

**GRANİSETRONUN ÇEŞİTLİ ANALİTİK
YÖNTEMLERLE MİKTAR TAYİNİ**

Yüksek Lisans Tezi

Büşra ÖZYÜREK

ESKİŞEHİR 2018

**GRANİSETRONUN ÇEŞİTLİ ANALİTİK
YÖNTEMLERLE MİKTAR TAYİNİ**

Büşra ÖZYÜREK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Arın Gül DAL

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Ocak 2018

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1505S428 no'lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Büşra ÖZYÜREK'in "Granisetron'un Çeşitli Analitik Yöntemlerle Miktar Tayini" başlıklı tezi .../.../2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Analitik Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	:	
Üye	:	
Üye	:	

.....

Enstitü Müdürü

ÖZET

GRANİSETRONUN ÇEŞİTLİ ANALİTİK YÖNTEMLERLE MİKTAR TAYİNİ

Büşra ÖZYÜREK

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ocak 2018

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Arın Gül DAL

Granisetron hidroklorür (GRA) antiserotonerjik antiemetik bir ilaçtır ve kemoterapi sonrası emezisi önlemesi amacıyla kullanılmaktadır. Bu çalışmada GRA'nın farmasötik preparatlarından tayini için bir kapiler elektroforez (KE) yöntemi ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) yöntemi geliştirilmiştir. Yöntemlerde iç standart (IS) olarak metoprolol süksinat (MTP) kullanılmıştır. KE yönteminde deteksiyon foto diyot dizisi detektörle (DAD) 205.5 nm'de ve ayırım 75 µm iç çapa ve 40 cm efektif uzunluğa sahip kapiler ile sağlanmıştır. Optimum koşullar çalışma tamponu olarak 20 mM fosfat tamponu (pH 2,75) ve 22.5 kV potansiyelin uygulanması ile elde edilmiştir. Bu koşullar altında GRA ve IS'nin göç zamanları sırasıyla 6.71 dk ve 6.94 dk olarak gözlenmiştir. YPSK yönteminde deteksiyon flüoresans detektörle uyarma ve yayma dalga boyu sırasıyla 223 ve 340 nm olacak şekilde sağlanmıştır. Ayırım için C₆ fenil kolon (3.0×150.0 mm, 5.0 µm iç çap) ve hareketli faz olarak 30 mM asetat tamponu:metanol (7:3, h/h) (pH 4.0) sistemi 0,85 mL/dk akış hızında kullanılmıştır. Bu yöntemde GRA ve IS'nin alıkönme zamanları sırasıyla 4.57 dk ve 2.95 dk olarak gözlenmiştir. Geliştirilen yöntemlerin geçerliliği doğrusalılık, kesinlik, doğruluk, duyarlılık, kararlılık, spesifiklik ve sağlamlık parametreleri ile incelenmiştir. Yöntemlerin tayin sınırları KE için $4,30 \times 10^{-7}$ M ve YPSK için $2,04 \times 10^{-8}$ M olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen iki yöntem de GRA'nın tablet ve ampullerinden tayinine başarı ile uygulanmış ve içeriklerinin USP39'a uygun olduğu bulunmuştur. Geliştirilen yöntemler GRA'nın rutin analizleri için önerilmektedir.

Anahtar Sözcükler: Granisetron, Kapiler elektroforez, Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, Tablet, Ampul

ABSTRACT

DETERMINATION OF GRANISETRON BY VARIOUS ANALYTICAL METHODS

Büşra ÖZYÜREK

Department of Analytical Chemistry

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, January 2018

Supervisor: Assist.Prof.Dr. Arın Gül DAL

Granisetron hydrochloride (GRA) is an antiserotonergic antiemetic drug and is used to prevent emesis after chemotherapy. In this study a capillary electrophoresis (KE) and a high performance liquid chromatographic (YPSK) method were developed for the determination of GRA in pharmaceutical formulations. Metoprolol succinate (MTP) was used as an internal standard (IS) in the methods. In KE method, detection was achieved by diode array detection at 205.5 nm and separation was achieved by a capillary of 75 μm i.d. and 40 cm effective length. Optimum conditions were found as 20 mM phosphate buffer (pH 2,75) and applied voltage of 22.5 kV. Under these circumstances, the migration times for GRA and IS were 6.71 min and 6.94 min respectively. In YPSK method, detection was achieved by fluorescence detector with an excitation wavelength of 223 nm and an emission wavelength of 340 nm. For the separation a C₆ phenyl column (3.0 $\times$ 150.0 mm, 5.0 μm i.d.) and as a mobile phase 30 mM acetate buffer:methanol (7:3, v/v) (pH 4.0) system was used at a flow rate of 0,85 mL/min. In this method retention times for GRA and IS were 4.57 min 2.95 min, respectively. The validation of the developed methods were examined by linearity, precision, accuracy, sensitivity, stability, specificity and robustness parameters. The limits of quantification of the methods were $4,30 \times 10^{-7}$ M for KE and $2,04 \times 10^{-8}$ M for YPSK method. Both of the developed methods were successfully applied to GRA tablets and ampoules and the contents were found to be in the limits of USP39. The developed methods are proposed for the routine analyses of GRA.

Keywords: Granisetron, Capillary Electrophoresis, High Performance Liquid Chromatography, Tablet, Ampoule.

ÖNSÖZ

Bu çalışmada Granisetron hidroklorürün (GRA) kapiler elektroforez (KE) yöntemi ile yöntem bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda bu yöntem ile karşılaştırılması amacıyla da bir yüksek performanslı sıvı kromatografi (YPSK) yöntemi geliştirilmiştir.

Yüksek lisans tezim boyunca bana ilgiyle yardım eden ve her alanda benden yardım ve desteklerini esirgemeyen tez hocam Yrd. Doç. Dr. Arın Gül DAL'a,

Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda bulunan, benimle tüm bilgi ve birikimleri paylaşan hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma,

Hayatımın her alanında yanımda bulunan ve her koşulda bana yardım ve destek olan sevgili aileme,

Teşekkürlerimi sunarım.

.../.../2018

ETİK İLKE ve KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durum saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

.....

Büşra ÖZYÜREK

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ	3
2.1. Antiserotonerjik Antiemetik İlaçlar	3
2.2. Granisetronun Farmakolojik Özellikleri	3
2.3. Granisetronun Farmakodinamik Özellikleri	4
2.4. Granisetronun Farmakokinetik Özellikleri	4
2.4.1. Emilim	4
2.4.2. Dağılım	5
2.4.3. Metabolizma ve atılım	5
2.5. Kullanılan Yöntemler	5
2.5.1. Kapiler elektroforez	5
2.5.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi	8
2.6. Granisetronun Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	9
2.7. Granisetronun Miktar Tayinine Yönelik Yapılmış Çalışmalar ...	10
3. GEREÇLER	18
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	18
3.2. Kullanılan Cihazlar	18
4. YÖNTEMLER	19
4.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanışı	19

4.2. UV Spektrofotometri	19
4.3. Kapiler Elektforez Yöntemi	19
4.3.1. Cihazla ilgili koşullar	19
4.3.2. Çalışma tamponu	20
4.3.3. Optimizasyon çalışmaları	20
4.3.3.1. <i>Tampon derişimi</i>	21
4.3.3.2. <i>pH</i>	21
4.3.3.3. <i>Potansiyel</i>	21
4.3.4. Validasyon çalışmaları	21
4.3.4.1. <i>Doğrusallık</i>	22
4.3.4.2. <i>Kesinlik</i>	22
4.3.4.3. <i>Doğruluk</i>	22
4.3.4.4. <i>Duyarlılık</i>	22
4.3.4.5. <i>Kararlılık</i>	22
4.3.4.6. <i>Sağlamlık</i>	23
4.4. YPSK Yöntemi	23
4.4.1. Cihaz ile ilgili koşullar	23
4.4.2. Hareketli fazın hazırlanışı	23
4.4.3. Optimizasyon çalışmaları	23
4.4.3.1. <i>Dalga boyu</i>	24
4.4.3.2. <i>Hareketli fazdaki tampon derişimi</i>	24
4.4.3.3. <i>Organik çözücü oranı</i>	24
4.4.3.4. <i>pH</i>	24
4.4.3.5. <i>Akış hızı</i>	25
4.4.4. Validasyon	25
4.4.4.1. <i>Doğrusallık</i>	25
4.4.4.2. <i>Kesinlik</i>	25
4.4.4.3. <i>Doğruluk</i>	25
4.4.4.4. <i>Duyarlılık</i>	26
4.4.4.5. <i>Kararlılık</i>	26
4.4.4.6. <i>Sağlamlık</i>	26
4.5. Yöntemlerin Uygulanması	26
4.5.1. Tablet	26

4.5.2. Ampul	27
5. BULGULAR VE YORUM	28
5.1. UV Spektrofotometri	28
5.2. Kapiler Elektforez Yöntemi	30
5.2.1. Optimizasyon	30
5.2.1.1. <i>Tampon derişimi</i>	30
5.2.1.2. <i>Çözücü ve dalga boyu</i>	32
5.2.1.3. <i>pH</i>	34
5.2.1.4. <i>Uygulanan potansiyel</i>	34
5.2.1.5. <i>İç standart</i>	36
5.2.1.6. <i>Organik çözücü</i>	41
5.2.2. Validasyon	42
5.2.2.1. <i>Doğrusallık</i>	42
5.2.2.2. <i>Kesinlik</i>	44
5.2.2.3. <i>Duyarlılık</i>	44
5.2.2.4. <i>Doğruluk</i>	44
5.2.2.5. <i>Spesifiklik</i>	46
5.2.2.6. <i>Kararlılık</i>	47
5.2.2.7. <i>Sağlamlık</i>	48
5.2.2.8. <i>Sistem uygunluk testleri</i>	48
5.3. YPSK Yöntemi	49
5.3.1. Optimizasyon	49
5.3.1.1. <i>Sabit faz</i>	49
5.3.1.2. <i>Dalga boyu</i>	51
5.3.1.3. <i>Hareketli fazdaki tampon derişimi</i>	52
5.3.1.4. <i>Organik çözücü yüzdesi</i>	53
5.3.1.5. <i>pH</i>	55
5.3.1.6. <i>Akış hızı</i>	56
5.3.2. Validasyon	58

5.3.2.1. <i>Doğrusallık</i>	58
5.3.2.2. <i>Kesinlik</i>	60
5.3.2.3. <i>Duyarlılık</i>	60
5.3.2.4. <i>Doğruluk</i>	60
5.3.2.5. <i>Spesifiklik</i>	62
5.3.2.6. <i>Kararlılık</i>	64
5.3.2.7. <i>Sağlamlık</i>	64
5.3.2.8. <i>Sistem uygunluk testleri</i>	65
5.4. Yöntemlerin Uygulanması	65
5.4.1. Granisetronun tabletlerden miktar tayini	65
5.4.2. Granisetronun ampullerden miktar tayini	69
5.5. Yöntemlerin Karşılaştırılması	73
6. SONUÇ, TARTIŞMA ve ÖNERİLER	75
KAYNAKÇA	78
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Kapiler elektroforez yönteminde elektroozmotik akış şeması	6
Şekil 2.2. Kapiler elektroforez sisteminin şematik gösterimi	7
Şekil 2.3. Yüksek performanslı sıvı kromatografi sisteminin şematik gösterimi	9
Şekil 2.4. Granisetron hidroklorürün açık kimyasal formülü	9
Şekil 5.1. Suda çözölmüş GRA'nın 200-400 nm arasında elde edilmiş spektrumu	28
Şekil 5.2. Metanolde çözölmüş GRA'nın 200-400 nm arasında elde edilmiş spektrumu	29
Şekil 5.3. Suda çözölmüş GRA'nın 205.5 ve 207.5 nm'de elde edilmiş elektroferogramları	31
Şekil 5.4. Metanolde çözölmüş GRA'nın 205.5 ve 207.5 nm'de elde edilmiş elektroferogramları	31
Şekil 5.5. Çalışma tamponu derişimi incelemesi	32
Şekil 5.6. 205.5 nm'de suda ve metanolde çözölmüş GRA'ya ait elektroferogramlar	33
Şekil 5.7. 207.5 nm'de suda ve metanolde çözölmüş GRA'ya ait elektroferogramlar	33
Şekil 5.8. Çalışma tamponu pH'nın incelenmesi	34
Şekil 5.9. Uygulanan potansiyelin incelenmesi	35
Şekil 5.10. Optimum koşullar altında analizi gerçekleşen GRA'ya ait elektroferogram.....	35
Şekil 5.11. Optimum koşullar altında analizi gerçekleşen MTP'ye ait elektroferogram	36
Şekil 5.12. Optimum koşullar altında GRA ve MTP'ye ait elektroferogram	37
Şekil 5.13. 15 mM fosfat tamponu (pH 2,75) ve 27.5 kV potansiyel altında GRA ve MTP'ye ait elektroferogram	37
Şekil 5. 14. 15 mM fosfat tamponu (pH 2,75 ve 25.0 kV potansiyel altında GRA ve MTP'ye ait elektroferogram	38

Şekil 5.15. 15 mM fosfat tamponu (pH 2,75) ve 22.5 kV potansiyel altında GRA ve MTP'ye ait elektroferogram	39
Şekil 5.16. 15 mM fosfat tamponu (pH 2,75) ve 20.0 kV potansiyel altında GRA ve MTP'ye ait elektroferogram	39
Şekil 5.17. 20 mM fosfat tamponu (pH 2,75) ve 20.0 kV potansiyel altında GRA ve MTP'ye ait elektroferogram	40
Şekil 5.18. 20 mM fosfat tamponu (pH 2,75) ve 22.5 kV potansiyel altında GRA ve MTP'ye ait elektroferogram	41
Şekil 5.19. %10 metanol içeren 20 mM fosfat tamponu (pH 2,75) ve 22.5 kV potansiyel altında GRA ve MTP'ye ait elektroferogram	42
Şekil 5.20. KE yöntemi ile GRA'nın doğrusal olduğu aralığın grafiksel gösterimi	43
Şekil 5.21. Tablet matriks ortamına ait elektroferogram	46
Şekil 5.22. Ampul matriks ortamına ait elektroferogram	47
Şekil 5.23. C18 kolon ve asetat tamponu ile GRA'nın analizine ait kromatogram	50
Şekil 5.24. C6 fenil bağlı silika kolon ile GRA ve IS analizine ait kromatogram	51
Şekil 5.25. GRA'nın optimum dalga boyundaki analizine ait kromatogram ...	52
Şekil 5.26. Hareketli fazdaki tampon derişiminin incelenmesi	53
Şekil 5.27. %20 metanol içeren hareketli faz ile GRA ve MTP'ye ait kromatogram	54
Şekil 5.28. %30 metanol içeren hareketli faz ile GRA ve MTP'ye ait kromatogram	54
Şekil 5.29. %40 metanol içeren hareketli faz ile GRA ve MTP'ye ait kromatogram	55
Şekil 5.30. Hareketli faz pH'nın incelenmesi	56
Şekil 5.31. Akış hızının incelenmesi	57
Şekil 5.32. Optimum koşullar altında analizi gerçekleştirilen GRA ve MTP'ye ait kromatogram	58
Şekil 5.33. YPSK yöntemi ile GRA'nın doğrusal olduğu aralığın grafiksel gösterimi	59
Şekil 5.34. Tablet matriks ortamına ait kromatogram	63

Şekil 5.35. Ampul matriks ortamına ait kromatogram	63
Şekil 5.36. Tablet analizine ait elektroferogram	66
Şekil 5.37. Matriks, tablet matriksine eklenmiş GRA ve IS ve tablet analizine ait elektroferogramlar	66
Şekil 5.38. Tablet analizine ait kromatogram	68
Şekil 5.39. Tablet matriksine eklenmiş GRA ve IS ve tablet analizine ait kromatogramlar	68
Şekil 5.40. Ampul analizine ait elektroferogram	70
Şekil 5.41. Matriks, ampul matriksine eklenmiş GRA ve IS ve ampul analizine ait elektroferogramlar	70
Şekil 5.42. Ampul analizine ait kromatogram	72
Şekil 5.43. Ampul matriksine eklenmiş GRA ve IS ve ampul analizine ait kromatogramlar	72

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 5.1. GRA'nın UV spektrumunda gözlenen veriler	29
Çizelge 5.2. GRA'nın kapiler elektroforez yöntemi ile kalibrasyon verileri ...	43
Çizelge 5.3. GRA'nın kapiler elektroforez yöntemi ile kesinlik verileri	44
Çizelge 5.4. GRA'nın kapiler elektroforez yöntemi ile doğruluk verileri	44
Çizelge 5.5. Tablet matriks ortamına eklenen GRA'nın kapiler elektroforez yöntemi ile doğruluk verileri	45
Çizelge 5.6. Tablet matriks ortamına eklenen GRA'nın kapiler elektroforez yöntemi ile doğruluk verileri	46
Çizelge 5.7. GRA'nın kapiler elektroforez yöntemi ile kararlılık verileri	47
Çizelge 5.8. GRA'nın kapiler elektroforez yöntemi ile sağlamlık verileri	48
Çizelge 5.9. GRA'nın kapiler elektroforez yöntemi ile sistem uygunluk testleri	49
Çizelge 5.10. GRA'nın çeşitli dalga boylarında analizi verileri	51
Çizelge 5.11. GRA'nın YPSK yöntemi ile kalibrasyon verileri	59
Çizelge 5.12. GRA'nın YPSK yöntemi ile kesinlik verileri	60
Çizelge 5.13. GRA'nın YPSK yöntemi ile doğruluk verileri	61
Çizelge 5.14. Tablet matriks ortamına eklenen GRA'nın YPSK yöntemi ile doğruluk verileri	62
Çizelge 5.15. Tablet matriks ortamına eklenen GRA'nın YPSK yöntemi ile doğruluk verileri	62
Çizelge 5.16. GRA'nın YPSK yöntemi ile kararlılık verileri	64
Çizelge 5.17. GRA'nın YPSK yöntemi ile sağlamlık verileri	64
Çizelge 5.18. GRA'nın YPSK yöntemi ile sistem uygunluk testleri	65
Çizelge 5.19. GRA tabletlerin kapiler elektroforez yöntemi ile miktar tayini verilerinin istatistiksel değerlendirilmesi	67
Çizelge 5.20. GRA tabletlerin YPSK yöntemi ile miktar tayini verilerinin istatistiksel değerlendirilmesi	69

