 24. Optimum Koşullarda BUP (7.16×10^{-6} M) ve CBZ (IS, 8.38×10^{-6} M)'nin Kromatogramı

Şekil 24'de verilmiş olan kromatogramdan, değişik parametreler incelenmiş ve sistem uygunluk test sonuçları Çizelge 17'de verilmiştir. Sonuçlar FDA kriterlerine göre istenen değerlerle karşılaştırıldığında, bu değerlerle son derece uyumlu oldukları görülmüştür (Shabir, 2003).

Çizelge 17. BUP'un Sistem Uygunluk Parametreleri

Parametreler	Gözlenen Değer	İstenen Değer
Alıkonma zamanı (dakika)	7.42	
Kapasite faktörü (k')	3.40	>2
Kuyruklanma faktörü (T)	1.28	≤2
Ayırım (R_s)	9.15	>2
Teorik tabaka sayısı (N)	9849	>2000
% BSS (n=8)	0.60	≤1

YPSK yönteminin validasyonu

Kesinlik (Precision)

BUP'un 1.79×10^{-6} , 5.37×10^{-6} ve 8.95×10^{-6} M derişimlerde elde edilen alan oranları, yöntemin kesinliğinin gösterilmesi için istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar, **Çizelge 18**'de verilmektedir.

Kesinlik sonuçlarına göre, % 1-2 dolayında BSS değerleri ile yüksek düzeyde tekrar edilebilirlik elde edilmiştir.

Çizelge 18. BUP'un Gün İçi ve Günler Arası Tekrar Edilebilirlik Sonuçları

1.79×10^{-6} M	Gün İçi Ortalama Kesinlik			Günler Arası Kesinlik
	I. Gün (n=7)	II. Gün (n=7)	III. Gün (n=7)	
OAO	0.358	0.353	0.337	0.354
SS	0.006	0.004	0.006	0.006
% BSS	1.54	1.07	1.88	1.75
SH	0.002	0.001	0.002	0.002

5.37×10^{-6} M	Gün İçi Ortalama Kesinlik			Günler Arası Kesinlik
	I. Gün (n=7)	II. Gün (n=7)	III. Gün (n=7)	
OAO	1.001	1.149	1.141	1.145
SS	0.006	0.010	0.006	0.008
% BSS	0.57	0.85	0.50	0.75
SH	0.002	0.004	0.002	0.002

8.95×10^{-6} M	Gün İçi Ortalama Kesinlik			Günler Arası Kesinlik
	I. Gün (n=7)	II. Gün (n=7)	III. Gün (n=7)	
OAO	1.900	1.783	1.840	1.852
SS	0.016	0.009	0.014	0.036
% BSS	0.84	0.51	0.76	1.97
SH	0.006	0.003	0.005	0.010

Doğrusallık (Linearity)

4.48×10^{-7} - 1.78×10^{-5} M derişim aralığındaki kalibrasyon çözeltileri analiz edildikten sonra istatistiksel değerlendirmeye göre elde edilen sonuçlar, **Çizelge 19**'da verilmektedir.

Çizelge 19. 4.48×10^{-7} - 1.78×10^{-5} M Derişim Aralığındaki BUP'un 254 nm'deki Doğrusallığı

	Gün İçi			Günler Arası
	1. Gün (n=7)	2. Gün (n=7)	3. Gün (n=7)	Tüm Günler (n=21)
Eğim, a	209400	174000	180200	176800
Kesim, b	0.028	0.054	0.027	0.045
Korelasyon Katsayısı, r	0.9994	0.9993	0.9998	0.9994
Eğimin Standart Hatası	3190	2927	1289	1609
Kesimin Standart Hatası	0.019	0.025	0.011	0.012

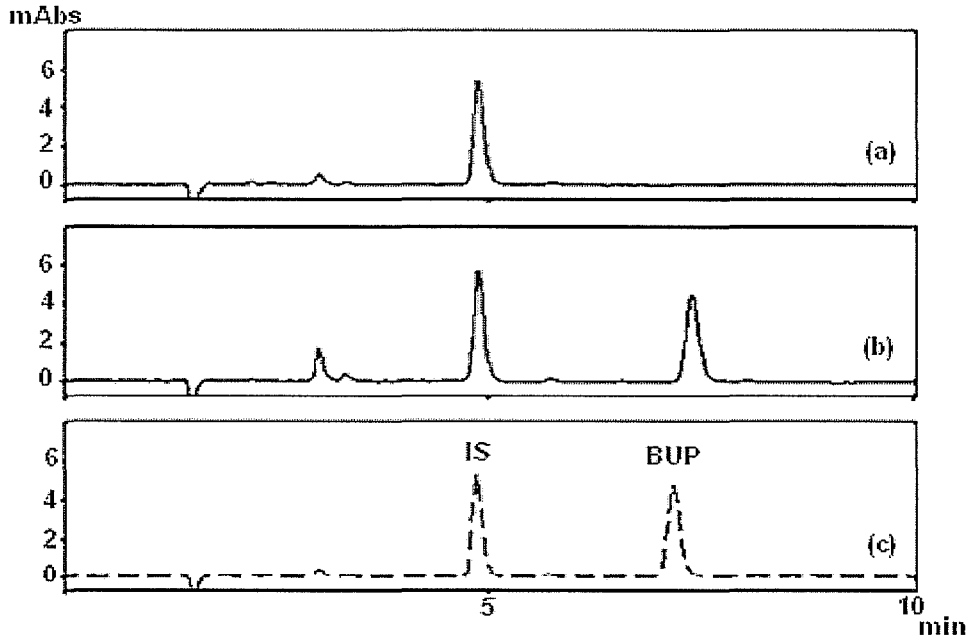
Çizelge 19'da görüldüğü gibi, geliştirilmiş olan spektroskopik yöntemler ve İTK yöntemine göre daha yüksek korelasyon katsayısına sahip doğrusal eşitlikler elde edilmiştir.

Saptama sınırı ve tayin alt sınırı (LOD and LOQ)

BUP'un YPSK yöntemiyle LOD ve LOQ değerleri, sırasıyla 1.34×10^{-8} M ve 4.06×10^{-8} M olarak hesaplanmıştır.

Doğruluk (Accuracy)

Yöntem doğruluğu, deneysel bölümde belirtildiği şekilde araştırılmış ve Zyban® tablet içindeki yardımcı maddelerin BUP tayininin doğruluğuna etkisinin olmadığı gösterilmiştir (**Şekil 25**).



Şekil 25. Optimum Koşullarda BUP ve CBZ (IS)'nin Tablet Analizlerindeki Kromatogramı (a) BUP Eklenmemiş Tablet Matriksi (b) 5.37×10^{-6} M BUP Eklenmiş Tablet Matriksi (c) Ticari Tablet

1.79×10^{-6} , 5.37×10^{-6} ve 8.95×10^{-6} M derişimlerdeki BUP çözeltilerinin matriks çözeltilisine eklenerek karıştırılması, YPSK yöntemi kullanılarak analiz edilmesi ve BUP içeriğine karşılık gelen alan oranı değerlerinin kalibrasyon eşitliğinde çözülmesiyle hesaplanan yüzde geri kazanım ve yüzde bağıl hata değerleri **Çizelge 20'**de verilmiştir.

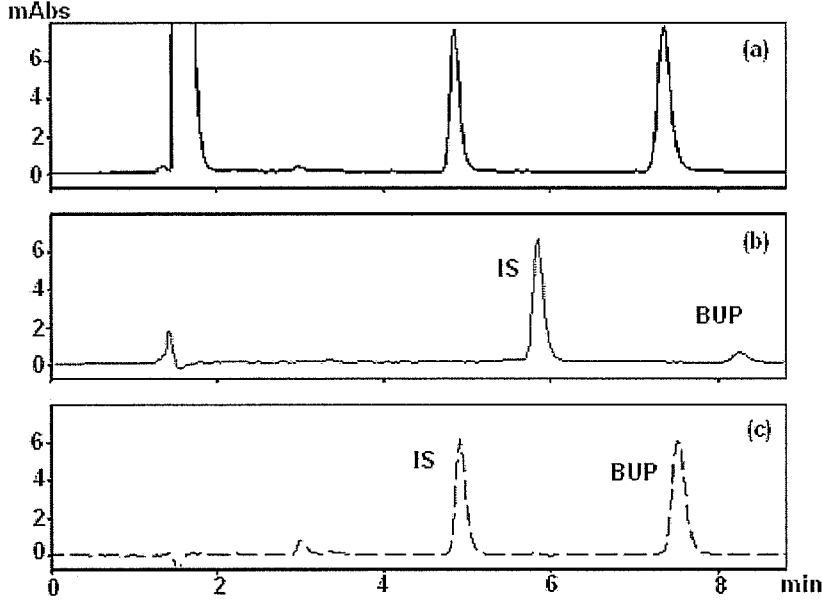
Çizelge 20. YPSK Yönteminin Doğruluk Sonuçları (n=7)

Standart BUP (M)	Bulunan BUP (M) (ortalama \pm SS)	Geri Kazanım (%)	BH (%)	BSS (%)
1.79×10^{-6}	$1.77 \times 10^{-6} \pm 2.72 \times 10^{-8}$	98.66	-1.34	1.54
5.37×10^{-6}	$5.47 \times 10^{-6} \pm 3.10 \times 10^{-8}$	101.87	1.87	0.57
8.95×10^{-6}	$9.01 \times 10^{-6} \pm 7.59 \times 10^{-8}$	100.71	0.71	0.84
Matrikse Eklenen BUP (M)	Bulunan BUP (M) (ortalama \pm SS)	Geri Kazanım (%)	BH (%)	BSS (%)
1.79×10^{-6}	$1.82 \times 10^{-6} \pm 1.6 \times 10^{-8}$	101.59	1.59	0.87
5.37×10^{-6}	$5.47 \times 10^{-6} \pm 4.89 \times 10^{-8}$	101.86	1.86	0.89
8.95×10^{-6}	$9.07 \times 10^{-6} \pm 6.27 \times 10^{-8}$	101.35	1.35	0.69

Çizelge 20'de YPSK yönteminin doğruluk sonuçlarının kabul edilebilirlik kriteri dahilinde olduğu ve Zyban[®] tablet içindeki yardımcı maddelerin BUP tayininin doğruluğuna etkisinin olmadığı görülmektedir (ICH Q2(R1), 2005).

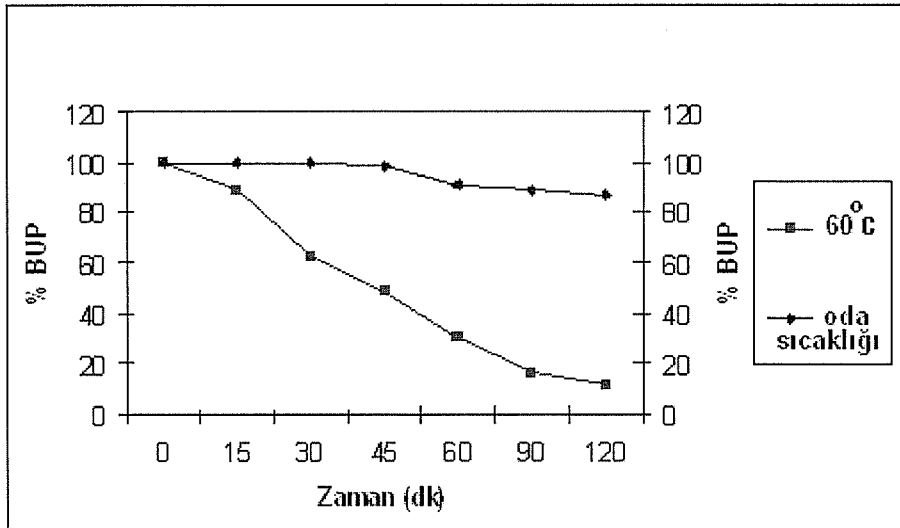
Özgünlük (Specificity)

Özgünlük çalışması sonucu elde edilen veriler incelendiğinde, BUP'un hem oda sıcaklığında hem de 60°C sıcaklıkta asit çözeltisi içinde herhangi bir bozunmaya uğramadığı ve 120 dakika boyunca kararlı olduğu görülmektedir (**Şekil 26c**). Bu durum literatürde geçen, BUP'un asit kararlılığı verilerini doğrulamaktadır (Laizure ve DeVane,1985).



Şekil 26. Optimum Koşullarda BUP ve CBZ (IS)'nin Yöntem Özgünlük Sonuçları (a) % 3'lük H₂O₂ İçerisinde Hazırlanmış BUP (b) 0.1 N NaOH İçerisinde Hazırlanmış BUP (c) 0.1 N HCl İçerisinde Hazırlanmış BUP

Bazla muamele edilen numunelerin kromatogramları incelendiğinde, çözücü pikinin olduğu yerde gelen pik haricinde herhangi bir bozunma piki oluşmamasına karşın, (**Şekil 26b**) oda sıcaklığında daha yavaş olmak üzere; 60°C sıcaklıkta hızlı bir şekilde bozunma olmuştur (**Şekil 27**).



Şekil 27. Oda Sıcaklığında ve 60°C Sıcaklıkta, Bazla Muamele Karşısında Zamana Karşı % BUP Değişim Grafiği

% 3'lük peroksit ile muamele edilen numuneler, oda sıcaklığında herhangi bir bozunmaya uğramamış, 60°C sıcaklıkta ise 90 dakikadan sonra % 6-7 oranında bir bozunma görülmüştür. % 3'lük peroksit ile muamele edilen numunelerin kromatogramlarının tümünde 1.5 dakikada gelen 3-4 milyon alana sahip bir pik bulunmaktadır ve bundan başka herhangi bir yabancı pik oluşmamıştır (**Şekil 26a**).