Çizelge 5.21. GRA ampullerinin kapiler elektroforez yöntemi ile miktar tayini verilerinin istatistiksel değerlendirilmesi.....	71
Çizelge 5.22. GRA ampullerinin YPSK yöntemi ile miktar tayini verilerinin istatistiksel değerlendirilmesi	73
Çizelge 5.23. Yöntemlerin karşılaştırılması	74

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	: Seçicilik faktörü
5-HT ₃	: 5-hidroksitriptamin
a	: Eğim
As	: Asimetri faktörü
b	: Kesim
BH	: Bağlı hata
BSS	: Bağlı standart sapma
CH ₃ COOH	: Asetik asit
CH ₃ COONa	: Sodyum asetat
DAD	: Foto diyot dizisi detektörü
dk	: Dakika
GA	: Güven aralığı
GRA	: Granisetron hidroklorür
h	: Hacim
HCl	: Hidroklorik asit
HClO ₄	: Perklorik asit
H ₃ PO ₄	: Fosforik asit
HPTLC	: Yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi
ICH	: Uluslararası uyum konferansı
IS	: İç standart
k'	: Kapasite faktörü
KE	: Kapiler elektroforez
KH ₂ PO ₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
KMNO ₄	: Potasyum permanganat
LC-MS	: Kütle spektrometresine bağlı sıvı kromatografisi
LC-MS/MS	: Tandem (dizili) kütle spektrometresine bağlı sıvı kromatografisi
MTP	: Metoprolol süksinat
n	: Deney sayısı
N	: Tabaka sayısı
NaH ₂ PO ₄	: Sodyum dihidrojen fosfat
NaOH	: Sodyum hidroksit
Ort	: Ortalama

PNO	: Pik normalizasyonu oranı
r	: Korelasyon katsayısı
rpm	: Döngü/dakika
Rs	: Ayrım gücü
SD	: Serbestlik derecesi
ss	: Standart sapma
SSS	: Santral sinir sistemi
USP	: Amerikan Farmakopesi
UV	: Mor ötesi
YPSK	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

1. GİRİŞ

GRA antiserotonerjik antiemetik bir ilaçtır. Bu maddenin vagal aferent nöronlarda ve santral sinir sisteminin (SSS) ilgili bölgelerinde bulunan 5-hidroksitriptamin (5-HT₃) reseptörlerini aktive ettiğine ve mekanizmanın bu şekilde işlediğine inanılmaktadır (http-1). Kanseri ilaçları ve radyoterapinin yaptığı emezisin önlenmesi ve tedavisi amacıyla kullanılmaktadır (Kayaalp, 2009).

GRA'nın miktar tayini için yapılan çalışmalar çoğunlukla sıvı kromatografisine bağlı morötesi (UV) / DAD (Capacio vd., 1993; Chen vd., 2017; Heda vd., 2011; Hewala vd., 2010; Hewala vd., 2011; Sourı vd., 2011; Rao vd., 2012), flüoresans (Allen vd., 1994; Boppana, 1995; Huang vd., 1998; Kudoh vd., 1994; Maksic vd., 2016; Pinguet vd., 1996; Wada vd., 1998) ve kütle spektrometresi (Boppana vd., 1996; Jiang vd. 2006; Nirogi vd., 2006; Woo, 2006; Xiang vd., 2007; Zhao vd., 2015; Zhou vd., 2014) detektörleri ile yapılmıştır. Bu çalışmalar dışında birince derece türev spektrofotometrik yöntemle (Hewala vd., 2013), katodik adsorptif sıyırma voltametrısı yöntemi ile (Jain ve Sharma, 2012) ve yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (HPTLC) yöntemi ile (Prabu vd., 2010) de analizler gerçekleştirilmiştir.

KE yöntemi iletken sıvı bir ortamdaki elektriksel olarak yüklü parçacık ya da moleküllerin, elektrik alan etkisiyle bir kapiler içerisinde hareket etmesine dayanan bir yöntemdir. Elektrik alanı altında elektroozmoza bağlı olarak tampon ve nötr moleküller de kapiler içerisinde hareket etmektedirler. KE'nin diğer ayırım yöntemlerine göre yüksek verimlilikte olması, çok küçük hacimlerde örneklerle çalışılabilmesi, reaktif sarfiyatının az olması ve hızlı ayırım yapabilmesi gibi üstünlükleri bulunmaktadır (Baker, 1995). GRA'nın miktar tayinine yönelik çalışmalar incelendiğinde KE yöntemi ile herhangi bir analizine rastlanmamıştır.

YPSK yöntemi, kolonun küçük dolgu maddeleriyle doldurulup yüksek basınç altında hareketli faz geçirilmesi ile bileşenlerin ayırımının yapıldığı bir kromatografi yöntemidir (Gündüz, 2002). YPSK en yaygın kullanılan analitik ayırma tekniğidir. Duyarlılığı, kantitatif tayinlere kolaylıkla uygulanabilir olması, uçucu olmayan veya sıcaklıkla bozunabilen bileşiklerin uygun bir şekilde ayrılması gibi üstünlükleri ile en yaygın kullanılan yöntemdir (Hamilton ve Sewel, 1982).

Bu çalışmada KE yöntemi kullanarak GRA içeren tablet ve ampul farmasötik preparatlarında GRA içerik tekdüzeliğinin tayin edilmesi için hızlı, kolay ve seçici bir yöntem geliştirilmesi ve geliştirilen yöntemin geçerliliğinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

Aynı zamanda bir YPSK yöntemi geliştirip, bunu GRA içeren tablet ve ampul preparatlarına uygulayarak iki yöntem arasında karşılaştırma yapılması hedeflenmiştir. Geliştirilen bu iki yöntem için de geçerliliklerinin gösterilmesi amacıyla doğrusallık, kesinlik, doğruluk, duyarlılık, kararlılık, spesifiklik ve sağlamlık parametreleri incelenmiştir. Her iki yöntemin de farmasötik preparatlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar USP39’da belirtilen içerik tekdüzeliği sınırları ile karşılaştırılmıştır. Son olarak geliştirilen yöntemler, doğruluk ve kesinlikleri açısından istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Antiserotonerjik Antiemetik İlaçlar

Bulantı ve kusma, medüler retiküler oluşumda bulunan ve başlıca üç alandan gelen uyarıların koordinasyonundan sorumlu kusma merkezi tarafından kontrol edilmektedir. Bunlar:

- i. Vagal, vestibülo-serebellar ve spinal-viseral afferentlerden gelen periferik uyarılar
- ii. SSS'nin yüksek merkezlerinden gelen uyarılar
- iii. Area postremadaki kemopreseptör tetikleme bölgesi.

Serotonin ya da diğer adıyla 5-HT₃'e ait reseptörler, area postrema, nükleus traktüs solitarius ve daha yüksek yoğunluklarda olmak üzere vagal aferent liflerin başlıca sonlanma bölgesi olan beyin kökünde rastlanmıştır. Sitotoksik ilaçlar ve radyoterapinin bağırsak mukozasındaki hasarlı enterokromafin hücrelerinden serotonin salınımına yol açarak bulantı ve kusma yaptığına, bu maddenin de vagal aferent nöronlarda ve SSS'nin ilgili bölgelerinde bulunan 5-HT₃ reseptörlerini aktive ettiğine ve mekanizmanın bu şekilde işlediğine inanılmaktadır (http-1).

Serotonin 5-HT₃ reseptör blokörleri dört çeşittir. Bunlar viserlerde vagal aferent uçlarındaki periferik ve area postrema nöron veya sinir uçlarındaki santral 5-HT₃ reseptörlerini bloke ederek etki gösterirler. Kanser ilaçları ve radyoterapinin yaptığı emezisin önlenmesi ve tedavisi amacıyla kullanılırlar. Taşıt tutmasında etkili değildir (Kayaalp, 2009).

2.2. Granisetronun Farmakolojik Özellikleri

Kanserli hastalarda emezisin olumsuz etkisi nedeniyle tedavi uygulanamayabilir ve bu sebeple de tedavi fırsatının kaçırılmasına yol açabilmektedir. Bu nedenle kanser tedavisinin uygulanabilmesi için emezisin önlenmesi önem kazanmaktadır. Kanser ilaçlarının yaptığı üç tip emezis bulunmaktadır:

Akut emezis: İlacın ilk dozunun uygulamasından sonra bazı ilaçlarda 1-2 saat, bazılarında daha geç, fakat 24 saat içinde ortaya çıkmaktadır.

Gecikmiş emezis: İlacın uygulanmasından en az 24 saat, genellikle 2. ve 3. günlerde en geç 5. günde ortaya çıkan bulantı kusma halidir.

Beklentisel emezis: Genellikle ilaçlar birkaç kür uygulandıktan sonra, verilmiş olan ilaçların yaptığı emetojenik etkilerine ruhsal olarak koşullanma sonucu ortaya çıkan durumdur.

Antiserotonerjik antiemetik ilaçlar temelde akut emezise etki ederler. Gecikmiş emezise etkileri azdır. Beklentisel emezisi koşullandırmayı ortadan kaldırarak ikincil olarak önleyebilirler. Genelde erkeklerdeki emezise kadınlardakine göre daha etkilidirler.

5-HT₃ reseptör blokörleri kanser ilaçları ve radyoterapinin yaptığı emezis dışında postoperatif emezis hariç etkili değildirler ya da diğer emetik tedavi yöntemleri daha uygun olduğundan dolayı gereksizlerdir. Bu nedenler düşük maliyetli antiemetiklerden cevap alınamadığı takdirde kullanılırlar.

GRA kusma başladıktan sonra kullanıldığında daha etkili bir ilaçtır. En sık görülen yan etkisi konstipasyon ve baş ağrısıdır (Kayaalp, 2009).

2.3. Granisetronun Farmakodinamik Özellikleri

GRA, hem periferik sinir sistemini hem de SSS'deki 5-HT₃ reseptörlerini güçlü ve selektif bir şekilde antagonize eder. GRA'nın 5-HT₃ reseptörlerine olan afinitesi diğer serotonin reseptörlerine olan afinitesine göre 4.000-40.000 kat daha yüksektir. Abdominal viseral afferentler başlıca bulantı detektörleridir. Diğer yandan traktüs solitaryüs nükleusu, çoğu kökeninin bağırsaktan alan vagal afferentlerin üzerinde bulunan 5-HT₃ reseptörleri bakımından zengindir. Medulla oblongatada yer alan area postrema da 5-HT₃ reseptörlerinin yoğunluğu daha düşüktür.

Antineoplastik ilaçlar ve radyoterapiye bağlı bulantı ve kusmanın önlenmesinde GRA'nın, serotoninin etkilerini antagonize ederek yarar sağladığı ve bunu ince bağırsağın üst bölümündeki abdominal vagal afferentlerde bulunan 5-HT₃ reseptörleri düzeyinde gerçekleştiği düşünülmektedir (http-2).

2.4. Granisetronun Farmakokinetik Özellikleri

2.4.1. Emilim

GRA oral ya da parenteral yolla uygulanabilir. İntravenöz yoldan verildiğinde kanser hastalarında terminal yarı ömrü 9-12 saat ve sağlıklı gönüllülerde 5-7.7 saattir.

Oral yoldan verildiğinde ise sağlıklı gönüllülerdeki yarı ömrü 6.23 saattir, kanser hastalarında oral yoldan verildiğinde yarı ömrü ile ilgili veri bulunmamaktadır (http-2).

2.4.2. Dağılım

Dağılım hacmi ve total klirensi vücut ağırlığına göre ayarlandığında, farmakokinetiği çocuk ve yetişkin kanser hastalarında benzerlik gösterir. Plazma ve eritrositler arasında serbestçe dağılıma uğrar. Besinlerle birlikte verilmesi eğrinin altında kalan alan değerini yaklaşık olarak %5 kadar düşürür. Sağlıklı gönüllülerde aç karnına alındığında maksimum konsantrasyonunun %30 kadar yükseldiği gösterilmiştir. GRA'nın plasentayı aşip aşmadığı veya anne sütüne geçip geçmediği bilinmemektedir fakat hayvanlarda yapılan çalışmalar teratojenik etkilerinin olmadığını ortaya koymuştur. GRA'nın proteinlere yaklaşık %65 oranında bağlandığı bildirilmiştir (http-2).

2.4.3. Metabolizma ve atılım

GRA karaciğerde N-demetilasyon ve oksidasyona uğrar. Yapılan *in vitro* araştırmalar GRA'nın primer metabolizma yolağının ketokonazol tarafından inhibe edildiğini ortaya koymuştur. Bu nedenle sitokrom P-450 sistem yolağı ile metabolize olmaktadır. Hayvanlarda yapılan incelemelerde metabolitlerinin farmakolojik aktivite göstereceği ortaya konmuştur.

GRA'nın verilen bir dozunun yaklaşık %12'si idrar yoluyla değişmeden atılır. Metabolitlerinin de %49'u idrar, %34'ü dışkı ile atılmaktadır. Renal ya da hepatik hastalığı olan hastalarda doz ayarlaması gerekmez (http-2).

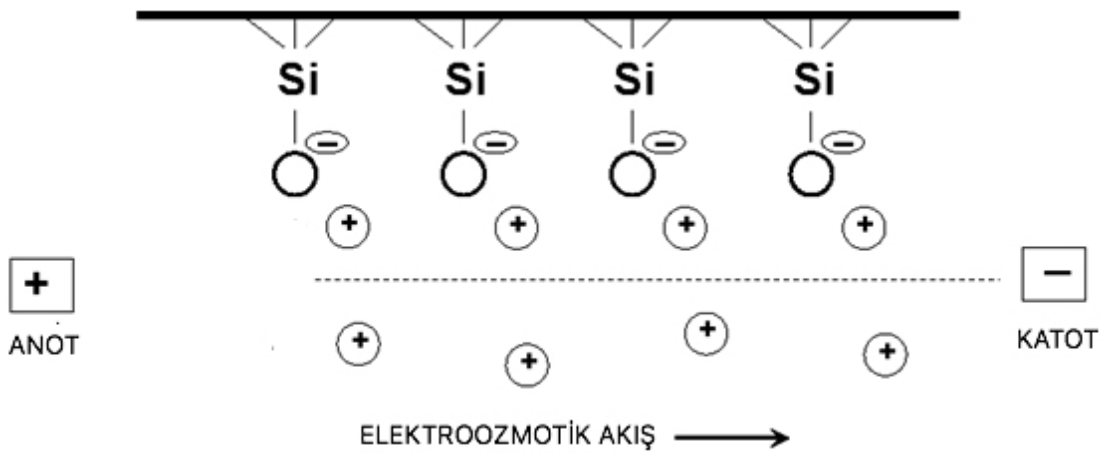
2.5. Kullanılan Yöntemler

2.5.1. Kapiler elektroforez

İletken sıvı bir ortamdaki elektriksel olarak yüklü parçacık ya da moleküllerin elektrik alan etkisiyle hareket etmesine elektroforez denir. Elektroforezde bir tüpün uçları elektrolit veya çalışma tamponu adı verilen bir sulu tampona daldırılmış olarak bulunmaktadır. Çalışma tamponu ile dolu kaplar güç kaynağına bağlı halde bulunur. Farklı boyut ve yüklerdeki moleküller farklı hızlarda yük/kütle oranına göre göç ederler.

Elektrik alanı altında elektroozmoza bağlı olarak tampon ve nötr moleküller de tüp içerisinde hareket etmektedirler.

Elektroozmotik akış ise, madde çözeltisinin yanında çalışma tamponunun da elektrik alanının etkisi altında kapiler içinde hareket etmesidir. Elektroozmotik akışın yönü negatif yüklü katoda doğrudur. Böylece de giriş vialinden, kapilere, detektöre ve çıkış vialine doğru akış olur. Katyonlar elektroozmotik akıştan daha hızlı hareket ederek, nötr maddeler elektroozmotik akış ile aynı hızda ve anyonlar ise elektroozmotik akıştan daha hızlı hareket ederler. Elektroozmotik akış Şekil 2.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Kapiler elektroforez yönteminde elektroozmotik akış şeması (<http-3>)

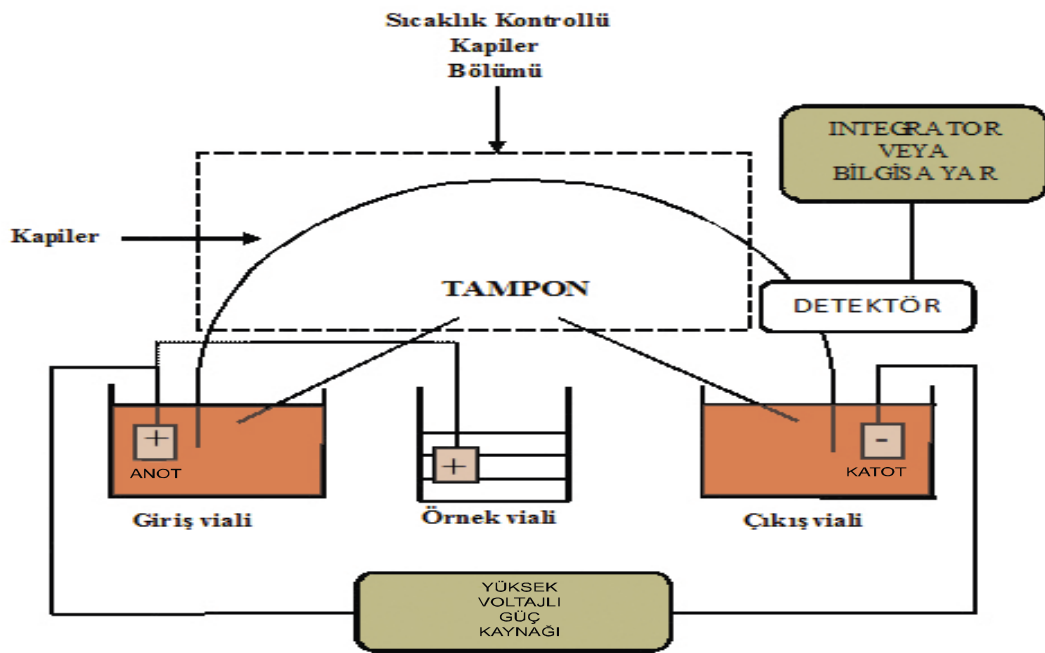
Pozitif yüklü katyonlar katoda yani negatif yüklü elektrota, negatif yüklü anyonlar ise anoda yani pozitif yüklü elektroda göç ederler. Göç hızları iyonların yük/kütle oranına bağlıdır. Aynı yüke sahip iyonlardan küçük bir iyon, kendisinden büyük bir iyonla göre daha hızlı göç eder. Nötr moleküller elektrik alanından etkilenmezler.