Sağlamlık (Robustness)

Deneysel parametrelerdeki küçük değişiklikler sonucunda pik alan oranlarının % BSS ve SH değerleri hesaplanmış ve **Çizelge 21**'de belirtilmiştir. Elde edilen düşük % BSS değerleri (<2) yöntemin sağlamlığını göstermektedir (Dejaegher ve Vander Heyden, 2007).

Çizelge 21. YPSK Yönteminin Sağlamlık Sonuçları (n=3, 5.37x10⁻⁶ M BUP)

Parametre	% BSS	SH
1) Hareketli faz pH'ı (2.9, 3 ve 3.1)	0.90	0.005
2) Akış hızı (0.9, 1 ve 1.1 mL.dk ⁻¹)	0.75	0.005
3) Fosfat derişimi (18, 20 ve 22 mM)	0.96	0.006
4) 1-HSA derişimi (8, 10 ve 12 mM)	0.91	0.006
5) Dalga boyu (252, 254 ve 256 nm)	1.27	0.008
6) Organik faz yüzdesi (% 48, % 50 ve % 52)	0.71	0.004

Tutarlılık (Ruggedness)

Geliştirilen metodun 5.37x10⁻⁶ M'lık BUP derişiminde, aynı cihaz ile farklı analizciler tarafından ve farklı günlerde uygulanması ile yapılan analizler ve istatistiksel hesaplamalara göre, sonuçlar oldukça tekrar edilebilir bulunmuş ve analizciler arasında önemli bir fark görülmemiştir (**Çizelge 22**). Ayrıca, pik alanları için elde edilen düşük % BSS (<2) değerleri, yöntemin tutarlılığını kanıtlamaktadır (Dejaegher ve Vander Heyden, 2007).

Çizelge 22. YPSK Yönteminin Tutarlılık Sonuçları (n=7, 5.37x10⁻⁶ M BUP)

	I. Analizci	II. Analizci
Ortalama ± SS (n=7)	5.39x10 ⁻⁶ ± 4.20x10 ⁻⁸	5.41x10 ⁻⁶ ± 4.94x10 ⁻⁸
% BSS	0.78	0.91
t-Testi (p<0.05)	1.18	Tablo t _{0.05} = 2.57
F-Testi (p<0.05)	0.72	Tablo F _{0.05} = 5.05

BUP içeren tabletlerde miktar tayini

Validasyonu gösterilen YPSK yönteminin uygulaması, farmasötik tabletlerde yapılmış ve analiz sonuçları **Çizelge 23**'de sunulmuştur. Tablet bileşenlerinden

kaynaklanan ve ölçümleri etkileyecek hiç bir girişim gözlenmemiş ve Zyban® tablet içeriği farmakopenin gerektirdiği aralıkta bulunmuştur (USP 29, 2006).

Çizelge 23. Tablet Analizi Sonuçları (n=9, 5.37x10⁻⁶ M BUP)

	BUP (mg)	% BUP
Ortalama	152.76	101.84
SS	0.60	0.40
% BSS	0.39	0.39

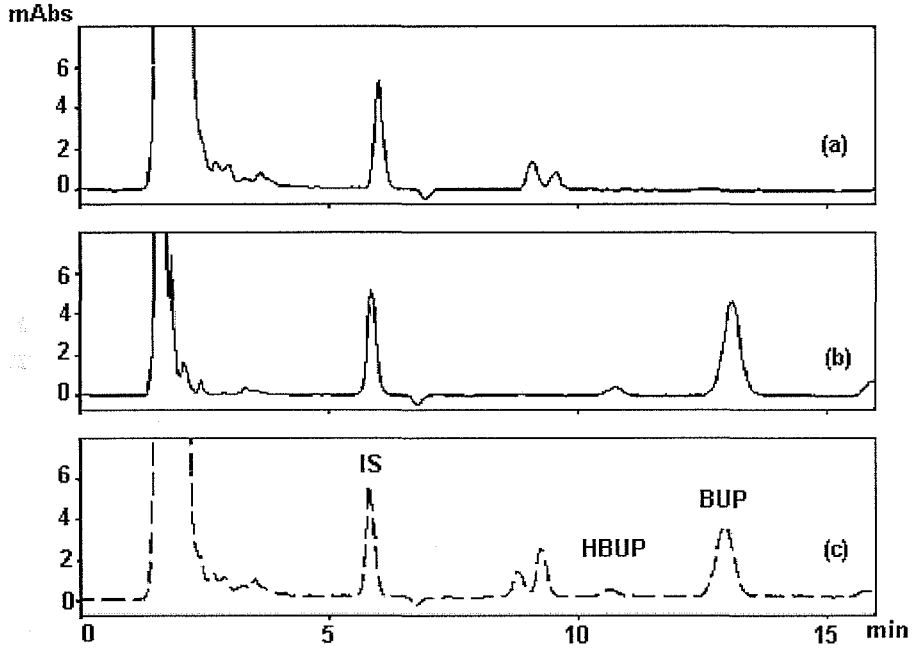
Ayrıca Zyban® tablet için YPSK ve İTK yöntemleri ile bulunan tablet içeriği sonuçları, Wilcoxon testi kullanılarak %95'lik önem düzeyinde istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve iki yöntem arasında fark olmadığı bulunmuştur (P_H=0.5625).

BUP ve HBUP'un YPSK Yöntemi ile Plazmada Miktar Tayini

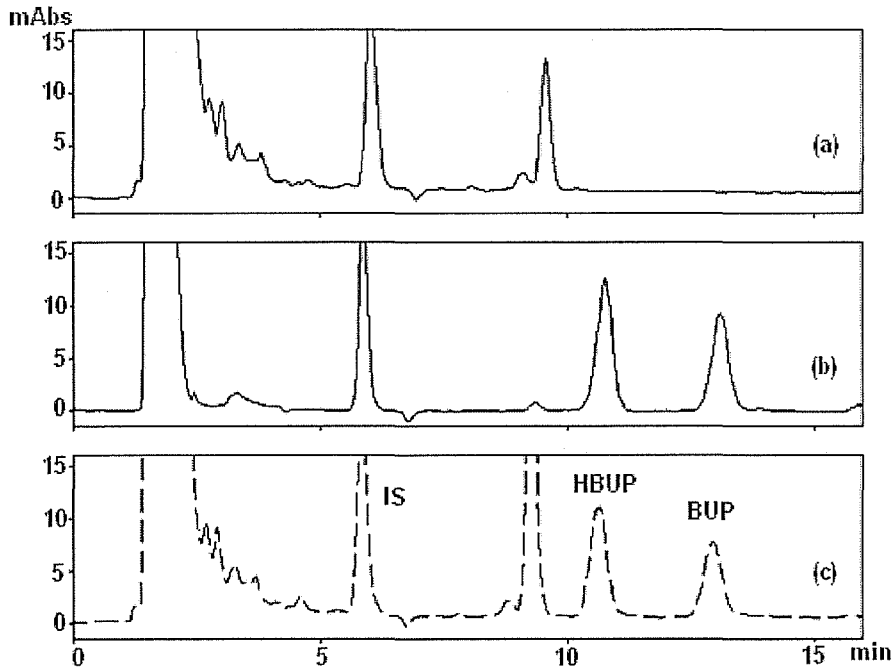
YPSK yönteminin optimizasyonu

BUP'un farmasötik tabletlerindeki tayini için yapılan optimizasyon çalışmalarının sonucunda metanol-asetonitril-fosfat tamponu (20 mM, pH=3) (40:10:50, h/h/h) ve 10 mM 1-HSA içeren hareketli faz ile 1 mL.dk⁻¹ akış hızında ve 254 nm dalga boyu kullanılarak, analizler yapılmış ve bu koşullarda IS olarak kullanılan CBZ'nin ve BUP'un alıkonma zamanları sırasıyla 4.97 ± 0.02 (n=8, BSS=% 0.46) ve 7.42 ± 0.04 (n=8, BSS=% 0.60) dakika olarak bulunmuştur. Daha sonra BUP ve HBUP'un plazmadaki tayini için HBUP bu sisteme verildiğinde, alıkonma zamanı 6.7 dakika olarak gözlenmiştir. Ayrıca plazmada analiz yapıldığında, 2. dakikada plazmadan kaynaklanan çok büyük bir pik görülmektedir. HBUP'un 254 nm dalga boyunda absorbansının düşük olması, HBUP analizi için 214 nm dalga boyunun kullanılmasını zorunlu kılmaktadır. Bu dalga boyunda saptama yaparken, 2. dakikada gelen pik 5. dakika'ya kadar genişlemekte, bu şartlarda analizi zorlaştırmaktadır. Önceden yapılan optimizasyon çalışmalarında, fosfat tamponu derişiminin azaltılması ile alıkonma zamanlarının arttığı; ayrıca pik morfolojisinde önemli bir fark olmadığı görülmüştür. Bu verilerden yararlanılarak, BUP ve HBUP'un plazmadaki analizi için hareketli fazı oluştururken fosfat tamponunun 20 mM yerine 10 mM'lık derişimde kullanılması düşünülmüştür. Böylece maddelerin alıkonma zamanlarının ileriye kayması ve safsızlıktan uzaklaşması planlanmıştır. IS, HBUP ve BUP için sırasıyla 5.5, 9 ve 11 dakika olan alıkonma zamanları uygun olmasına karşın, yalnızca plazma kromatogramlarında HBUP'dan hemen önce gelen ve ondan ayrılmamış olan büyük bir pik görülmektedir. Alıkonma zamanlarını büyük ölçüde değiştirmeden, HBUP ve safsızlık ayırımını sağlayabilmek için, 10 mM olan 1-HSA derişimi 15 mM'a çıkarılmıştır. Bu derişimde bir düzelme kaydedilmesine karşın, iyi bir ayırım sağlanamamıştır. Bunun üzerine 20 mM derişimde 1-HSA uygulanmış ve tüm pikler için iyi bir ayırım gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak, metanol-asetonitril-fosfat tamponu (10 mM, pH=3) (40:10:50, h/h/h) ve 20 mM 1-HSA içeren hareketli faz ile 1 mL.dk⁻¹ akış hızında, 254 ve 214 nm dalga boyları kullanılarak analizler yapılmış ve bu koşullarda IS olarak önceki analizlerde

olduğu gibi CBZ kullanılmıştır. 254 ve 214 nm dalga boylarında ayrı ayrı boş plazma örneğinin, BUP ve HBUP eklenmiş plazma örneğinin ve aynı derişimde hazırlanmış sulu ortamdaki standart BUP ve HBUP zeltilerinin kromatogramları alınmış ve Şekil 28-29'da verilmiştir.



Şekil 28. 254 nm'de Kaydedilmiş (a) IS Eklenmiş Boş Plazma Kromatogramı (b) Standart BUP (1.79×10^{-5} M) ve HBUP'un (6.10×10^{-5} M) Kromatogramı (c) BUP (1.79×10^{-5} M) ve HBUP (6.10×10^{-5} M) Eklenmiş Plazma Kromatogramı



Şekil 29. 214 nm'de Kaydedilmiş (a) IS Eklenmiş Boş Plazma Kromatogramı (b) Standart BUP (1.79×10^{-5} M) ve HBUP'un (6.10×10^{-5} M) Kromatogramı (c) BUP (1.79×10^{-5} M) ve HBUP (6.10×10^{-5} M) Eklenmiş Plazma Kromatogramı

YPSK yönteminin validasyonu

Kesinlik ve geri kazanım oranı (Precision and Recovery)

Yöntemin kesinliğinin incelenmesi amacıyla, hazırlanan ve plazmaya eklenmiş olan BUP'un 1.43×10^{-6} , 3.59×10^{-6} ve 1.79×10^{-5} M derişimlerde, HBUP'un ise 2.03×10^{-6} , 4.88×10^{-6} ve 6.10×10^{-5} M derişimlerde elde edilen alan oranları, yöntemin kesinliğinin gösterilmesi için istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar, **Çizelge 24** ve **25**'de verilmiştir.

Çizelge 24. Plazmaya Eklenmiş Olan BUP'un Gün İçi ve Günler Arası Tekrar Edilebilirlik Sonuçları

1.43×10^{-6} M	Gün İçi Ortalama Kesinlik			Günler Arası Kesinlik
	I. Gün (n=6)	II. Gün (n=6)	III. Gün (n=6)	
OAO	0.1518	0.1477	0.1360	0.1474
SS	0.003	0.003	0.002	0.005
% BSS	1.74	1.90	1.40	3.26
SH	0.001	0.001	0.001	0.001

3.59×10^{-6} M	Gün İçi Ortalama Kesinlik			Günler Arası Kesinlik
	I. Gün (n=6)	II. Gün (n=6)	III. Gün (n=6)	
OAO	0.3223	0.3295	0.3278	0.3266
SS	0.003	0.006	0.006	0.006
% BSS	1.01	1.82	1.92	1.82
SH	0.001	0.002	0.002	0.001

1.79×10^{-5} M	Gün İçi Ortalama Kesinlik			Günler Arası Kesinlik
	I. Gün (n=6)	II. Gün (n=6)	III. Gün (n=6)	
OAO	1.589	1.592	1.510	1.577
SS	0.015	0.012	0.015	0.031
% BSS	0.97	0.77	1.01	1.99
SH	0.006	0.005	0.006	0.008

Çizelge 25. Plazmaya Eklenmiş Olan HBUP'un Gün İçi ve Günler Arası Tekrar Edilebilirlik Sonuçları