Ayrılan moleküller kapiler sonuna yerleştirilen bir detektör yardımı ile analiz edilirler. Detektör çıktısı, zamana karşı detektör yanıtının bir grafiğidir ve buna elektroferogram adı verilir.

Elektroforezde bileşiklerin iletken ortam içinde zonlar halinde hareket ettiği düşünülür. Fakat kapilere bir bileşik girdiğinde bir miktar dağılma ve dolayısıyla zonların yayılması söz konusu olur. Bu dağılma göç yönüne paralel, göç yönüne dik veya termal dağılma şeklinde olabilir. Elektrik alan uygulanması, iletken çözeltide Joule ısınmasına neden olur. Kapilerin daha sıcak olan merkezindeki moleküller daha soğuk olan kapiler duvarına yakın moleküllere göre daha hızlı göç ederler. Göç yönüne paralel

ve göç yönüne dik dağılma, zon yayılması üzerine az etkilidir. Fakat termal dağılma, zon yayılmasında büyük paya sahiptir. Termal dağılmayı azaltmak için tampona bir jel gibi stabilite edici ajan eklenmesi, kapilerin çevrilerek kullanılması ya da kapilerin çapının azaltılması uygulanmalıdır.

KE'nin ana bileşenleri örnek, giriş ve çıkış vialleri, kapiler, detektör, yüksel voltajlı güç kaynağı ile bilgisayar gibi bir bilgi işleme cihazıdır. KE sisteminin ana bileşenleri Şekil 2.2.'de sunulmuştur.



Şekil 2.2. Kapiler elektroforez sisteminin şematik gösterimi (Baker, 1995)

Elektroforez, giriş vial, kapiler ve çıkış vialinin bir elektrolit ile doldurulmasıyla gerçekleşmektedir. Genellikle sulu bir tampon çözeltisi elektrolit olarak kullanılır. Kapiler girişi örnek vialinin içine yerleştirilir, örnek koyulur ve daha sonra kapiler girişi tekrar giriş vialine alınır ve giriş ve çıkış vial arasında elektrik alanı uygulanır. Çözünen maddeler, kapiler boyunca göç ederler ve detektörler tarafından tespit edilirler. Detektör çıkışları bilgisayara gönderilir ve çıkan veriler bir elektroferogram olarak görüntülenir.

Çözünen maddeleri kapiler içinde farklı hızlarda hareket ettikleri için detektör önünde farklı zamanlarda geçerler. Elektroferogramda, ayrılmış bileşikler, pikler halinde farklı göç zamanlarında görünürler.

KE'nin diğer ayırım yöntemlerine göre yüksek verimlilikte olması, çok küçük hacimlerde örneklerle çalışılabilmesi, reaktif sarfiyatının az olması ve hızlı ayırım yapabilmesi gibi üstünlükleri bulunmaktadır (Baker, 1995).

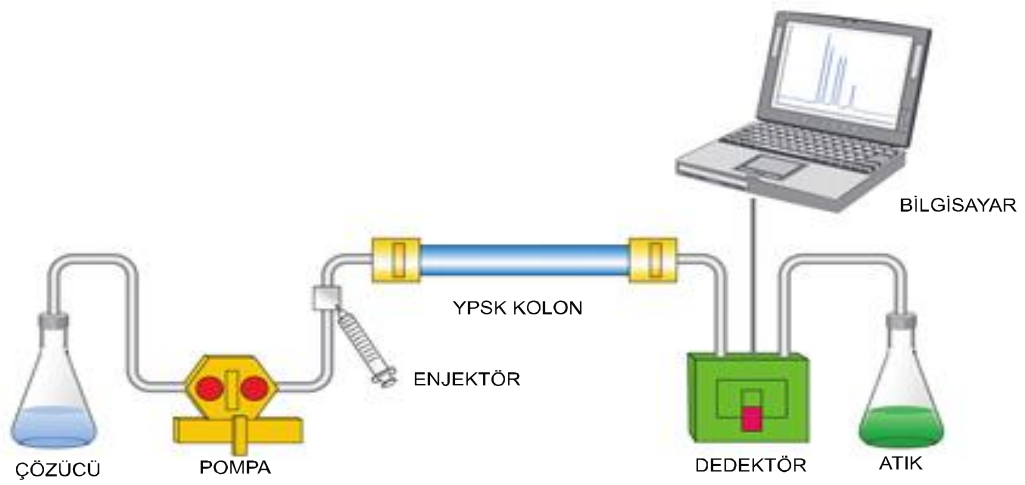
2.5.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

Klasik sıvı kromatografisinde kolonun üst kısmından numune ve hareketli faz ilave edilir. Hareketli faz kolondan aşağıya inerken numunedeki bileşenlerin bantlar halinde ayrılmaları sağlanır. Bantların iyi ayrılmamaları durumunda daha uzun kolonlar kullanılmaktadır. Bu ayrılma ise çok uzun bir sürede gerçekleşmektedir. Alternatif olarak da kolondaki dolgu maddesi küçültülebilmektedir. Bu işlem uygulandığı zaman da ayırım çok uzun bir sürede gerçekleşmektedir. Bu süreyi kısaltmak için kolon uygun büyüklükteki dolgu maddeleriyle doldurulmaktadır ve kolonun üstünde yüksek basınç uygulanmaktadır. Bunun sonucunda da kısa sürede gerçekleşen ayırımlar gözlemlenmektedir. Böylece, kolonu küçük dolgu maddeleriyle doldurup yüksek basınç altında yapılan kromatografi türlerine YPSK denilmektedir. Buna göre, YPSK'ye eski kromatografi türlerinin iyileştirilmiş ve hızlandırılmış şekli denilebilmektedir (Gündüz, 2002).

YPSK en yaygın kullanılan analitik ayırma tekniğidir. Duyarlılığı, kantitatif tayinlere kolaylıkla uygulanabilir olması, uçucu olmayan veya sıcaklıkla bozunabilen bileşiklerin uygun bir şekilde ayrılmasından dolayı en yaygın kullanılan yöntemdir (Hamilton,1982).

YPSK cihazının ana bileşenleri hareketli faz kapları, pompa, enjektör, kolon, detektör ve bilgisayar gibi bir kayıt cihazıdır. Şekil 2.3.'te cihazın şematik gösterimi verilmiştir.

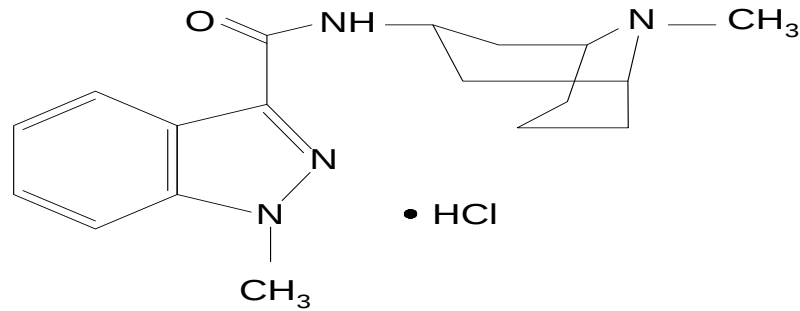
YPSK yöntemi nükleik asitler, terpenoitler, pestisitler, antibiyotikler, steroidler, proteinler, amino asitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, metalorganik bileşikler ve bazı inorganik maddelere uygulanabilmektedir (Gündüz, 2002).



Şekil 2.3. Yüksek performanslı sıvı kromatografi sisteminin şematik gösterimi (http-4)

2.6. Granisetronun Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

GRA suda çözünmeyen beyaz veya kirli beyaz renklerinde bir katıdır (http-1). Kimyasal olarak molekül ağırlığı (serbest baz) 312,4 g/mol'dür. Kimyasal adı endo-N-(9-metil-9-azabisiklo [3.3.1] non-3-il)-metil-1H-indazol-3-karboksamit hidroklorid'dir. Kapalı kimyasal formülü $C_{18}H_{24}N_4O \cdot HCl$ 'dir ve açık kimyasal formülü Şekil 2.4.'te verilmiştir (http-2).



Şekil 2.4. Granisetron hidroklorürün açık kimyasal formülü

2.7. Granisetronun Miktar Tayinine Yönelik Yapılmış Çalışmalar

Hewala, Bedair ve Shousha, (2013, s. 234) GRA, GRA'nın hidrolitik bozunma ürünleri ve parenteral dozaj formlarında koruyucu olarak bulunan benzil alkolün miktar tayinlerini GRA tabletleri ve ampullerinde birince derece türev spektrofotometrik yöntemle gerçekleştirmişlerdir. Çalışma 290 nm'de yürütülmüştür. Çalışmada GRA metanolde çözülmüş ve uygun derişimlere metanol:0,1 M HCl (20:80) karışımı ile seyreltilmiştir. Geliştirilen yöntemin spesifikliği, doğrusallığı, seçiciliği, doğruluğu, kesinliği ve sağlamlığı gösterilmiştir. Yöntemde GRA için gözlenebilme sınırı 0,1356 µg/mL olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntemde elde edilen sonuçlar t ve F testleri ile bir YPSK yöntemi ile karşılaştırılmıştır.

Jain ve Sharma (2012, s. 443) GRA'nın farmasötik formülasyonda ve biyolojik matriksten tayini için katodik adsorptif sıyırma voltametrisi ile bir yöntem geliştirmişlerdir. Çalışmada GRA metanolde çözüldükten sonra uygun derişimlere 0,2 M fosfat tamponu ile seyreltilmiştir. -1.3 ile -1.5 V aralığında asılı cıva damlası elektrotta GRA'ya ait bir indirgenme piki gözlenmiştir. GRA'nın insan plazmasına eklenmesiyle elde edilen örneklerden ekstraksiyonu için katı faz ekstraksiyonu kullanılmıştır. Geliştirilen yöntemin geçerliliği; sistem uygunluğu, spesifiklik, geri kazanım, doğrusallık, tekrarlanabilirlik ve tutarlılık parametreleri ile gösterilmiştir. Yöntemde GRA'nın gözlenebilme sınırı farmasötik formülasyonda 13,63 ng/mL ve insan plazmasında 11,75 ng/mL olarak bulunmuştur.

Prabu, Selvamani ve Latha (2010, s. 1445) GRA'nın tabletlerden miktar tayini için hızlı ve tekrarlanabilir bir HPTLC yöntemi geliştirmiş ve bu yöntemi valide etmişlerdir. Çalışmada GRA metanolde çözülmüştür. Yöntemde sabit faz olarak 20×10 cm boyutlarında silika jel 60F254 ve hareketli faz olarak kloroform:metanol (8:2) kullanılmıştır. Densitometrik tayin 301 nm'de gerçekleştirilmiştir. Bu koşullar altında GRA için R_f değeri 0,45±0,02 olarak gözlenmiştir. Yöntemin geçerliliği doğrusallık, kesinlik, sağlamlık, duyarlılık, spesifiklik, doğruluk ve geri kazanım parametreleri ile gösterilmiştir. Yöntemin gözlenebilme sınırı 50 ng/bant olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemin 2,24 mg GRA içeren tabletlerin analizine başarı ile uygulandığı bildirilmiştir.

Rao vd. (2012, s. 229) GRA'nın aktif farmasötik bileşenlerine ve farmasötik dozaj formlarına değişen dalga boyuna sahip UV detektöre bağlı YPSK ile bir yöntem geliştirmişlerdir. Çalışmadan 5 µm partikül boyutunda 250 mm×4,6 mm boyutlarında

Gemini NX C18 kolon kullanılmıştır. Hareketli faz olarak 0,01 M sodyum hidrojen fosfat tamponu (pH 7,5) ve asetonitril (80:20, h/h) kullanılmıştır ve akış hızı 1,5 mL/dk olarak belirlenmiştir. Dalga boyu olarak 305 nm’de çalışılmıştır. Standart çözelti konsantrasyonu hareketli fazın seyreltilmesiyle hazırlanan çözeltiyle stok çözeltiden hazırlanmıştır. Çalışmanın validasyonu doğrusalılık, gözlenebilme ve tayin sınırı, doğruluk ve tekrarlanabilirlik parametreleriyle gösterilmiştir. Yöntemin doğrusal olduğu aralık 2-10 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Yöntemin tayin sınırı 0,4553 µg/mL ve gözlenebilme sınırı 0,1502 µg/mL olarak bulunmuştur.

Capacio vd. (1993, s. 151) GRA’nın kobay plazmasından tayini için bir YPSK yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemde UV detektör kullanılmıştır ve dalga boyu 305 nm olarak tespit edilmiştir. Çalışmada GRA suda çözülmüştür. Ayrım 100×4,6 mm boyutlarında ve 5 µm partikül çapına sahip C18 kolonda gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak asetonitril:0,025 M sodyum asetat (pH 4,2) (40:60) sistemi 1 mL/dk akış hızında kullanılmıştır. Alıkonma zamanı 3.44 dk olarak bulunmuştur. Kullanılan sistemde GRA için elde edilen gözlenebilme sınırı 0,019 ng/µL olarak tespit edilmiştir. Yöntemin validasyonu kesinlik, duyarlık, doğruluk ve kararlılık parametreleri ile gösterilmiştir.

Heda vd. (2011, s. 696) GRA ve deksametazonun kombine preparatlarından tayini için bir YPSK yöntemi geliştirmişlerdir. Deteksiyon 242 nm’de UV detektörde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada etkin maddeler etanol:PEG 400:su (20:20:60) karışımında çözülmüştür. Ayrım 250×4,6 mm boyutlarında siyano kolonda gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak asetonitril:triethylamin tamponu (100 mM, pH 3,0) (25:75) sistemi 2 mL/dk akış hızında kullanılmıştır. Bu koşullar altında GRA’nın alıkonma zamanı 3.057 dk olarak gözlemlenmiştir. Yöntemin geçerliliği doğrusalılık, doğruluk ve kesinlik parametreleri ile gösterilmiş ve gözlenebilme sınırı GRA için 1,69 µg/mL olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntemin sistem uygunluğu kuyruklanma faktörü ve teorik tabaka sayısı ile gösterilmiştir.

Souri vd. (2011, s. 443) GRA ve bozunma ürünlerinin miktar tayini için UV detektör kullanarak bir YPSK yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada GRA suda çözülmüştür. Yöntemde dalga boyu olarak 305 nm kullanılmıştır ve ayırım 250×4,6 mm boyutlarında ve 4 µm partikül çapına sahip C8 kolonda gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak asetonitril:25 mM KH₂PO₄ (75:25, h/h) sistemi kullanılmıştır. Bu koşullar altında GRA için alıkonma zamanı 3.5 dk olarak bulunmuştur. Yöntemin geçerliliği doğrusalılık, sistem uygunluk testleri, doğruluk, kesinlik, duyarlılık ve geri kazanım

parametreleri ile gösterilmiştir. Yöntemin GRA için gözlenebilme sınırı 0,05 µg/mL olarak bulunmuştur. Asidik, bazik, nötral, oksidatif, ısı ve UV ışığı koşulları altında GRA'nın bozunma çalışmaları incelenmiştir. GRA'nın asidik, bazik ve oksidatif stres koşullarında bozunduğu gözlemlenmiştir. Geliştirilen yöntem GRA tabletlerine ve in vitro dissolüsyon çalışmalarına uygulanmıştır.

Chen vd. (2017, s. 137) infüzyon çözeltilerinde DAD'a bağlı YPSK yöntemi ile dekzametazon, ondansetron, GRA, tropisetron ve azasetronun miktar tayinini gerçekleştirmişlerdir. GRA'nın ölçümü için 302 nm dalga boyu kullanılmıştır. Çalışmada tüm antiemetik ilaçlar suda çözülerek kullanılmıştır. Ayrım 150×4,6 mm boyutlarında ve 5 µm partikül çapına sahip C18 kolonda gerçekleşmiştir. Asetonitril:50 mM KH₂PO₄:triethylamin (25:74:1; h/h; pH 4.0) sistemi hareketli faz olarak 1 mL/dk akış hızında kullanılmıştır. Bu koşullar altında GRA için alıkonma zamanı 5.97 dk olarak belirlenmiştir. Yöntemin geçerliliği spesifiklik, doğrusallık, doğruluk, kesinlik ve duyarlılık parametreleri ile gösterilmiştir. Yöntemde GRA için gözlenebilme sınırı 0,06 mg/L olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntem ile hazırlanan infüzyon çözeltilerinin fizikokimyasal kararlılıkları incelenmiştir.

Hewala vd. (2010, s. 184) GRA, benzil alkol ve bunların ana bozunma ürünlerinin parenteral dozaj formlarından tayini için bir YPSK yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışma 210 nm'de DAD ile gerçekleştirilmiştir. İncelenen maddeler asetonitril:su (1:1) sisteminde çözünmüştür. Yöntemde ayırım için 250×4,6 mm boyutlarında ve 5 µm partikül çapında C8 kolon kullanılmıştır. Hareketli faz olarak pH'ı 4,8 olan asetonitril:0.05 M potasyum dihidrojen fosfat:triethylamin (22:100:0.15) kullanılmıştır. Hareketli fazın akış hızı 2 mL/dk olarak belirlenmiştir. Bu koşullar altında GRA için alıkonma zamanı 9.5 dk olarak gözlenmiştir. Geliştirilen yöntemin validasyonu spesifiklik, doğrusallık, doğruluk ve kesinlik parametreleri ile gösterilmiş ve GRA için gözlenebilme sınırı 0,29 µg/mL olarak bulunmuştur.