2.03x10 ⁻⁶ M	Gün İçi Ortalama Kesinlik			Günler Arası Kesinlik
	I. Gün (n=6)	II. Gün (n=6)	III. Gün (n=6)	
OAO	0.046	0.045	0.045	0.045
SS	0.001	0.001	0.001	0.001
% BSS	2.15	2.61	1.67	1.92
SH	0.0004	0.0005	0.0003	0.0002
4.88x10 ⁻⁶ M	Gün İçi Ortalama Kesinlik			Günler Arası Kesinlik
	I. Gün (n=6)	II. Gün (n=6)	III. Gün (n=6)	
OAO	0.1075	0.1048	0.1120	0.1074
SS	0.002	0.002	0.002	0.003
% BSS	2.10	2.04	1.60	2.86
SH	0.001	0.001	0.001	0.001
6.10x10 ⁻⁵ M	Gün İçi Ortalama Kesinlik			Günler Arası Kesinlik
	I. Gün (n=6)	II. Gün (n=6)	III. Gün (n=6)	
OAO	1.068	1.014	1.033	1.042
SS	0.020	0.018	0.012	0.020
% BSS	1.84	1.80	1.22	1.90
SH	0.008	0.007	0.005	0.005

Kesinlik sonuçlarına göre, tümü % 3'den küçük olacak şekilde BSS değerleri ile yüksek düzeyde tekrar edilebilirlik elde edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar, aynı derişimde hazırlanmış sulu ortamdaki standart BUP ve HBUP çözeltilerinin sonuçları ile karşılaştırılarak, geri kazanım oranları belirlenmiştir. Sonuçlar, **Çizelge 26 ve 27'** de verilmektedir.

Çizelge 26. BUP'un Plazmada Kesinliği ve Geri Kazanım Oranı (gün=3, n=6)

	Derişim (M)		Geri Kazanım (%)	BSS (%)
	Eklenen	Bulunan (ortalama ± SS)		
Gün İçi	1.43x10 ⁻⁶	1.17x10 ⁻⁶ ± 1.63x10 ⁻⁸	81.88	1.40
	3.59x10 ⁻⁶	2.65x10 ⁻⁶ ± 5.10x10 ⁻⁸	73.79	1.92
	1.79x10 ⁻⁵	1.45x10 ⁻⁵ ± 1.12x10 ⁻⁷	81.10	0.77
Günler Arası	1.43x10 ⁻⁶	1.16x10 ⁻⁶ ± 2.21x10 ⁻⁸	81.42	3.26
	3.59x10 ⁻⁶	2.97x10 ⁻⁶ ± 5.40x10 ⁻⁸	82.74	1.82
	1.79x10 ⁻⁵	1.46x10 ⁻⁵ ± 1.47x10 ⁻⁷	81.79	1.99

Çizelge 27. HBUP'un Plazmada Kesinliği ve Geri Kazanım Oranı (gün=3, n=6)

	Derişim (M)		Geri Kazanım (%)	BSS (%)
	Eklenen	Bulunan (ortalama ± SS)		
Gün İçi	2.03x10 ⁻⁶	1.74x10 ⁻⁶ ± 2.90x10 ⁻⁸	85.82	1.67
	4.88x10 ⁻⁶	4.50x10 ⁻⁶ ± 7.19x10 ⁻⁸	92.26	1.60
	6.10x10 ⁻⁵	5.40x10 ⁻⁵ ± 6.57x10 ⁻⁷	88.53	1.22
Günler Arası	2.03x10 ⁻⁶	1.69x10 ⁻⁶ ± 4.39x10 ⁻⁸	83.02	1.92
	4.88x10 ⁻⁶	4.49x10 ⁻⁶ ± 9.43x10 ⁻⁸	92.01	2.86
	6.10x10 ⁻⁵	5.24x10 ⁻⁵ ± 9.66x10 ⁻⁷	85.90	1.90

Çizelge 26 ve 27'de görüldüğü gibi BUP için ortalama olarak % 80, HBUP için ise % 90 dolayında oldukça yüksek geri kazanım elde edilmiştir.

Doğrusallık (Linearity)

Öncelikle plazma analizleri ile aynı prosedür kullanılarak, sulu ortamda hazırlanmış standart BUP ve HBUP çözeltilerinin artan derişimlerine karşılık gelen pik alan oranları (BUP'un veya HBUP'un pik alanı/IS'nin pik alanı) araştırılmış ve doğrusallık sonuçları **Çizelge 28 ve 29**'da belirtilmiştir.

Çizelge 28. 4.48×10^{-7} - 1.79×10^{-5} M Derişim Aralığında Standart BUP'un 254 nm'deki Doğrusallığı

	Gün İçi			Günler Arası
	1. Gün (n=6)	2. Gün (n=6)	3. Gün (n=6)	Tüm Günler (n=18)
Eğim, a	140500	99830	144000	143500
Kesim, b	-0.020	-0.020	-0.067	-0.063
Korelasyon Katsayısı, r	0.9996	0.9995	0.9998	0.9984
Eğimin Standart Hatası	1325	1083	940.1	1546
Kesimin Standart Hatası	0.011	0.009	0.012	0.015

Çizelge 29. 1.02×10^{-6} - 6.09×10^{-5} M Derişim Aralığında Standart HBUP'un 214 nm'deki Doğrusallığı

	Gün İçi			Günler Arası
	1. Gün (n=6)	2. Gün (n=6)	3. Gün (n=6)	Tüm Günler (n=18)
Eğim, a	29180	26970	36560	29740
Kesim, b	-0.006	-0.049	-0.050	-0.022
Korelasyon Katsayısı, r	0.9998	0.9990	0.9996	0.9981
Eğimin Standart Hatası	187.8	426.4	368.2	376.6
Kesimin Standart Hatası	0.003	0.011	0.011	0.008

Çizelge 28 ve 29'da görüldüğü gibi, belirtilen derişim aralıklarında sulu ortamda hazırlanmış BUP ve HBUP çözeltileri için yüksek korelasyon katsayılarına sahip, doğrusal eşitlikler elde edilmiştir.

Daha sonra, birbirini takip eden 3 günde, plazmaya eklenmiş olan BUP ve HBUP çözeltilerinin pik sinyalleri kaydedilerek, artan derişimler ile karşılık gelen pik alan oranı değerleri arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve elde edilen sonuçlar, **Çizelge 30 ve 31**'de verilmiştir.