Hewala vd. (2011 s. 1447) GRA, metil paraben, propil paraben, sodyum benzoat ve bunların başlıca bozunma ürünlerinin oral farmasötik preparatlardan tayini için DAD kullanarak bir YPSK yöntemi geliştirmişlerdir. Deteksiyon 240 nm'de gerçekleştirilmiştir. Çalışmada tüm maddeler ve iç standart olarak kullanılan etil paraben asetonitril:su (1:1, h/h) sisteminde çözölmüş ve seyreltmeler hareketli faz ile yapılmıştır. Ayrım için 100×4,6 mm boyutlarında ve 3,5 µm partikül çapına sahip C18 kolon kullanılmıştır. Hareketli faz olarak asetonitril:0,05 M KH₂PO₄ (3:7, h/h) çözeltisi,

pH'ı 3,0'a ayarlanarak kullanılmıştır. Bu koşullar altında GRA için alıkonma zamanının 1 dk'dan daha kısa olduğu ve tüm analizin 8 dk sürdüğü bildirilmiştir. Geliştirilen yöntemin geçerliliği spesifiklik, doğruluk, doğrusallık, kesinlik ve sağlamlık parametreleri ile gösterilmiştir. Yöntemde GRA için gözlenebilme sınırı 1,2927 µg/mL olarak bulunmuştur. Çalışmada ayrıca hesaplanan sistem uygunluk değerleri de sunulmuştur. Geliştirilen yöntem GRA'nın oral damla ve çözeltilerine başarı ile uygulanmıştır.

Maksic vd. (2016, s. 93) GRA ve onun iki bozunma ürününün tayini için hidrofilik etkileşim sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Deteksiyon UV detektörle 303 nm'de gerçekleştirilmiştir. Ayrım için 100×4,6 mm boyutlarında, 5 µm partikül çapına sahip sülfalkilbetain grupları ile türevlendirilmiş silika kolon kullanılmıştır. Hareketli faz olarak asetonitril:amonyum asetat (pH 3,3) (94.7:5.3, h/h) sistemi 1 mL/dk akış hızında kullanılmıştır. Bu koşullar altında GRA için alıkonma zamanı 8.399 dk olarak gözlenmiştir. Yöntemin geçerliliği seçicilik, doğrusallık, doğruluk ve kesinlik parametreleri ile gösterilmiştir. Geliştirilen yöntem GRA preparatlarına ve çeşitli koşullar altındaki bozunmasının incelenmesine uygulanmıştır.

Allen vd. (1994, s. 159) GRA'nın intravenöz kullanımı sonrası sağlıklı insanlardan alınan idrar ve plazma örneklerinden farmakokinetik ve tolerabilitesini ölçmek amacıyla florimetrik detektör içeren bir YPSK yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada 10 µm partikül çapına sahip 25 cm×4,6 mm boyutlarında siyano kolon kullanılmıştır. Hareketli faz olarak metanol:sodyum asetat tamponu (0,05 M, pH 6,0) (97:3) kullanılmıştır ve akış hızı 1,0 mL/dk olarak belirlenmiştir. Plazma ve idrar örnekleri -70°C'de saklanmıştır. Yöntemin validasyonu doğrusallık, duyarlılık, doğruluk ve tekrarlanabilirlik parametreleri incelenmiştir. GRA'nın 100 ng/mL'ye kadar doğrusal olduğu tespit edilmiştir ve gözlenebilme sınırı 0,1 ng/mL olarak bulunmuştur.

Huang vd. (1998, s. 251) GRA'nın fare kan ve beyin mikrodializatlarından tayini için florimetrik detektörle bir YPSK yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemde uyarma dalga boyu olarak 305 nm ve yayma dalga boyu olarak 360 nm kullanılmıştır. Çalışmada ayırım 150×4,6 mm boyutlarında ve 5 µm partikül çapına sahip C18 kolonda gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 25 mM asetat tamponu (pH 4,8):asetonitril (72:28, h/h) hareketli faz olarak kullanılmıştır. Bu koşullar altında GRA için alıkonma zamanı 5.7 dk olarak bulunmuştur. Yöntemin validasyonu için spesifiklik, duyarlılık, doğrusallık,

kesinlik ve doğruluk parametreleri ile gösterilmiştir. Yöntemde tayin sınırı 0,5 ng/mL olarak tespit edilmiştir. 12 dk'da bir toplanan kan ve beyin mikrodializatlarının analizi sonucunda GRA'nın farelerde kan beyin bariyerini aştığı sonucuna varılmıştır.

Pinguet vd. (1996, s. 99) GRA'nın insan plazmasından tayini için florimetrik detektörle bir YPSK yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemde uyarma dalga boyu olarak 305 nm ve yayma dalga boyu olarak 365 nm kullanılmıştır. Çalışmada GRA ve IS suda çözülmüştür. Maddenin plazmadan ekstraksiyonu için sıvı-sıvı ekstraksiyonu kullanılmıştır. Çalışmada ayırım 250×4,6 mm boyutlarında ve 10 µm partikül çapına sahip C18 kolonda gerçekleştirilmiştir. Yöntemde hareketli faz olarak asetonitril:fosfat tamponu (pH 4,5, 15:85, h/h) kullanılmıştır. Bu koşullar altında GRA ve IS için alıkonma zamanları sırasıyla 6.64 ve 3.60 dk olarak gözlemlenmiştir. Geliştirilen yöntemin geçerliliği doğrusalılık, spesifiklik, kararlılık, kesinlik, doğruluk ve duyarlılık parametreleri ile gösterilmiştir. Yöntemin tayin sınırı 0,3 ng/mL olarak tespit edilmiştir. Geliştirilen yöntem insan plazmasına eklenen GRA örneklerine uygulanmıştır.

Kudoh vd. (1994, s. 205) GRA ve metabolitinin insan plazmasından tayini için flüoresans detektör ile bir YPSK yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemde uyarma dalga boyu olarak 310 nm ve yayma dalga boyu olarak 420 nm kullanılmıştır. Çalışmada tüm maddeler suda çözülmüştür. Ayırım için 15×3,2 mm boyutlarında ön kolona bağlı 250×4,6 mm boyutlarında ve 5 µm partikül çapına sahip C18 kolon kullanılmıştır. Hareketli faz olarak %1 oranında tetra-n-bütil amonyum hidroksit içeren 0,1 M amonyum asetat tamponu (pH 4,7) ve metanol (7:3, h/h) kullanılmıştır. Hareketli fazın akış hızı 1 mL/dk olarak bildirilmiştir. Bu koşullar altında GRA için analiz süresi 10 dk'nın altında gözlenmiştir. Çalışmada geliştirilen yöntemin doğrusalılığı, doğruluğu ve tekrarlanabilirliği gösterilmiştir. Yöntemde GRA için gözlenebilme sınırı 42 pg/mL olarak hesaplanmıştır.

Wada vd. (1998, s. 535) GRA'nın kanser hastalarının serum, idrar, plevral efüzyon gibi biyolojik sıvılarından YPSK yöntemi ile tayinini gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada flüoresans detektörün uyarma dalga boyu 290 nm, yayma dalga boyu 365 nm'ye ayarlanarak kullanılmıştır. Kullanılan kolon 250×4,6 mm boyutlarına, 10 µm partikül çapına sahiptir. Hareketli faz olarak asetonitril:0,1 M asetat tamponu (pH 3,5) (7:3) kullanılmıştır ve akış hızı 1 mL/dk'dır. Çalışmada iki farklı IS kullanılmıştır ve alıkonma süreleri sırasıyla IS'ler için 4.5 ve 9.5 dk, GRA için 11.3 dk olarak belirlenmiştir. GRA için tayin sınırının 0,25 ng/mL olduğu gözlemlenmiştir. Yöntemin

geçerliliği doğrusallık, kesinlik, tekrarlanabilirlik, doğruluk ve geri kazanım parametreleriyle gösterilmiştir.

Boppana, (1995, s. 195) GRA ve metabolitinin flüoresans ve elektrokimyasal detektör kullanarak YPSK yöntemi ile plazmadan tayinini gerçekleştirmiştir. Yöntemde uyarma dalga boyu olarak 305 nm ve yayma dalga boyu olarak 360 nm kullanılmıştır. Çalışmada GRA suda çözünmüş ve 4°C’de 4 ay süre ile kararlı olduğu gözlemlenmiştir. GRA ve metabolitinin plazmadan ekstraksiyonu için katı faz ekstraksiyonu uygulanmıştır. Hareketli faz olarak asetat tamponu (0.1 M, pH:4,7):asetonitril (405:95, h/h) sistemi, iyon çifti oluşturan bileşenlerin asetat tamponuna katılmasıyla kullanılmıştır. Hareketli faz 0,3 mL/dk akış hızında kullanılmıştır. Ayırım 150×2.1 mm boyutlarında C8 kolonda gerçekleştirilmiştir. Bu koşullar altında flüoresans detektörün kullanıldığı yöntemde GRA için alıkonma zamanı 20 dk olarak bulunmuştur. Yöntemin validasyonu doğrusallık, kesinlik, doğruluk, kararlılık ve seçicilik parametreleri ile gösterilmiştir. Yöntemin tayin sınırı GRA için 0,25 ng/mL olarak gözlemlenmiştir.

Xiang vd. (2007, s. 174) plazmadan GRA tayini için kütle spektrometresine bağlı sıvı kromatografisi (LC-MS) ile bir yöntem geliştirmişlerdir. Yöntemde GRA’nın zayıf sinyallerini artırmak için sinyal artırma tekniği kullanılmıştır. Ayırım 250×4,6 mm boyutlarında ve 5 µm partikül çapına sahip siyano kolonda gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak 0,05 M amonyum asetat tamponu (pH 6,9): metanol (15:85, h/h) sistemi 1 mL/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. Yöntemde GRA için alıkonma zamanı 12 dk olarak bulunmuştur. Yöntemin geçerliliği doğrusallık, doğruluk, kesinlik ve duyarlılık parametreleri ile gösterilmiştir. Kullanılan teknikle GRA için elde edilen gözlenebilme sınırı 0,01 ng/mL olarak gözlemlenmiştir.

Woo, (2006, s. 778) yaptığı çalışmada farelerde GRA’nın nazal uygulanmasını takiben plazmadan tayini için bir LC-MS yöntemi geliştirmiştir. Çalışmada 150×2,1 mm boyutlarında ve 3 µm partikül çapına sahip C18 kolon kullanılmıştır. Çalışmada IS olarak ondansetron kullanılmıştır. Hareketli faz olarak su:asetonitril:10 mM amonyum asetat (27/23/50, h/h/h) (pH 3,5) karışımı 0,2 mL/dk akış hızında kullanılmıştır. Analizdeki alıkonma süreleri sırasıyla GRA için 4.6 dk, IS için 5.5 dk olarak belirlenmiştir ve tüm analiz 12 dk boyunca sürmüştür. Geliştirilen yöntemin spesifikliği, geri kazanımı, kesinliği, doğruluğu, stabilitesi ve duyarlılığı incelenmiştir. Yöntemin gözlenebilme sınırı 1,55 ng/mL olarak bulunmuştur.

Boppana, Miller-Stein ve Schaefer, (1996, s. 227) GRA ve metabolitinin köpek plazmasından tayini için tandem (dizili) kütle spektrometresine bağlı bir sıvı kromatografi (LC-MS/MS) yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada GRA ve metaboliti suda çözülmüştür. Ayrım 15×1 mm boyutlarında ön kolona bağlı 50×4,6 mm boyutlarında ve 5 µm partikül çapına sahip C8 kolonda gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak 0,05 M amonyum asetat (pH 5,0) ve asetonitril (73:27, h/h) çözeltileri kullanılmıştır. Yöntemde toplam analiz süresi 6 dk'dır. Geliştirilen yöntemin validasyonu doğrusallık, kesinlik, doğruluk ve seçicilik parametreleri ile gösterilmiştir. Yöntemde alt tayin sınırı GRA ve metaboliti için 0,05 ng/mL olarak gözlemlenmiştir.

Zhao vd. (2015, s. 149) GRA'nın insan plazma ve idrar örneklerinden LC-MS/MS yöntemi ile bir miktar tayini yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemde 3,5 µm partikül çapında 3,0 mm×50 mm boyutlarında C18 kolon kullanılmıştır. Hareketli faz olarak 0,2 mM amonyum format ve %0,14 formik asit (pH 4,0) içeren su:asetonitril (8:2) kullanılmıştır ve akış hızı 0,2 mL/dk'dır. GRA'nın alıkonma zamanı 4.1 olarak tespit edilmiştir. Plazma ve idrar örnekleri -80°C'de dondurularak saklanmıştır. Yöntemin geçerliliğini göstermek amacıyla seçicilik, gözlenebilme ve tayin sınırı, doğruluk, doğrusallık ve kararlılık parametreleri incelenmiştir. Çalışmanın doğrusal olduğu aralıklar 2-2000 ng/mL olarak bulunmuştur.

Zhou vd. (2014, s. 1597) GRA'nın insan plazmasından tayini için bir LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada GRA metanolde çözülmüştür. Ayrım için 75×2 mm boyutlarında ve 4 µm partikül çapına sahip C18 kolon kullanılmıştır. Hareketli faz olarak 5 mM pH 4,0 amonyum format:metanol (300/316, h/h) kullanılmıştır. Bu koşullar altında GRA için alıkonma zamanı 1.08 dk olarak gözlenmiştir. Çalışmada toplam analiz süresi 2.5 dk'dır. Yöntemin validasyonu seçicilik, duyarlılık, doğrusallık, doğruluk, kesinlik ve kararlılık parametreleri ile gösterilmiştir. Yöntemde alt tayin sınırı 0,1 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntem sağlıklı bireylerden alınan plazma örneklerine uygulanarak GRA'nın karşılaştırılmalı farmakokinetik çalışması yapılmıştır.

Jiang vd. (2006, s. 464) insan plazmasından GRA tayini için bir LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada GRA metanolde çözülmüştür. Ayrım 50×4,6 mm boyutlarında 5 µm partikül çapına sahip C18 kolonda gerçekleştirilmiştir. Yöntemde hareketli faz olarak asetonitril-su (10 mM amonyum asetat ve % 0,5 asetik asit içeren) (40:60, h/h) sistemi 1 mL/dk akış hızında kullanılmıştır. GRA ve IS'nin plazmadan

ekstraksiyonu için sıvı-sıvı ekstraksiyonu kullanılmıştır. Çalışmada her örnek için analiz süresinin 2 dk olduğu belirtilmiştir. Yöntemin validasyonu seçicilik, duyarlılık, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, ekstraksiyon geri kazanımı ve kararlılık parametreleri ile gösterilmiştir. Yöntemin tayin sınırı 0,02 ng/mL olarak bildirilmiştir. Geliştirilen yöntem insan plazmasına ve biyoeşdeğerlik çalışmasına uygulanmıştır.

Nirogi vd. (2006, s. 888) GRA'nın insan plazmasından miktar tayini için bir LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada 5 µm partikül çapına sahip 150 mm×4,6 mm boyutlarında C18 kolon kullanılmıştır. İzokratik olan hareketli faz %0.03 formik asit:asetonitril (30:70, h/h) içermektedir ve akış hızı 1,0 mL/dk'dır. Örnek hazırlamada sıvı-sıvı ekstraksiyonu yöntemi kullanmışlardır. Yöntemde stok GRA ve IS'nin çözücüsü olarak metanol kullanılmıştır ve seyreltmeleri su:metanol (50:50, h/h) ile yapılmıştır. Stok çözeltiler -50°C'de dondurularak saklanmıştır. Çalışmanın analiz süresi 2 dk'dır. Yöntemin validasyon çalışmaları doğrusallık, doğruluk, geri kazanma, tekrarlanabilirlik ve kesinlik parametreleriyle gösterilmiştir. Kalibrasyon eğrisi 0,1-20 ng/mL aralığında doğrusaldır. Çalışmada alt tayin sınırı %5'den az standart sapma ile birlikte 100 pg/mL olarak belirlenmiştir.

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Borat	: Sigma-Aldrich, Almanya
CH ₃ COOH	: Merck, Almanya
CH ₃ COONa	: Merck, Almanya
Granisetron HCl	: LGC Standards, Almanya
H ₃ PO ₄	: Sigma-Aldrich, Almanya
HClO ₄	: Sigma-Aldrich, Almanya
Metanol	: Merck, Almanya
Metoprolol süksinat	: LGC Standards, Almanya
NaOH	: Merck, Almanya
NaH ₂ PO	: Sigma-Aldrich, Almanya

3.2. Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı	: Arçelik, No Frost&Electronic, Türkiye
C6 kolon	: Phenomenex, A.B.D.
C18 kolon	: Phenomenex, A.B.D.
Filtre	: Macherey Nagel, Almanya
Filtre kağıdı	: Lubitech Technologies, Çin
Hassas terazi	: Mettler Toledo, İsviçre
Kapiler	: Agilent Technologies, A.B.D.
Kapiler elektroforez	: Agilent Technologies, CE7100, A.B.D.
Otomatik pipet	: Eppendorf, Almanya
pH metre	: Mettler Toledo, İsviçre
Spektrofotometre	: Shimadzu, UV-2401, Japonya
Ultra saf su cihazı	: Millipore, A.B.D.
Ultrasonik banyo	: Sonorex, Almanya
Vorteks karıştırıcı	: Jeio Tech, Kore
YPSK	: Agilent Technologies, 1260 Infinity, Almanya

4. YÖNTEMLER

4.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanışı

Geliştirilecek yöntemlerde kullanılmak üzere öncelikle GRA için uygun çözücü araştırılmıştır. Bu amaçla GRA'nın suda ve metanolde stok çözeltileri (10^{-3} M düzeyinde) hazırlanmış ve gerekli seyreltmeler yine bu çözeltilerle yapılarak analiz edilmiştir. Yapılan ön denemelerde suda çözülen GRA'nın daha iyi sonuçlar verdiği ve metanolde çözülen GRA'nın analiz sonuçlarında herhangi bir iyileşme gözlenmediği için çalışmada GRA'nın suda çözülmesine karar verilmiştir.