Çizelge 30. 8.97×10^{-7} - 1.79×10^{-5} M Derişim Aralığında Plazmaya Eklenmiş Olan BUP'un 254 nm'deki Doğrusallığı

	Gün İçi			Günler Arası
	1. Gün (n=6)	2. Gün (n=6)	3. Gün (n=6)	Tüm Günler (n=18)
Eğim, a	106100	101200	96290	104900
Kesim, b	-0.004	-0.008	-0.043	-0.030
Korelasyon Katsayısı, r	0.9993	0.9982	0.9991	0.9981
Eğimin Standart Hatası	1386	2121	1432	1255
Kesimin Standart Hatası	0.014	0.018	0.010	0.010

Çizelge 31. 2.03×10^{-6} - 5.49×10^{-5} M Derişim Aralığında Plazmaya Eklenmiş Olan HBUP'un 214 nm'deki Doğrusallığı

	Gün İçi			Günler Arası
	1. Gün (n=6)	2. Gün (n=6)	3. Gün (n=6)	Tüm Günler (n=18)
Eğim, a	28910	20720	20160	20400
Kesim, b	-0.009	-0.010	-0.003	0.002
Korelasyon Katsayısı, r	0.9998	0.9998	0.9986	0.9983
Eğimin Standart Hatası	207.8	144.3	380.4	226.8
Kesimin Standart Hatası	0.006	0.005	0.009	0.006

Saptama sınırı ve tayin alt sınırı (LOD and LOQ)

BUP'un plazmada YPSK yöntemiyle LOD ve LOQ değerleri, sırasıyla 9.09×10^{-8} M ve 2.76×10^{-7} M olarak hesaplanmıştır. HBUP'un LOD ve LOQ değerleri ise, 4.68×10^{-7} M ve 1.42×10^{-6} M olarak bulunmuştur.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Bupropion hidroklorür (BUP), fenilaminoketon grubu atipik bir antidepresan ajandır. BUP'un sürekli salım formülasyonu (Zyban®), FDA tarafından 1997 yılında kabul edilmiş olmasına karşın, BUP tayinini içeren çalışma sayısı fazla değildir ve literatürde BUP'un farmasötik formlarındaki miktar tayini konusunda çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada öncelikle, BUP'un farmasötik tabletlerindeki tayini için potansiyometri, kondüktometri ve spektrofotometri gibi basit, güvenilir, pahalı çözücü ve ekipman gerektirmeyen dolayısıyla analiz maliyeti düşük olan, iyi bilinen ve sıklıkla her laboratuvarında kullanılan klasik analiz yöntemleri geliştirilmiştir. Spektrofotometrik yöntemler iki tane olup, biri UV-spektrofotometri diğeri ise ikinci türev spektrofotometri yöntemidir. Belirtilen yöntemler bilindiği gibi seçici yöntemler olmayıp, bu yöntemlerle maddelerin ayrımı mümkün değildir. Diğer yandan, spektrofotometrik yöntemler, potansiyometri ve kondüktometri yöntemleri ile karşılaştırıldığında önemli üstünlüklere sahiptir. Örneğin spektrofotometrik bir analiz yaparken 10^{-5} M'lık derişim düzeyinde ve 1 mL'lik hacimde çözelti kullanılmaktadır. Potansiyometrik ve kondüktometrik yöntemlerde ise, her analiz için bir tablet ağırlığına eşdeğer miktarda standart madde gerekmekte ve daha az standart madde kullanıldığında uygun potansiyometrik ve kondüktometrik eğriler elde edilememektedir. Aşırı miktarda standart BUP kullanımından kaynaklanan yüksek analiz maliyetini önlemek için, potansiyometri ve kondüktometri yöntemlerinde validasyon yapılmamış ve spektrofotometrik yöntemler, validasyonu yapılmış daha güvenilir ve daha duyarlı yöntemler olarak kabul edilmiştir. Diğer yandan, potansiyometri ve kondüktometri yöntemlerinde spektrofotometrik yöntemlerin aksine, bulanık çözeltilerle çalışılabildiği için tablet çözeltilerini süzmeye gerek duyulmamakta ve bu durum zamandan kazanç sağlamaktadır.

Daha sonra, etkin maddenin kararlılığının araştırıldığı ve yöntemin BUP tabletlerine uygulandığı, önceden bahsedilmiş olan yöntemler gibi basit, güvenilir, analiz maliyeti düşük aynı zamanda seçici ve spektrofotometrik yöntemlerden daha duyarlı bir İTK yöntemi geliştirilmiştir. USP 29, (2006) BUP monografında bulunan, BUP safsızlığı m-klorobenzoik asit için kullanılmış olan İTK yöntemi, BUP tayini için uygulanmış ve yöntemin uygun olmadığı ve bu amaçla kullanılamayacağı gösterilmiştir. Bu yönden yapılan çalışma orjinallik özelliği taşımaktadır. İTK yönteminin YPSK yöntemi ile karşılaştırıldığında en büyük üstünlüğü, numunenin doğrudan uygulanabilmesi ve saflaştırma basamaklarına gerek duyulmamasıdır. Ayrıca çok az miktarda hareketli faz yardımıyla, çok sayıda numunenin analizi aynı anda yapılabilmektedir (Agrawal ve ark., 2003; Kaul ve ark., 2004; Motwani ve ark., 2006; Venkatachalam ve Chatterjee, 2007). Örneğin, YPSK yöntemi ile çalışırken tek bir analiz için yaklaşık 30-40 dakika harcanmakta bu da 30-40 mL hareketli faz harcanmasına karşılık gelmektedir. İTK yönteminde ise 20 mL hareketli faz kullanılarak, tek bir plak üzerine 20 uygulama yapılabilir. Ayrıca, İTK yönteminde YPSK yönteminin aksine, kolonun yıkanması ve şartlandırılması aşamalarına gerek yoktur. Bu durum, zamandan önemli bir kazanç sağlamaktadır. Belirtilmiş olan üstünlüklerine karşın, duyarlılık YPSK yöntemindeki kadar yüksek değildir. Ayrıca, uygulama ve tarama cihaz tarafından yapılmasına karşın, maddenin hareketli faz yardımıyla plak üzerinde

yürütülmesi aşamasının dışarıda analizci tarafından yapılıyor olması ve kromatografi basamaklarının arka arkaya analizci tarafından takip edilmesi, analizci kaynaklı hatalara sebep olabilmektedir. Yüksek duyarlılık ve otomasyona sahip YPSK yönteminde ise bu durum söz konusu değildir. Geliştirilmiş olan İTK yöntemi, BUP'un plazmadaki tayinine de uygulanmış ve kesinlik, doğrusalılık, geri kazanım, saptama sınırı ve tayin alt sınırını kapsayan validasyon parametreleri plazmada gösterilmiştir. Ortalama olarak % 87 dolayında, oldukça yüksek bir geri kazanım ve düşük bağıl standart sapma değerleri ile yüksek düzeyde kesinlik elde edilmiştir, fakat BUP ve HBUP'un birlikte tayinini sağlamak için gerekli duyarlılık sağlanamamıştır.

İTK yönteminden sonra literatürdeki bir çalışmadan yola çıkarak ve BUP'un zayıf bazik yapısını da göz önünde bulundurarak, BUP'un farmasötik tabletlerinde tayini için bir YPSK yöntemi geliştirilmiştir (Ciolino ve ark., 1999). Yöntemin optimizasyon aşamasında her parametre ayrı ayrı ele alınmış ve parametrelerdeki değişikliklerin BUP pikinin teorik tabaka sayısı ve alıkonma zamanı üzerine etkisi grafiklerle açıklanmıştır. Bu optimizasyon çalışmalarından, plazmadaki tayin sürecinde de büyük ölçüde yararlanılmıştır. Yöntem; İTK yöntemi ile tablet analizinde olduğu gibi kesinlik, doğrusalılık, saptama sınırı ve tayin alt sınırı, doğruluk, özgünlük, sağlamlık ve tutarlılık yönünden tam olarak valide edildikten sonra, farmasötik tablet analizine uygulanmıştır.