KE'de tekrarlayan analizlerde zemin gürültüsünde gözlenen sorunları azaltabilmek amacı ile GRA'nın seyreltmelerinin çalışma tamponu ile yapılması öngörülmüştür. Bu amaçla çeşitli oranlarda seyreltilen çalışma tamponu, seyreltme çözeltisi olarak kullanılmıştır. Yapılan analizlerde en iyi sonuçlar, 1/10 oranında suyla seyreltilen çalışma tamponunun kullanılması ile elde edilmiştir.

YPSK da ise böyle bir sorunla karşılaşmadığı için seyreltmeler su ile yapılmıştır. Yöntemin güvenilirliğini arttırmak için uygun bir IS araştırılmıştır. Bunun için pek çok maddenin analizi yapılmış ve en uygun sonuçlar MTP ile elde edilmiştir. MTP her iki yöntem için suda çözülerek kullanılmış ve seyreltmeleri GRA ile aynı şekilde yapılmıştır.

4.2. UV Spektrofotometri

KE yönteminde kullanılacak dalga boyunu belirlemek amacı ile GRA'nın suda ve metanolde çözeltileri hazırlanarak (10^{-5} M düzeyinde) 200-400 nm aralığında spektrumları kaydedilmiştir. Bu aralıkta GRA'nın en yüksek absorbands verdiği dalga boyları belirlenmiştir.

4.3. Kapiler Elektforez Yöntemi

4.3.1. Cihazla ilgili koşullar

Yöntemde optimizasyon süresince deteksiyon foto diyot dizisi detektörün aynı anda birden fazla dalga boyu ile çalışmaya olanak sağlaması nedeni ile 205.5 nm ve 207.5 nm'de gerçekleştirilmiştir. Ayrım için 75 µm iç çapa sahip 40 cm efektif uzunlukta (48.5 cm toplam) kapiler kullanılmıştır. Kapilerin şartlanması için ilk

kullanımında 30 dk 1 M sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi, 10 dk 0,1 M NaOH çözeltisi, 10 dk distile su ve 10 dk çalışma tamponu ile yıkanmıştır.

Cihazın her açılışında kapiler 10 dk 0,1 M perklorik asit (HClO₄) çözeltisi, 10 dk distile su ve 10 dk çalışma tamponu ile yıkanmıştır. Örneklerin analizleri arasında şartlandırma sırasıyla 2 dk 0,1 M HClO₄ çözeltisi, 2 dk distile su ve 2 dk çalışma tamponu ile yıkama olacak şekilde sağlanmıştır. Cihazın günlük kullanımı sonrasında ise kapiler sırasıyla 10 dk 0,1 M HClO₄ çözeltisi ve 5 dk distile su ile yıkadıktan sonra 2 dk hava çekilerek bırakılmıştır.

4.3.2. Çalışma tamponu

Çalışma tamponu hazırlanabilmesi için monosodyum fosfattan (NaH₂PO₄) 639,3 mg tartım alınmıştır. Bu tartım 50 mL'ye distile su ile tamamlanarak 100 mM düzeyinde ana stok hazırlanmıştır. Tamponun suda tam olarak çözünmesi için 10 dk ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Gerekli seyreltmeler su ile yapıldıktan sonra çalışılacak uygun derişimdeki tamponun pH ayarı seyreltik fosforik asit (H₃PO₄) ile yapılmıştır. Çalışma tamponu 0,45 µm'lik filtre ile süzöldükten sonra cihaza verilmiştir.

Hazırlanan çalışma tamponu 1/10 oranında distile su ile seyreltilmiştir. Bu derişim stok olarak hazırlanan GRA ve MTP çözeltileri üzerinden yapılan tüm seyreltmelerde çözücü olarak kullanılmıştır.

4.3.3. Optimizasyon çalışmaları

KE yönteminde kullanılmak üzere GRA'dan 3,55 mg tartım alınarak 10 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır ($1,01 \times 10^{-3}$ M). Maddenin tam olarak çözünmesi için önce vortekste karıştırılmıştır. Daha sonra 10 dk ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Hazırlanan çözelti alüminyum folyoya sarılarak, 4°C'de buzdolabında saklanmıştır. Gerekli seyreltmeler bu çözelti üzerinden yapılmıştır.

IS olarak kullanılmak üzere MTP'den 2,02 mg tartım alınarak 10 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır ($3,0880 \times 10^{-4}$ M). Maddenin tam olarak çözünmesi için önce vortekste karıştırılmıştır. Daha sonra 10 dk ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Hazırlanan çözelti alüminyum folyoya sarılarak, 4°C'de buzdolabında saklanmıştır. Gerekli seyreltmeler bu çözelti üzerinden yapılmıştır.

KE yönteminin optimizasyonu için tamponu derişimi, pH, organik çözücü oranı ve potansiyel parametreleri incelenmiştir. Enjeksiyon süresi ve basıncı cihazın kullanım kılavuzunda önerildiği şekilde 10 s süre ile 50 mbar olarak sabit tutulmuştur.

4.3.3.1. Tampon derişimi

Yöntemdeki uygun tampon derişimini ayarlamak amacıyla pH'ı 3,00 olan 10 mM, 15 mM ve 20 mM derişiminde 3 farklı fosfat tamponu hazırlanmıştır. Bu çalışma tamponları ile 25 kV potansiyel altında GRA'nın 3'er analizi gerçekleştirilmiştir. Pik morfolojileri ve alıkonma zamanları değerlendirilerek uygun derişimdeki fosfat tamponuna karar verilmiştir.

4.3.3.2. pH

Çalışılan yöntem için uygun pH'ın belirlenmesi amacıyla çalışma 10 mM fosfat derişiminde pH'ları sırasıyla 2,50, 2,75 ve 3,00 olan çalışma tamponları hazırlanmıştır. Bu çalışma tamponları ile 25 kV potansiyel altında GRA'nın 3'er analizi gerçekleştirilmiştir. Pik morfolojileri ve alıkonma zamanları değerlendirilerek yeterli ayırımın sağlandığı uygun pH seçilmiştir.

4.3.3.3. Potansiyel

Analitik parametrelerin belirlenmesinden sonra aletsel parametrelerden olan potansiyelin optimum koşulunun belirlenmesi için 22.5 kV, 25 kV ve 27.5 kV potansiyel altında GRA'nın 3'er enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu analizler sonucunda gözlenen alıkonma zamanları değerlendirilerek çalışma potansiyeline karar verilmiştir.

4.3.4. Validasyon çalışmaları

KE'de geliştirilen yöntemin geçerliliğinin gösterilmesi amacıyla yöntemin doğrusalılık, kesinlik, doğruluk, duyarlılık, kararlılık, spesifiklik ve sağlamlık parametreleri incelenmiştir. Validasyon hesaplamaları için pik normalizasyon oranları (PNO) ($\text{Pik Normalizasyonu} = \frac{\text{Alan}_{\text{madde}}}{\text{Alıkonma zamanı}_{\text{madde}}} / \frac{\text{Alan}_{\text{IS}}}{\text{Alıkonma zamanı}_{\text{IS}}}$) kullanılmıştır. Validasyon çalışmaları boyunca IS'nın son derişimi 6.18×10^{-7} M olacak şekilde kullanılmıştır.

4.3.4.1. Doğrusallık

Çalışma aralıkları boyunca doğrusal bir ilişki olup olmadığının incelenmesi için GRA'nın $2,99 \times 10^{-8}$ M ve $4,88 \times 10^{-6}$ M aralığında 13 farklı derişimi hazırlanmıştır. ($2,99 \times 10^{-8}$ M, $4,98 \times 10^{-8}$ M, $6,22 \times 10^{-8}$ M, $7,78 \times 10^{-8}$ M, $1,30 \times 10^{-7}$ M, $2,16 \times 10^{-7}$ M, $3,60 \times 10^{-7}$ M, $4,50 \times 10^{-7}$ M, $7,50 \times 10^{-7}$ M, $9,38 \times 10^{-7}$ M, $1,17 \times 10^{-6}$ M, $2,93 \times 10^{-6}$ M ve $4,88 \times 10^{-6}$ M). Bu 13 farklı derişimin cihazda 2'şer analizi gerçekleştirilmiştir.

Çalışılabilecek doğrusal aralık belirlendikten sonra yöntemin kalibrasyonu için GRA'nın $4,50 \times 10^{-7}$ M, $5,62 \times 10^{-7}$ M, $7,03 \times 10^{-7}$ M, $8,79 \times 10^{-7}$ M, $1,05 \times 10^{-6}$ M ve $1,75 \times 10^{-6}$ M derişimlerde 6 farklı çözeltisi hazırlanmış ve bu çözeltilerin gün içi ve günler arası olmak üzere 6'şar analizi gerçekleştirilmiştir.

4.3.4.2. Kesinlik

Yöntemin kesinliğinin gösterilmesi amacıyla $7,03 \times 10^{-7}$ M derişiminde GRA'nın 3 farklı günde 6'şar kez analizi gerçekleştirilmiştir.

4.3.4.3. Doğruluk

Yöntemin doğruluk çalışmasının gerçekleştirilmesi için GRA çözeltisinden $4,50 \times 10^{-7}$ M, $8,79 \times 10^{-7}$ M ve $1,75 \times 10^{-6}$ M derişimlerde 3 ayrı set hazırlanmıştır. Bu setlerin gün içi ve günler arası olmak üzere 6'şar kez analizi gerçekleştirilmiştir.

Yöntemin farmasötik preparatların matriks ortamlarındaki doğruluğunun belirlenmesi amacı ile tablet ve ampul matriksleri hazırlanmıştır. Her iki farmasötik preparat için, matriks ortamına 3 farklı derişim düzeyinde GRA eklenmiş ve her bir çözelti 3 kez analiz edilerek istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır.

4.3.4.4. Duyarlılık

Yöntemin duyarlılığının belirlenebilmesi için kalibrasyon eğrisinin standart sapması ve eğimi kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır.

4.3.4.5. Kararlılık

Yöntemin kararlılık çalışması için $8,14 \times 10^{-7}$ M derişimde GRA'nın taze hazırlanmış, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat bekletilmiş ve alüminyum folyo ile sarılı halde -18°C 'de 1 ay bekletilmiş çözeltileri 3'er kez analiz edilerek sonuçlar karşılaştırılmıştır.

4.3.4.6. Sağlamlık

Yöntemin sağlamlık parametresinin incelenmesi için optimizasyon parametreleri üzerinde küçük değişiklikler yapılmıştır. Tüm parametrelerin incelemesi sırasında $5,09 \times 10^{-7}$ M derişiminde GRA çözeltisi kullanılmıştır.

Optimum koşullar altında karar verilen dalga boyu 205.5 nm ± 1.5 nm değiştirilerek 3'er analiz gerçekleştirilmiştir.

Tampon derişimi 20 mM olarak belirlenen yöntemin tampon derişimi ± 1 mM değiştirilerek 3'er kez analiz gerçekleştirilmiştir.

Tampon derişiminin 2,75 olarak belirlenen pH'ı ± 0.05 birim değiştirilerek 3'er analiz yapılmıştır.

4.4. YPSK Yöntemi

4.4.1. Cihaz ile ilgili koşullar

YPSK yönteminde deteksiyon flüoresans detektörle sağlanmıştır. Ayrım için 150×3.0 mm boyutunda ve 5,0 μ m partikül çapına sahip C6 fenil bağlı silika kolon kullanılmıştır.

Cihazın ilk açılış yıkamasında kolondan önce %50 metanol daha sonra da %40 metanol geçirilmiştir. Her analiz öncesinde de kolondan 20 dk hareketli faz geçirilmiştir. Kapanış yıkaması ise kolondan 20 dk %40 metanol geçirilerek yapılmıştır.

4.4.2. Hareketli fazın hazırlanışı

Yöntemde hareketli fazın hazırlanması için sodyum asetattan (CH_3COONa) 1.36 g tartılıp distile su ile 100 mL'ye tamamlanarak bir stok çözelti hazırlanmıştır. Tam olarak karışabilmesi çözelti 10 dk ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Stok çözeltiden gerekli seyrelteler su ile yapılarak pH ayarı asetik asit (CH_3COOH) ile sağlanmıştır. Bu karışım vakum altında filtre edilerek üzerine mezürde istenilen miktarda hacmi ölçülen metanol eklenmiştir. Hazırlanan hareketli faz daha sonra 15 dk ultrasonik banyoda bekletildikten sonra analize başlanmıştır.

4.4.3. Optimizasyon çalışmaları

YPSK yönteminde kullanılacak olan GRA ve MTP çözeltileri, KE yöntemi için hazırlanmış olan stok çözeltilerden gerekli seyreltmeler yapılarak elde edilmiştir.

YPSK yönteminde optimizasyon çalışmaları için dalga boyu, hareketli fazdaki tampon derişimi, hareketli fazın pH'ı, hareketli fazdaki organik çözücü oranı ve akış hızı parametreleri incelenmiştir.

4.4.3.1. Dalga boyu

Yöntem için uygun uyarma ve yayma dalga boylarının belirlenmesi için 220-310 nm, 220-360 nm, 300-360 nm, 250-310 nm ve 250-360 nm'lerde GRA'nın %30 metanol içeren 40 mM asetat tamponu (pH 4,5) hareketli fazı ile 0,85 mL/dk akış hızı altında 3'er analizi gerçekleştirilmiştir. Uygun pik morfolojisine ve pik alanlarına göre dalga boyuna karar verilmiştir.

4.4.3.2. Hareketli fazdaki tampon derişimi

Hareketli fazdaki uygun tampon derişimini belirlemek amacıyla %30 metanol içeren ve pH'sı 4,5 olan 30 mM, 40 mM ve 50 mM derişimlerde 3 farklı asetat tamponu hazırlanmıştır. Bu çalışma tamponları ile GRA'nın 0,85 mL/dk akış hızı altında 3'er analizi gerçekleştirilmiştir. Uygun pik morfolojisi ve alıkonma zamanına bakılarak çalışılacak uygun asetat tamponu derişimine karar verilmiştir.

4.4.3.3. Organik çözücü oranı

Hareketli fazın organik çözücü oranına karar verebilmek amacıyla 30 mM asetat tamponu içeren pH'sı 4,5 olan ,%20, 30 ve 40 (h/h) oranlarında metanol bulunan hareketli fazlar hazırlanmıştır. Bu hareketli fazlarla GRA'nın 0,85 mL/dk akış hızı altında 3'er kez analizi gerçekleştirilmiştir. Alıkonma zamanı ve PNO'ya göre optimum organik çözücü oranına karar verilmiştir.

4.4.3.4. pH

Çalışma yönteminin optimum pH'sının belirlenmesi amacıyla %30 metanol içeren 30 mM asetat tamponunun pH'ları sırasıyla 4,0, 4,5 ve 5,0'e ayarlanmıştır. Bu hareketli fazlar ile GRA'nın 0,85 mL/dk akış hızı altında 3'er enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Uygun pik morfolojisi ve alıkonma zamanına bakarak yöntemin uygun pH'ı belirlenmiştir.

4.4.3.5. Akış hızı

Yöntemin aletsel parametrelerinden olan akış hızının optimizasyonu için hareketli faz olarak %30 metanol içeren 30 mM asetat tamponu (pH 4,0) ile 0,80, 0,85 ve 0,90 mL/dk akış hızında GRA'nın 3'er analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen piklerin uygun morfolojisine ve alıkonma zamanlarına bakılarak akış hızı tayin edilmiştir.

4.4.4. Validasyon

Optimizasyonu gerçekleştirilen YPSK yönteminin geçerliliğinin gösterilmesi için doğrusallık, kesinlik, doğruluk, duyarlılık, kararlılık, spesifiklik ve sağlamlık parametreleri incelenmiştir. Validasyon hesaplamaları için PNO kullanılmıştır. Validasyon çalışmaları boyunca IS'nin son derişimi $1,28 \times 10^{-7}$ M olacak şekilde kullanılmıştır.

4.4.4.1. Doğrusallık

Çalışma aralıkları boyunca doğrusal bir ilişki olup olmadığının incelenmesi için GRA'nın $5,65 \times 10^{-7}$ M ve $1,10 \times 10^{-9}$ M aralığında 13 farklı derişimi hazırlanmıştır. ($5,65 \times 10^{-7}$ M, $3,40 \times 10^{-7}$ M, $1,13 \times 10^{-7}$ M, $9,40 \times 10^{-8}$ M, $7,50 \times 10^{-8}$ M, $6,03 \times 10^{-8}$ M, $3,60 \times 10^{-8}$ M, $1,80 \times 10^{-8}$ M, $1,03 \times 10^{-8}$ M, $8,27 \times 10^{-9}$ M, $5,51 \times 10^{-9}$ M, $3,31 \times 10^{-9}$ M ve $1,10 \times 10^{-9}$ M). IS olarak kullanılan MTP'nin son derişimi $6,18 \times 10^{-8}$ M olacak şekilde sisteme verilmiştir. Bu 13 farklı derişimin cihazda 2'şer analizi gerçekleştirilmiştir.

Çalışılabilecek doğrusal aralığı belirlendikten sonra kalibrasyon için GRA'nın $2,41 \times 10^{-8}$ M, $3,62 \times 10^{-8}$ M, $6,03 \times 10^{-8}$ M, $7,54 \times 10^{-8}$ M, $9,42 \times 10^{-8}$ M, $1,13 \times 10^{-7}$ M ve $3,40 \times 10^{-7}$ M derişimlerde 7 farklı çözeltisi hazırlanmış ve bu çözeltilerin gün içi ve günler arası olmak üzere 6'şar analizi gerçekleştirilmiştir.

4.4.4.2. Kesinlik

Yöntemin kesinliğinin incelenmesi amacıyla $7,54 \times 10^{-8}$ M derişiminde GRA'nın 3 farklı günde 6'şar kez analizi gerçekleştirilmiştir.

4.4.4.3. Doğruluk

YPSK yönteminde doğruluk çalışması için GRA çözeltisinden $2,40 \times 10^{-8}$ M, $7,50 \times 10^{-8}$ M ve $3,40 \times 10^{-7}$ M derişimlerde 3 ayrı set hazırlanmıştır. Bu setlerin gün içi ve günler arası olmak üzere 6'şar kez analizi gerçekleştirilmiştir.

Yöntemin farmasötik preparatların matriks ortamlarındaki doğruluğunun belirlenmesi amacı ile tablet ve ampul matriksleri hazırlanmıştır. Her iki farmasötik preparat için, matriks ortamına 3 farklı derişim düzeyinde GRA eklenmiş ve her bir çözelti 3 kez analiz edilerek istatistiksel değerdendirmeleri yapılmıştır.

4.4.4.4. Duyarlılık

Yöntemin duyarlılığının belirlenebilmesi için kalibrasyon eğrisinin standart sapması ve eğimi kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır.

4.4.4.5. Kararlılık

Yöntemin kararlılık çalışması için $8,14 \times 10^{-8}$ M derişimde GRA'nın taze hazırlanmış, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat bekletilmiş ve alüminyum folyo ile sarılı halde -18°C 'de 1 ay bekletilmiş çözeltileri 3'er kez analiz edilerek sonuçlar karşılaştırılmıştır.

4.4.4.6. Sağlamlık

YPSK yönteminde sağlamlık parametresinin incelenmesi için optimizasyon parametreleri üzerinde küçük değışiklikler yapılmıştır. Tüm parametrelerin incelemesi sırasında $8,14 \times 10^{-8}$ M derişiminde GRA çözeltisi kullanılmıştır.

pH'ı 4,0 olarak belirlenen hareketli fazın pH'ı ± 0.05 birim değıştirilerek 3'er analiz gerçekleştirilmiştir.

30 mM olarak belirlenen hareketli fazdaki tampon derişimi ± 1 mM değıştirilerek 3'er kez çalışma gerçekleştirilmiştir.

Organik çözücü oranı %30 (h/h) olan hareketli fazın metanol oranı $\pm \%1$ değıştirilerek 3'er analiz yapılmıştır.

0,85 mL/dk olarak belirlenen akış hızı $\pm 0,5$ mL'dk değıştirilerek 3'er defa analiz gerçekleştirilmiştir.

4.5. Yöntemlerin Uygulanması

4.5.1. Tablet

Geliştirilen yöntemlerin GRA açısından uygulanabilirliğini göstermek amacıyla, GRA'nın farmasötik preparatlardan tablet formundan analizi gerçekleştirilmiştir. Bu

amaçla eczanelerden sağlanan ve 1 mg GRA içerdiği bilinen Kytril® (Roche, Türkiye) tabletleri analizi gerçekleştirilmiştir.

Analiz için 10 adet tabletin tartımı yapılmış ve ortalama tablet ağırlığı 103,76 mg bulunmuştur. Bu tabletler havanda toz edilerek, bir adet tabletin ağırlığına denk gelecek miktarın tartımı alınmıştır. Bu tartım 10 mg suda çözüldükten sonra vortekste ve 10 dk su banyosunda karıştırılmıştır. Daha sonra bu karışım 10 dk 4000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmından istenilen miktar alınarak, filtre edilip, gerekli seyreltmeler 1/10 oranında suyla seyreltilmiş çalışma tamponu ile yapılmıştır. GRA’nın son derişimi belirtilen doğrusal aralıkta olacak şekilde, üç farklı derişimde hesaplanarak hazırlanmıştır.

Elde edilen son derişimler sırasıyla KE yöntemi için $1,72 \times 10^{-6}$ M, $8,61 \times 10^{-7}$ M ve $5,74 \times 10^{-7}$ M, YPSK yöntemi için $1,94 \times 10^{-7}$ M, $7,74 \times 10^{-8}$ M ve $4,13 \times 10^{-8}$ M olacak şekilde yapılmıştır. Her derişime ait çözeltinin cihazlarda 3’er analizi gerçekleştirilmiştir ve PNO’ya göre istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır.

4.5.2. Ampul

Geliştirilen yöntemlerin GRA açısından uygulanabilirliğini göstermek amacıyla, GRA’nın farmasötik preparatlardan ampul formundan analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla eczanelerden sağlanan ve 3 mg GRA içerdiği bilinen Kytril® (Roche, Türkiye) ampullerin analizi gerçekleştirilmiştir.

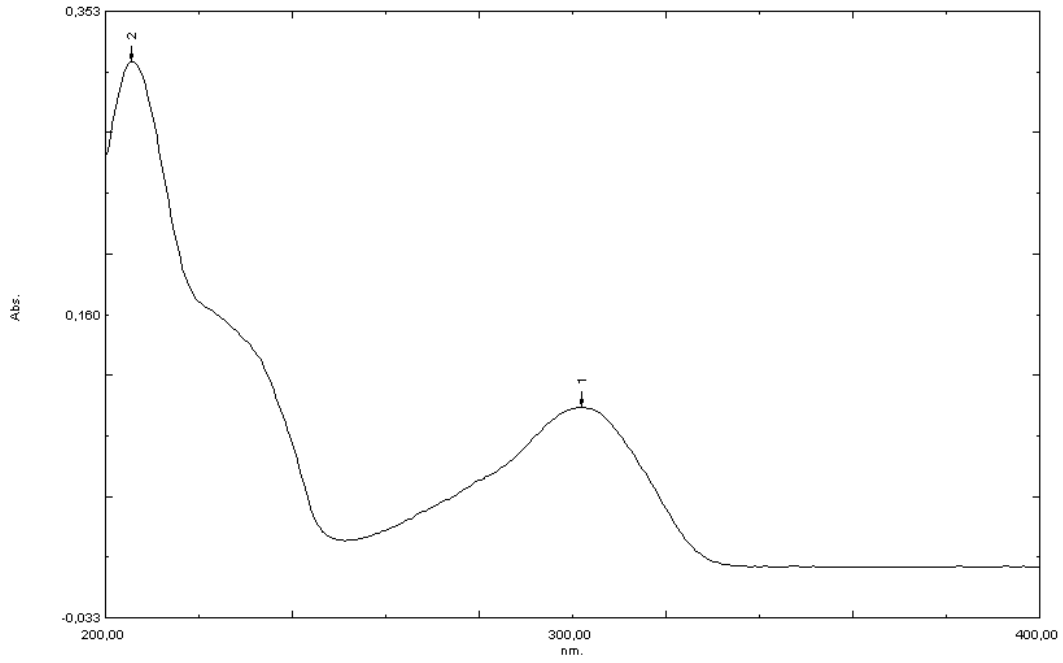
Analiz için ampul çözeltisi filtre edilmiştir. Bunun içerisinde istenilen miktarda madde alınarak gerekli seyreltmeler 1/10 oranında suyla seyreltilmiş çalışma tamponu ile gerçekleştirilmiştir. GRA’nın son derişimi belirtilen doğrusal aralıkta olacak şekilde, üç farklı derişimde hesaplanarak hazırlanmıştır.

Elde edilen son derişimler sırasıyla KE yöntemi için $1,44 \times 10^{-6}$ M, $9,60 \times 10^{-7}$ M ve $6,40 \times 10^{-7}$ M, YPSK yöntemi için $1,92 \times 10^{-7}$ M, $7,68 \times 10^{-8}$ M ve $4,61 \times 10^{-8}$ M olacak şekilde yapılmıştır. Her derişime ait çözeltinin cihazlarda 3’er analizi gerçekleştirilmiştir ve PNO’ya göre istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır.

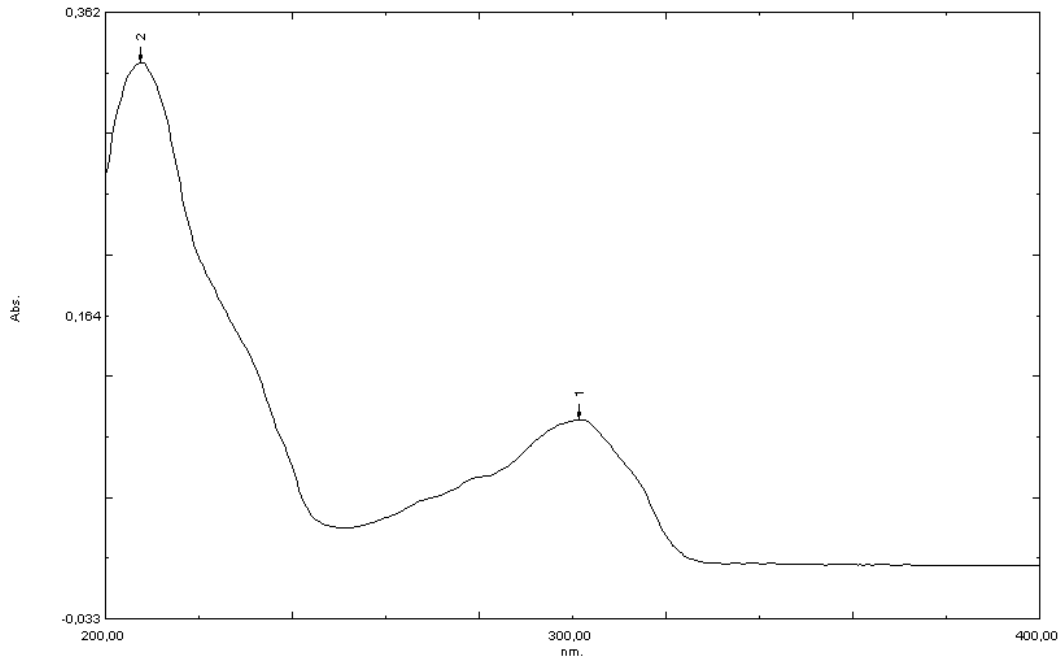
5. BULGULAR VE YORUM

5.1. UV Spektrofotometri

GRA'nın en yüksek absorbans verdiği dalga boyunun belirlenebilmesi için suda ve metanolde çözülmüş GRA'ya ait spektrumlar 200-400 nm'de kaydedilmiş ve bu spektrumlar sırasıyla Şekil 5.1. ve 5.2.'de sunulmuştur.



Şekil 5.1. Suda çözülmüş GRA'nın 200-400 nm arasında elde edilmiş spektrumu



Şekil 5.2. Metanolde çözülmüş GRA'nın 200-400 nm arasında elde edilmiş spektrumu

Bu çözücülerle elde edilen spektrumlarda gözlenen en yüksek absorbands değerleri ve dalga boyları Çizelge 5.1.'de verilmiştir.

Çizelge 5.1. GRA'nın UV spektrumunda gözlenen veriler

Çözücü	Dalga Boyu (nm)	Absorbans
Su	205.50	0.321
	302.50	0.101
Metanol	207.50	0.329
	301.50	0.096

Literatürde detektör olarak UV detektör veya DAD kullanan çalışmalarda genellikle 305 nm (Capacio, 1993; Sourı, 2011; Rao, 2012) veya bu dalga boyuna çok yakın dalga boyları (Chen, 2017; Maksic, 2016) ile deteksiyon sağlanmıştır. GRA analizinin yapıldığı iki çalışmada 240 nm (Hewala, 2011) ve 242 nm (Heda, 2011) kullanılmıştır fakat bu çalışmalarda GRA yanında başka maddelerin de analizleri yapıldığı için kullanılan dalga boyu burada gerçekleştirilen UV spektrofotometrik analiz

sonuçlarından farklıdır. Bu çalışmada 300 nm civarında gözlenen absorpsiyonlar oldukça düşük olduğu için ve çalışmada yalnız GRA'nın analizi hedeflendiği için kapiler elektroforetik deneylerde kullanılmak üzere 205.5 nm ve 207.5 nm çalışma dalga boyu olarak seçilmiştir.

5.2. Kapiler Elektroferez Yöntemi

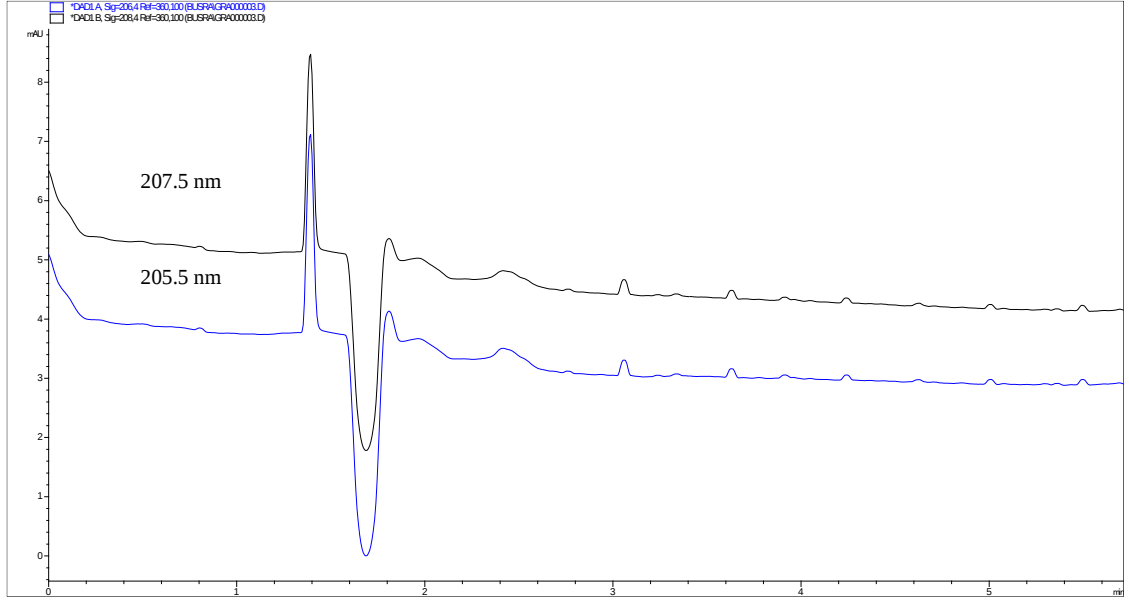
KE yönteminde deteksiyon DAD detektörün 205.5 nm ve 207.5 nm'lere ayarlanması ile sağlanmıştır. Ayrım için 75 µm iç çapa sahip 40 cm efektif ve 48,5 cm toplam uzunlukta kapiler kullanılmıştır. Kapiler sıcaklığı tüm çalışma boyunca 25°C'ta sabit tutulmuştur. Örneklerin hepsi cihazın kullanım kılavuzunda önerildiği şekilde 10 s süre ile 50 mbar basınç altında sisteme verilmiştir. Yöntemin optimizasyonu ve validasyonu sağlandıktan sonra geliştirilen yöntem GRA'nın farmasötik preparatlarına uygulanmıştır.

5.2.1. Optimizasyon

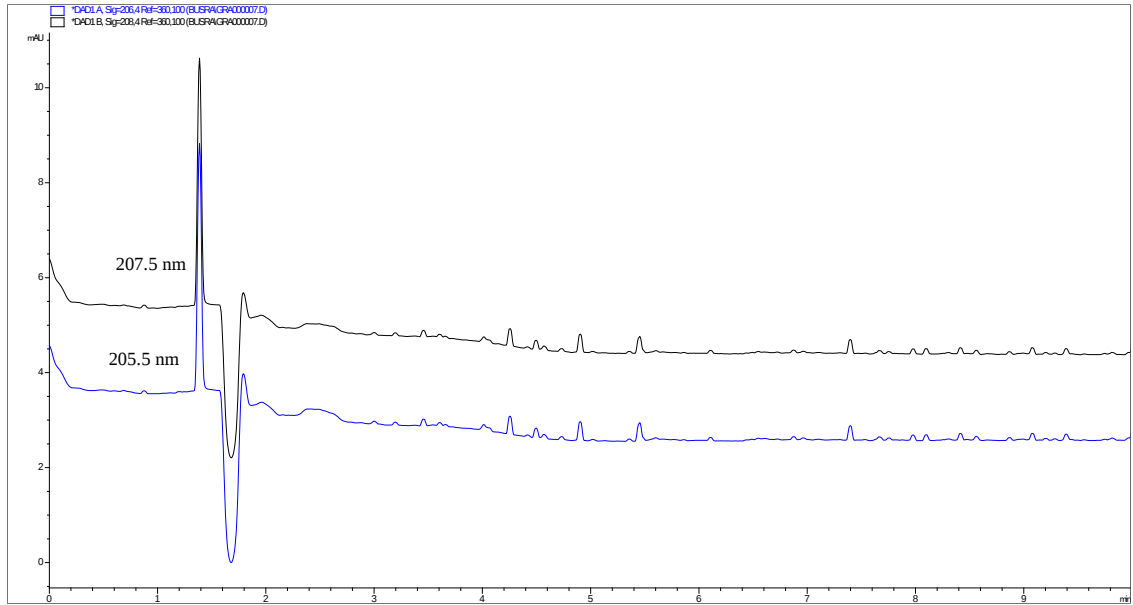
Optimum koşulların belirlenmesi amacıyla yöntemde tamponu derişimi, pH, çalışma tamponundaki organik çözücü oranı ve uygulanan potansiyel parametreleri incelenmiştir.

5.2.1.1. Tampon derişimi

GRA'nın analizi için öncelikle borat tamponu hazırlanarak bazik ortamdaki davranışı incelenmiştir. Bu amaçla 10 mM borat tamponu (pH 9,00) ile 25 kV potansiyel altında GRA analiz edilmiştir. Şekil 5.3. ve 5.4.'te sırasıyla su ve metanolde çözülmüş GRA'nın (10^{-6} M düzeyinde) 205.5 nm ve 207.5 nm'de elde edilen elektroferogramları verilmiştir.