Önceden değinildiği gibi, literatürdeki BUP'un plazmada tayinini içeren çalışmalar az sayıdadır ve birkaçı SK-KS yöntemi ile olmak üzere, YPSK yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Farmasötik tablet analizi için geliştirilmiş olan YPSK yöntemi, plazmadaki analizler için yeniden düzenlenmiştir. Bu yöntem, farklı analitik kolon (C_8) ve hareketli faz içermesi ayrıca tek aşamalı protein çöktürme basamağı ve sulu fazın uçurulması amacı ile liyofilizasyon işleminin uygulanması yönünden literatürdeki diğer yöntemlerden farklıdır ve orjinallik taşımaktadır (Cooper ve ark., 1984; Suckow ve ark., 1986; Suckow ve ark., 1997; Zhang ve ark., 2003; Borges ve ark., 2004; Loboz ve ark., 2005). Böylece numune hazırlama basamağı daha kısa ve kolay hale getirilmiş, BUP'un ve ana metaboliti olan HBUP'un yüksek duyarlılıkla birlikte tayini sağlanmıştır. Validasyon parametreleri incelenmiş ve BUP için ortalama olarak % 80; HBUP için ise % 90 dolayında geri kazanım elde edilmiştir. Bu değerler, Loboz ve ark., (2005) nın yaptığı YPSK çalışmasında BUP ve HBUP için verilen % 62.9 ve % 62.3 değerlerine göre oldukça yüksek, Cooper ve ark., (1984) nın geliştirdiği YPSK yöntemiyle BUP ve HBUP için verilen % 82 ve % 95 değerleri ile karşılaştırılabilir düzeydedir. Zhang ve ark., (2003) nın yaptığı çalışmada ise plazmadan BUP geri kazanımı % 87.3 olarak bulunmuş, fakat bu çalışma ile HBUP tayini gerçekleştirilmemiştir.

Geliştirilmiş olan YPSK yöntemi ile BUP'un tabletlerindeki analizi için hazırlanan standart çözeltilerde, BUP için 4 ng.mL^{-1} ve 12 ng.mL^{-1} 'lik saptama sınırı ve tayin alt sınırı elde edilmiştir. Yöntemin plazmadaki saptama sınırı ve tayin alt sınırı ise sırasıyla BUP için 25 ve 76 ng.mL^{-1} ; HBUP için 120 ve 362 ng.mL^{-1} olarak bulunmuştur. BUP'un plazmadaki analizleri için literatürde verilen YPSK çalışmalarının $1-5 \text{ ng.mL}^{-1}$ düzeyindeki; SK/KS/KS çalışmalarının ise $0.25-1.25 \text{ ng.mL}^{-1}$ düzeyindeki saptama sınırlarına ulaşamamış, ancak standart çözeltilerle çalışıldığında YPSK çalışmalarının duyarlılığına ulaşmak mümkün

olmuştur (Cooper ve ark., 1984; Hsyu ve ark., 1997; Stewart ve ark., 2001; Zhang ve ark., 2003; Borges ve ark., 2004; Loboz ve ark., 2005). Plazmada HBUP için bulunan saptama sınırı, Loboz ve ark., (2005) nın geliştirdiği YPSK yöntemiyle HBUP için verilen 10 ng.mL⁻¹'lik saptama sınırı değerine göre yüksek iken, Cooper ve ark., (1984) nın çalışmasındaki 100 ng.mL⁻¹'lik saptama sınırı ile karşılaştırılabilir niteliktedir. Munro ve Walker; (2001) ın geliştirdikleri şiral ayırma yönteminde, BUP için 0.13 µg.mL⁻¹ ve 0.27 µg.mL⁻¹ olarak verilen saptama sınırı ve tayin alt sınırı değerleri, mevcut YPSK yöntemine göre oldukça yüksek düzeydedir.

Rutin analizlerde en önemli parametrelerden biri de analiz süresidir. Analiz süresinin kısalığı, hem zamandan kazanç sağlamakta hem de analiz maliyetini düşürmektedir. Geliştirilmiş olan YPSK yöntemi ile tabletlerdeki analizler 8 dakikadan önce tamamlanmakta, plazma analizlerinde ise IS, HBUP ve BUP piklerinin ayrımı sadece 13 dakika sürmektedir. Bu süreler, literatürdeki YPSK yöntemlerinin 20 ve 25 dakikalık analiz sürelerine göre oldukça kısadır. Dolayısıyla, geliştirilmiş olan YPSK yöntemi analiz süresi bakımından sözü edilen yöntemlere üstünlük taşımaktadır (Cooper ve ark., 1984; Loboz ve ark., 2005).

Ayrıca geliştirilmiş olan yöntemlerin tümü, tablet içeriği bakımından birbiri ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Wellbutrin® tablet içeriği için potansiyometrik, kondüktometrik ve spektrofotometrik yöntemler arasında yapılan ANOVA testi sonucu ($F_{4,23}=1.902$, $p<0.05$) ve Zyban® tablet içeriği için İTK ve YPSK yöntemleri arasında yapılan Wilcoxon testi sonucu ($P_H=0.5625>P=0.05$) farklı yöntemlerle elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel bir fark bulunmadığı görülmüştür.

Sonuç olarak, geliştirilmiş olan potansiyometrik, kondüktometrik ve spektrofotometrik yöntemler rutin farmasötik analizlerde; YPSK başta olmak üzere İTK ve YPSK yöntemleri ise hem rutin farmasötik analizlerde hem de biyoşdeğerlik ve biyoyararlanım çalışmalarında başarıyla kullanılabilir niteliktedir.

KAYNAKLAR

Agrawal, H., Kaul, N., Paradkar, A.R., Mahadik, K.R., Stability-indicating HPTLC determination of clopidogrel bisulphate as bulk drug and in pharmaceutical dosage form, *Talanta*, 61, 581-589 (2003).

Ascher, J.A., Cole, J.O., Colin, J.N., Feighner, J.P., Ferris, R.M., Fibiger, H.C., Golden, R.N., Martin, P., Potter, W.Z., Richelson, E., Sulser, F., Bupropion: a review of its mechanism of antidepressant activity, *J. Clin. Psychiatry*, 56 (9), 395-401 (1995).

Başçı, N.E., Temizer, A., Bozkurt, A., Isimer, A., Optimization of mobile phase in the separation of β -blockers by HPLC, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 18, 745-750 (1998).

Borges, V., Yang, E., Dunn, J., Henion, J., High-throughput liquid chromatography- tandem mass spectrometry determination of bupropion and its metabolites in human, mouse and rat plasma using a monolithic column, *J. Chromatogr. B*, 804, 277-287 (2004).