Şekil 5.3. Suda çözülmüş GRA'nın 205.5 ve 207.5 nm'de elde edilmiş elektroferogramları

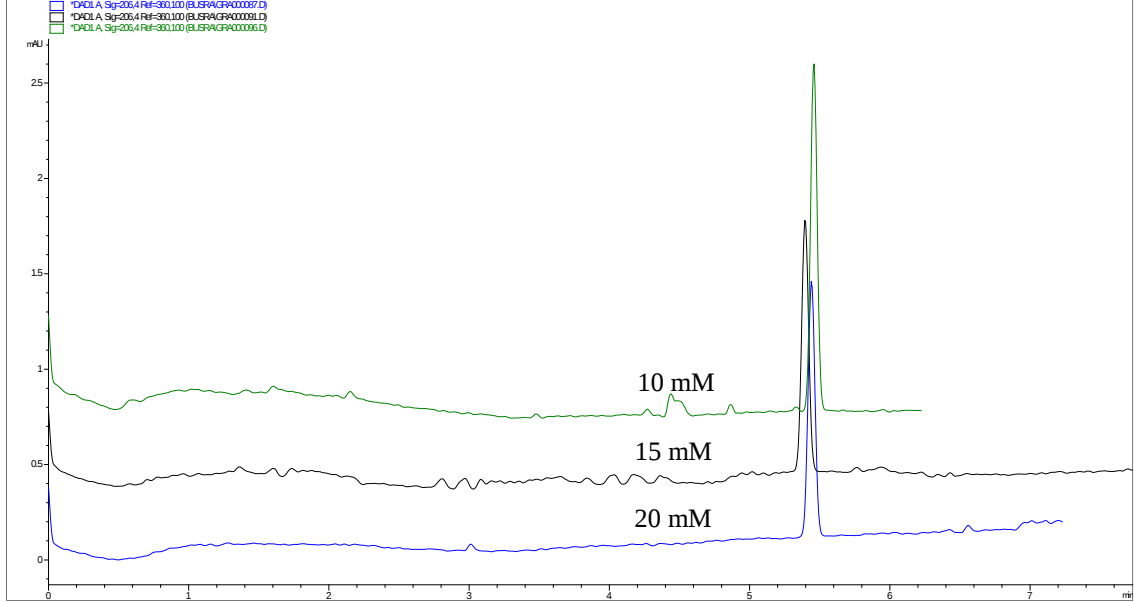


Şekil 5.4. Metanolde çözülmüş GRA'nın 205.5 ve 207.5 nm'de elde edilmiş elektroferogramları

GRA bazik özellikte bir bileşiktir ve literatürde pKa değerleri 9.0 (http-5; Maksic, 2016) veya 10.5 (http-6) olarak bildirilmiştir. Bu analizler sonucunda da beklenildiği gibi bazik özelliğe sahip olan GRA, elektroozmozdan önce gelmiştir.

GRA'nın tamamen iyonize olmasını sağlamak amacı ile asidik bir tamponla çalışmanın uygun olacağı öngörülmüştür. Bu amaçla pKa₁ değeri 2.12 olan fosfat tamponu seçilmiştir. Uygun tampon derişimini belirlemek için 10 mM, 15 mM ve 20 mM derişimde 3 ayrı fosfat tamponu (pH 3,00) hazırlanmış ve GRA bu çalışma

tamponları ile 3'er kez analiz edilmiştir. Şekil 5.5.'te bu analizlere ait elektroferogramlar görülmektedir.

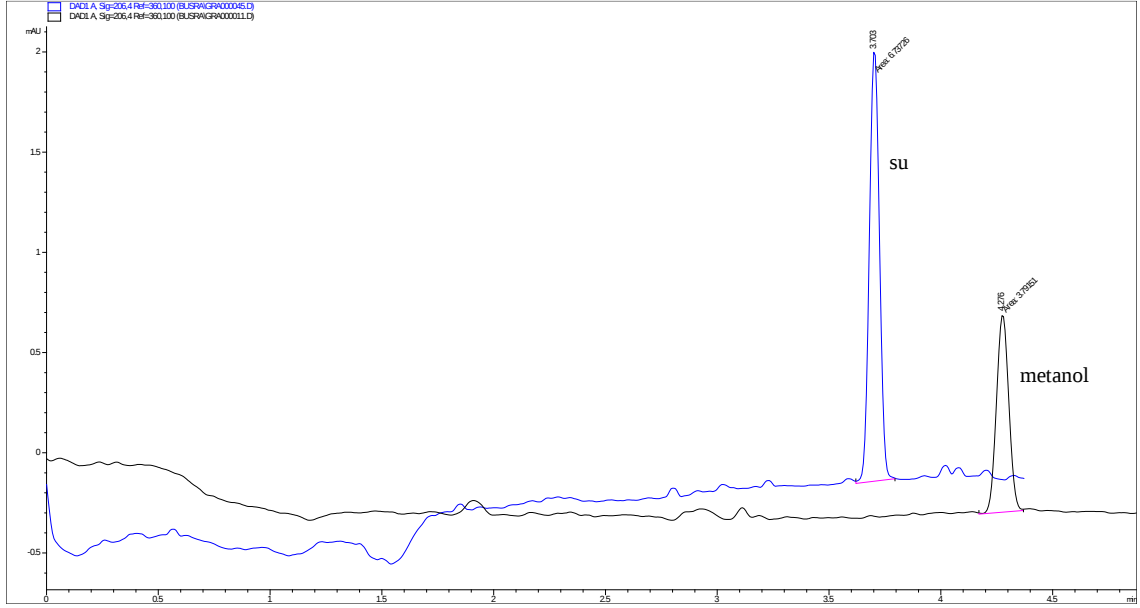


Şekil 5.5. Çalışma tamponu derişimi incelemesi

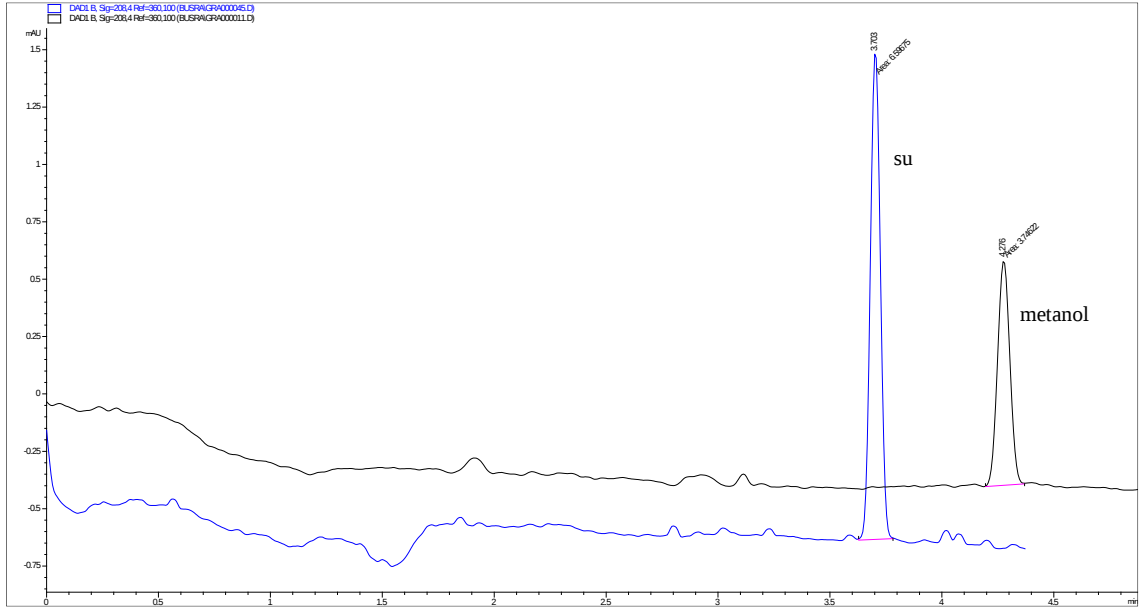
Şekil 5.5.'ten de görüldüğü gibi tampon derişimindeki değişiklik, göç zamanlarını önemli miktarda etkilememiştir. Bu durum düşük pH'larda elektroozmotik akışın azalması ile ilgilidir. Tampon derişimi incelemesi sonucunda en düşük derişim olan 10 mM fosfat tamponunun kullanılmasına karar verilmiştir.

5.2.1.2. Çözücü ve dalga boyu

Bu aşamaya kadar olan tüm analizlerde GRA'nın çözücüsü ve deteksiyonun sağlanacağı dalga boyu araştırılmıştır. Ayrımın sağlanacağı tampon ve derişime karar verdikten sonra kullanılan dalga boylarına göre farklı çözücülerde elde edilen analiz sonuçları karşılaştırılmıştır. Şekil 5.6.'da 205.5 nm'de suda ve metanolde çözülen GRA'ya ait pikler verilmiştir. Şekil 5.7.'de ise 207.5 nm'de suda ve metanolde çözülen GRA'ya ait elektroferogramlar verilmiştir.



Şekil 5.6. 205.5 nm 'de suda ve metanolde çözülmüş GRA 'ya ait elektroferogramlar

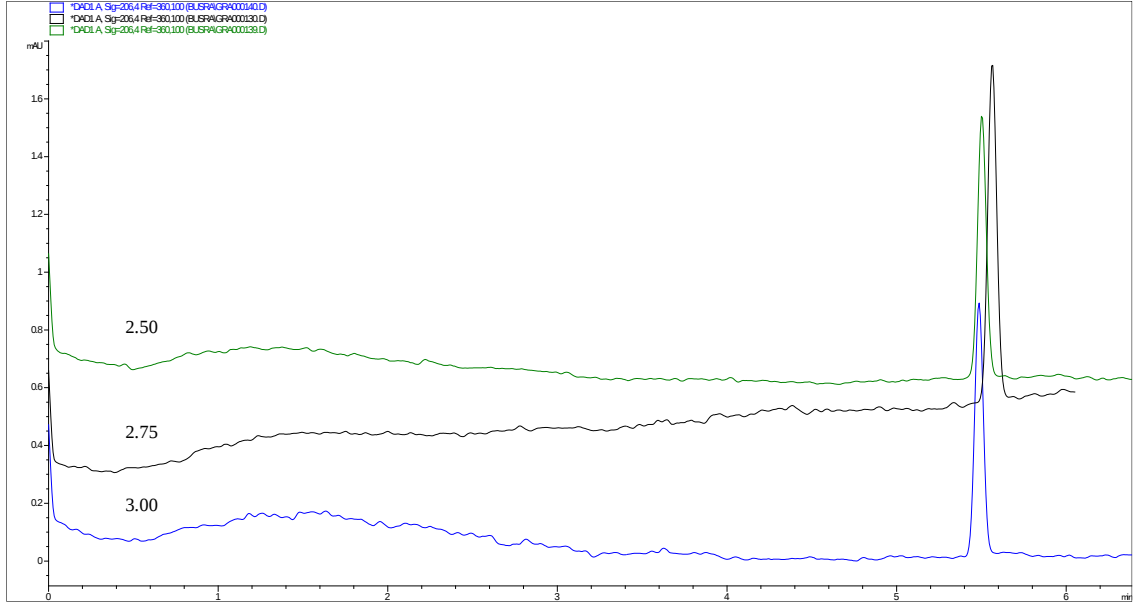


Şekil 5.7. 207.5 nm 'de suda ve metanolde çözülmüş GRA 'ya ait elektroferogramlar

Şekil 5.6. ve 5.7.'den görüldüğü üzere her iki dalga boyunda da suda çözülen GRA'ya ait piklerin göç zamanları erken, pik alanları büyük ve pik morfolojileri daha düzgündür. Bu nedenle çalışmanın geri kalan kısmında GRA'nın yalnız suda çözülmüş çözeltilerinin kullanılmasına ve sudaki en yüksek absorbans verdiği dalga boyu olan 205.5 nm ile deteksiyonun sağlanmasına karar verilmiştir.

5.2.1.3. pH

Çalışma tamponu pH'sının, GRA'nın elektroforetik davranışı üzerine etkisini incelemek amacı ile pH'ı 2,50, 2,75 ve 3,00 olan 10 mM fosfat tamponu hazırlanmıştır. Bu 3 farklı tamponun KE'de 3'er defa analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 5.8.'de bu analizlere ait elektroferogramlar verilmiştir.

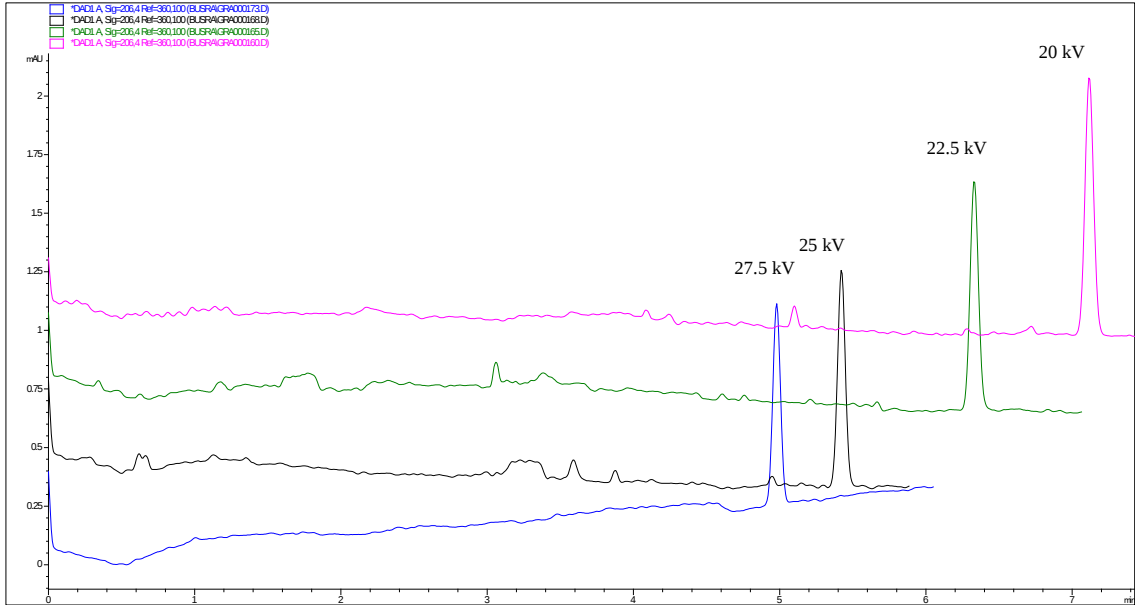


Şekil 5.8. Çalışma tamponu pH'nın incelenmesi

Yapılan tekrarlı analizler sonucunda tüm pH'larda elde edilen piklerin kabul edilebilir düzeyde olduğu gözlenmiştir. Pik morfolojileri ve göç zamanları açısından çalışılacak tamponun pH'sının 2,75 olmasına karar verilmiştir.

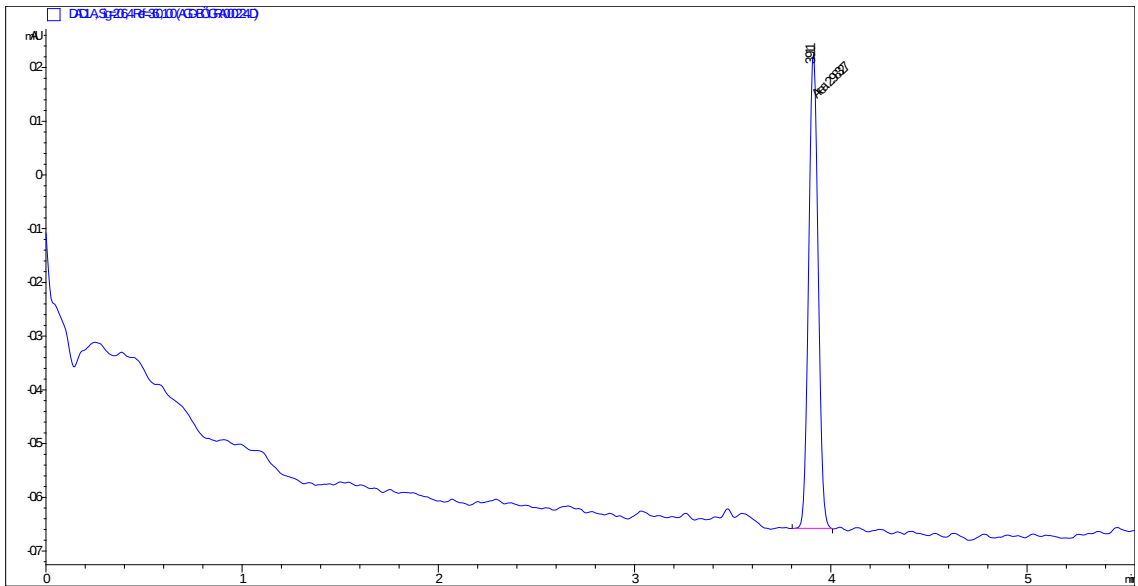
5.2.1.4. Uygulanan potansiyel

Aletsel parametrelerden olan uygulanan potansiyelin optimizasyonu için GRA'nın 27.5 kV, 25 kV, 22.5 kV ve 20 kV potansiyel altında 3'er kez analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 5.9.'da bu analizlere ait elektroferogramlar verilmiştir.