Bökesoy, T.A., Çakıcı, İ., Melli, M., *Farmakoloji Ders Kitabı*, Gazi Kitabevi Tic.Ltd.Şti., Ankara, 228-315, 2000.

Ciolino, L.A., Turner, J.A., McCauley, H.A., Smallwood, A.W., Yi, T.Y., Optimization study for the reversed-phase ion-pair liquid chromatographic determination of nicotine in commercial tobacco products, *J. Chromatogr. A*, 852, 451-463 (1999).

Cooper, T.B., Suckow, R.F., Glassman, A., Determination of bupropion and its major basic metabolites in plasma by liquid chromatography with dual-wavelength ultraviolet detection, *J. Pharm. Sci.*, 73 (8), 1104-1107 (1984).

Dejaegher, B., Vander Heyden, Y., Ruggedness and robustness testing, *J. Chromatogr. A*, 1158, 138-157 (2007).

Gazzara, R.A., Andersen, S.L., The effects of bupropion in vivo in the neostriatum of 5-day-old and adult rats, *Dev. Brain Res.*, 100, 139-142 (1997).

George, T.P., O'Malley, S.S., Current pharmacological treatments for nicotine dependence, Trends Pharmacol. Sci., 25 (1), 42-48 (2004).

Hsyu, P.H., Singh, A., Giargiari, T.D., Dunn, J.A., Ascher, J.A., Johnston, J.A., Pharmacokinetics of bupropion and its metabolites in cigarette smokers versus nonsmokers, J. Clin. Pharmacol., 37, 737-743 (1997).

http-1 Zyban Drug Description, www.rxlist.com/cgi/generic3/bupropion (21.07.2008).

http-2 Temel Mikrobiyolojik Analizler, <http://www.mikrobiyoloji.org/> (25.07.2008).

http-3 Liquid Reagents <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/Product> (25.07.2008).

ICH Steering Committee, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2(R1). Harmonized Tripartite Guideline (2005).

Johnston, J.A., Ascher, J., Leadbetter, R., Schmith, V.D., Patel, D.K., Durcan, M., Bentley, B., Pharmacokinetic optimisation of sustained-release bupropion for smoking cessation, Drugs, 62 (2), 11-24 (2002).

Kaul, N., Agrawal, H., Paradkar, A.R., Mahadik, K.R., Stability indicating high-performance thin-layer chromatographic determination of nelfinavir mesylate as bulk drug and in pharmaceutical dosage form, Anal. Chim. Acta, 502, 31-38 (2004).

Kayaalp, S.O., Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd.Şti., Ankara, 1130-1220, 2000.

Kusaka, A., Kitazumi, K., Nakayama, K., Effects of bupropion on extracellular dopamine concentrations in rat medial prefrontal cortex and nucleus accumbens studied by in vivo microdialysis, Eur. Neuropsychopharmacol., 6, 244 (2006).

Laizure, S.C., DeVane, C.L., Stability of bupropion and its major metabolites in human plasma, Ther. Drug Monit., 7 (4), 447-450 (1985).

Laizure, S.C., Devane, C.L., Stewart, J.T., Dommissie, C.S., Lai, A.A., Pharmacokinetics of bupropion and its major basic metabolites in normal subjects after a single dose, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 38, 586-589 (1985).

Lindsay, S., *High Performance Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons Ltd., Londra, 118-124, 1992.

Loboz, K.K., Gross, A.S., Ray, J., McLachlan, A.J., HPLC assay for bupropion and its major metabolites in human plasma, *J. Chromatogr. B*, 823 (2), 115-121 (2005).

Motwani, S.K., Khar, R.K., Ahmad, F.J., Chopra, S., Kohli, K., Talegaonkar, S., Iqbal, Z., Stability indicating high-performance thin-layer chromatographic determination of gatifloxacin as bulk drug and from polymeric nanoparticles, *Anal. Chim. Acta*, 576, 253-260 (2006).

Munro, J.S., Walker, T.A., Bupropion hydrochloride: the development of a chiral separation using an ovomucoid column, *J. Chromatogr. A*, 913, 275-282 (2001).

Shabir, G.A., Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization, *J. Chromatogr. A*, 987, 57-66 (2003).

Shah, V.P., Midha K.K., Findlay J.W.A., Hill H.M., Hulse J.D., McGilveray I.J., Mckay G., Miller K.J., Patnaik R.N., Powell M.L., Tonelli A., Viswanathan C.T., Yacobi, A., Bioanalytical Method Validation-A Revisit with a Decade of Progress, *Pharm. Res.* 17, 1551-1557 (2000).

Stewart, J.J., Berkel, H.J., Parish, R.C., Simar, M.R., Syed, A., Bocchini, J.A., Wilson, J.T., Manno, J.E., Single-dose pharmacokinetics of bupropion in adolescents: effects of smoking status and gender, *J. Clin. Pharmacol.*, 41, 770-778 (2001).

Suckow, R.F., Smith, T.M., Perumal, A.S., Cooper, T.B., Pharmacokinetics of bupropion and metabolites in plasma and brain of rats, mice and guinea pigs, *Drug Metab. Dispos.*, 14 (6), 692-697 (1986).

Suckow, R.F., Zhang, M.F., Cooper, T.B., Enantiomeric determination of the phenylmorpholinol metabolite of bupropion in human plasma using coupled achiral-chiral liquid chromatography, *Biomed. Chromatogr.*, 11, 174-179 (1997).

Tatar, S., Sağlık, S., Comparison of UV and second derivative spectrophotometric and LC methods for the determination of valsartan in pharmaceutical formulation, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 30, 371-375 (2002).

The United States Pharmacopeia XXIX, Marck Printing Co., Easton, 2006, s: 320-324.

Venkatachalam, A., Chatterjee, V.S., Stability-indicating high performance thin layer chromatography determination of Paroxetine hydrochloride in bulk drug and pharmaceutical formulations, *Anal. Chim. Acta*, 598, 312-317 (2007)

Wells, D.A., *High Throughput Bioanalytical Sample Preparation Methods and Automation Strategies*, Elsevier B.V., Amsterdam, 199-255, 2003.

Willner, P., Dopamine and depression: a review of recent evidence. I. empirical studies, *Brain Res. Rev.*, 6, 211-224 (1983).

Xi-Ming Li, S., Perry, K.W., Wong, D.T., Influence of fluoxetine on the ability of bupropion to modulate extracellular dopamine and norepinephrine concentrations in three mesocorticolimbic areas of rats, *Neuropharmacology*, 42, 181-190 (2002).

Yardımcı, C., Özaltın, N., Gürlek, A., Simultaneous determination of rosiglitazone and metformin in plasma by gradient liquid chromatography with UV detection, *Talanta*, 72, 1416-1422 (2007).

Zhang, D., Yuan, B., Qiao, M., Li, F., HPLC determination and pharmacokinetics of sustained-release bupropion tablets in dogs, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 33, 287-293 (2003).