Şekil 5.9. Uygulanan potansiyelin incelenmesi

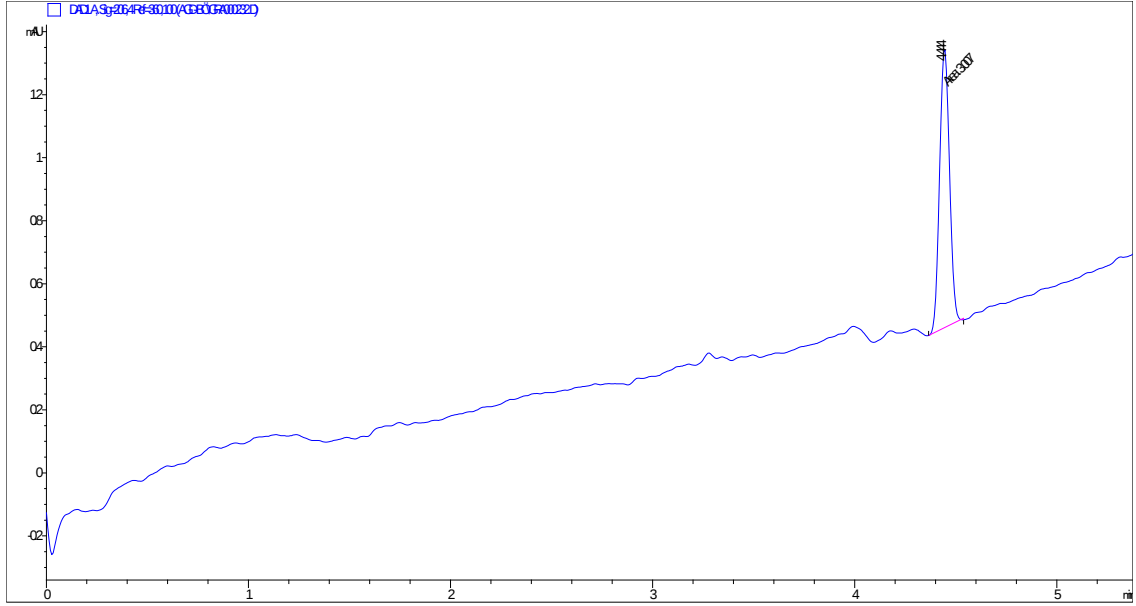
KE’de mümkün olan en yüksek potansiyelin uygulanması ile en kısa sürede ayrımlar sağlanabilir. Yapılan analizlerde de en kısa analiz süresi 27.5 kV potansiyel altında elde edildiği için çalışma potansiyeli olarak 27.5 kV’a karar verilmiştir. İncelenen parametreler sonucunda GRA’nın 10 mM fosfat tamponu (pH 2,75) ve 27.5 kV potansiyel altında analiz edilmesi ile en uygun koşulların sağlandığı görülmüş ve Şekil 5.10.’da bu koşullarda analizi gerçekleştiren GRA’ya ait elektroferogram sunulmuştur.



Şekil 5.10. Optimum koşullar altında analizi gerçekleştirilen GRA’ya ait elektroferogram

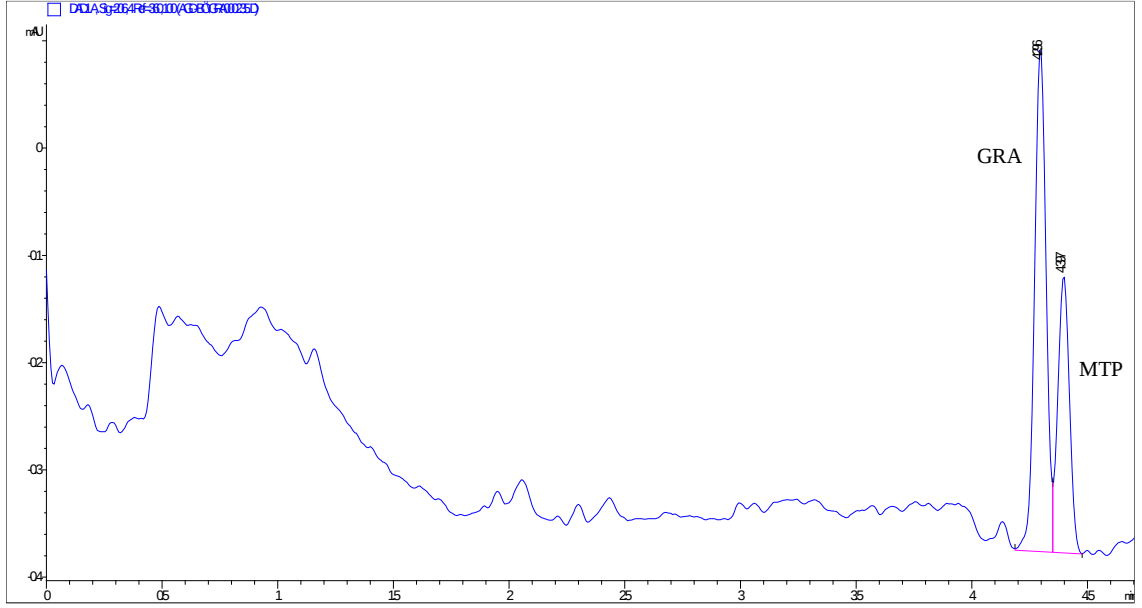
5.2.1.5. İç standart

Çalışmanın optimum koşulları belirlendikten sonra yöntemin güvenilirliğini arttırmak amacı ile bir IS araştırılmıştır. İncelenen maddeler arasında en uygun göç zamanı ve pik morfolojisine MTP'nin sahip olduğu görülmüştür. Şekil 5.11.'de GRA için uygun olan koşullarda analiz edilen MTP'ye ait elektroferogram görülmektedir.



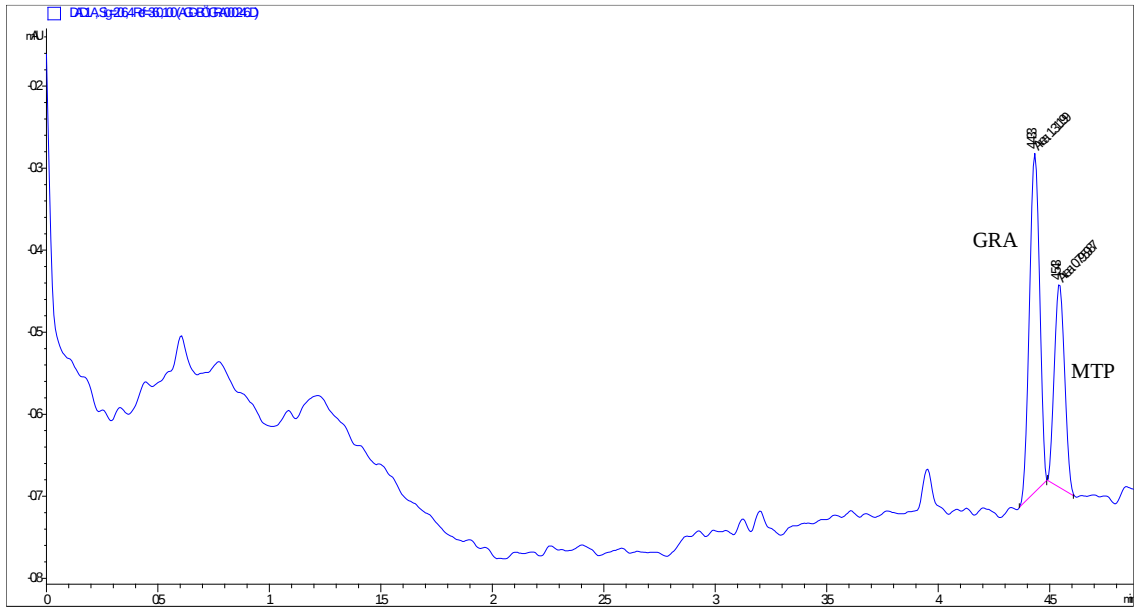
Şekil 5.11. Optimum koşullar altında analizi gerçekleştirilen MTP'ye ait elektroferogram

Bu şekilde IS'ye ait pik gözlemlendikten sonra IS'nin GRA ile bir karışımı hazırlanmış (her ikisi de 10^{-6} M düzeyinde) ve optimum koşullarda analiz edilmiştir. Şekil 5.12'de bu analize ait elektroferogram verilmiştir.



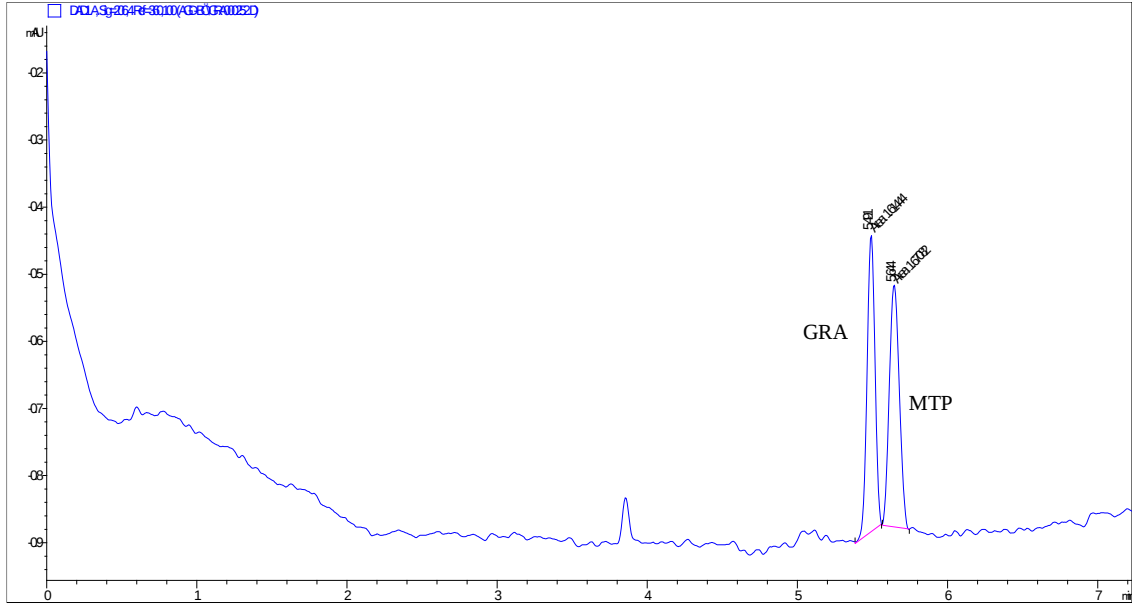
Şekil 5.12. Optimum koşullar altında GRA ve MTP'ye ait elektroferogram

Şekil 5.12.'den de görüldüğü gibi GRA için belirlenen optimum analiz koşullarında IS ve GRA'nın yeterli ayrımı sağlanamamıştır. Maddelerinin ayrımını sağlamak amacı ile tampon derişiminin arttırılması öngörölmüştür. Bu amaçla 15 mM derişimde fosfat tamponu (pH 2,75) hazırlanarak 27.5 kV potansiyel altında GRA ve IS analiz edilmiştir. Bu analizlerden birine ait elektroferogram Şekil 5.13.'te sunulmuştur.



Şekil 5.13. 15 mM fosfat tamponu (pH 2,75) ve 27.5 kV potansiyel altında GRA ve MTP'ye ait elektroferogram

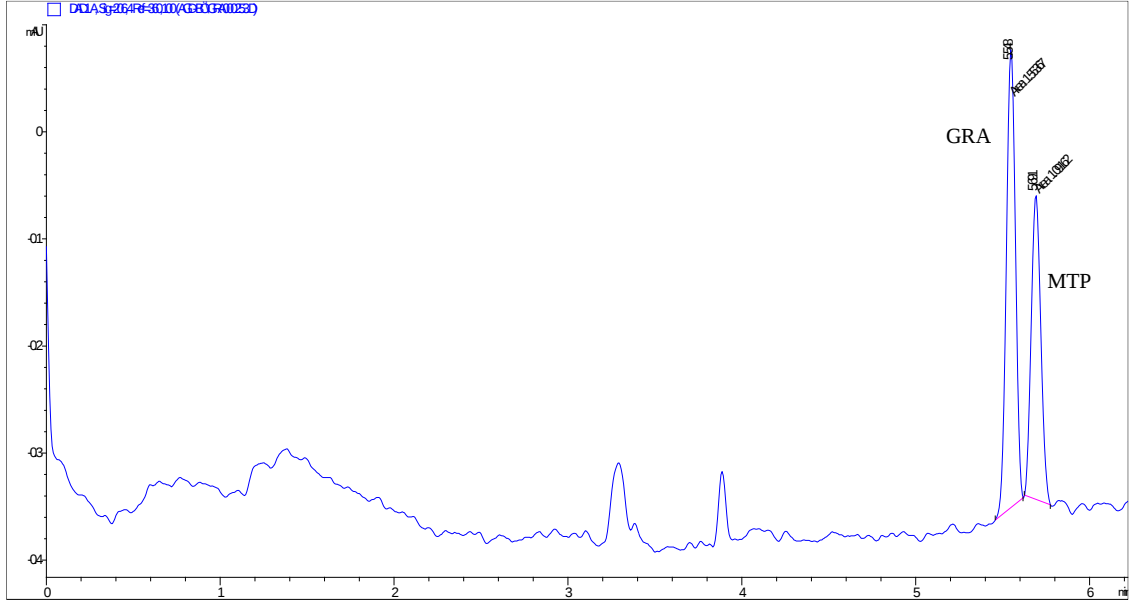
15 mM fosfat derişimi ile de istenen ayırım sağlanamamıştır. Bu durumda uygulanan potansiyelin düşürülmesi ile piklerin birbirinden ayrılacağı öngörülmüştür. Bu amaçla 15 mM fosfat tamponu (pH 2,75) ile 25.0 kV potansiyel altında GRA ve IS analiz edilmiştir. Şekil 5.14'te bu analizlerden birine ait elektroferogram verilmiştir.



Şekil 5.14. 15 mM fosfat tamponu (pH 2,75 ve 25.0 kV potansiyel altında GRA ve MTP'ye ait elektroferogram

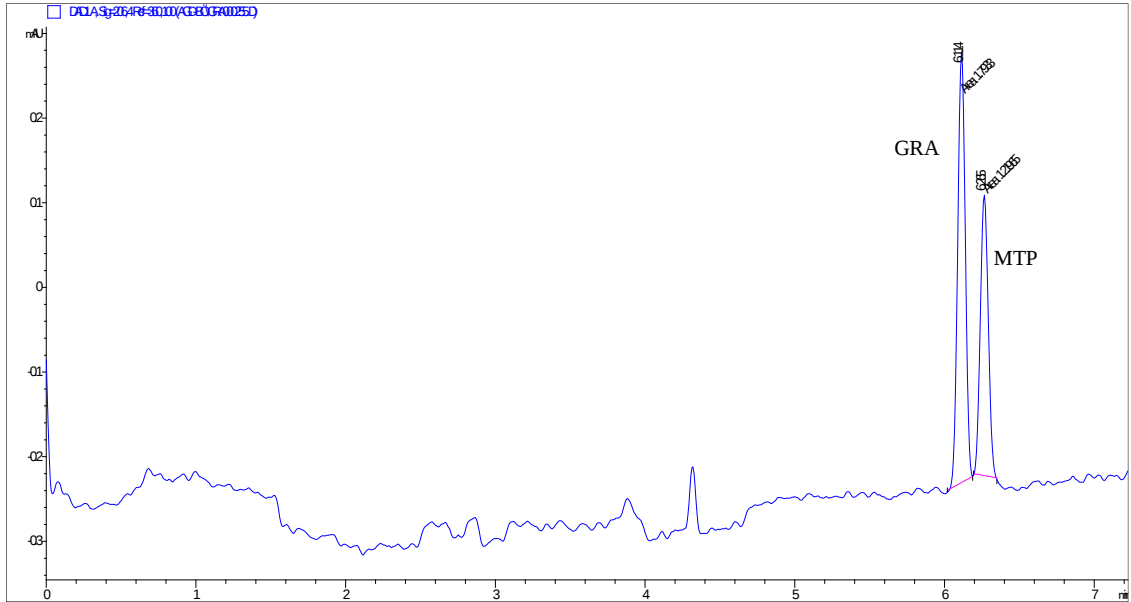
Bu analizde göç zamanlarının artması ile pikler bir miktar daha birbirinden ayrılmış fakat yine de yeterli ayırım sağlanamamıştır.

Ayrımı iyileştirmek ve gerekli R_s değerine ulaşabilmek için uygulanan potansiyel 22.5 kV'a düşürülerek GRA ve IS tekrar analiz edilmiştir. Şekil 5.15.'te bu analizlerden birine ait elektroferogram verilmiştir.



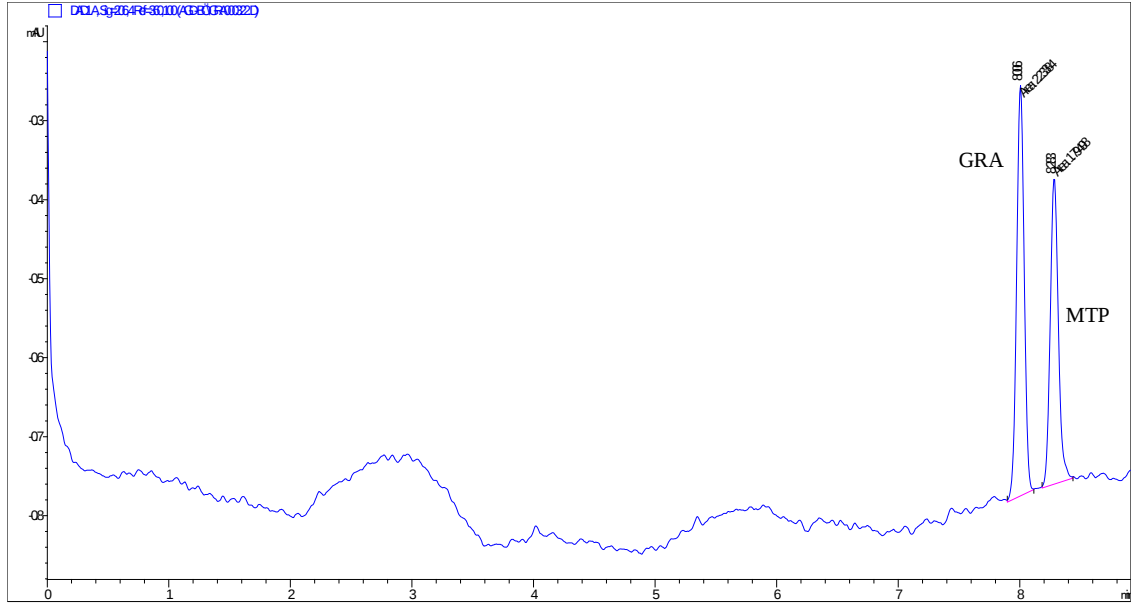
Şekil 5.15. 15 mM fosfat tamponu (pH 2,75) ve 22.5 kV potansiyel altında GRA ve MTP'ye ait elektroferogram

Bu analiz sonucunda da hesaplanan Rs değeri 1,5'un altında kalmıştır. Bu nedenle uygulanan potansiyelin 20.0 kV'a düşürülerek analizin tekrarlanması öngörülmüştür. Şekil 5.16.'de bu analizlerden birine ait elektroferogram sunulmuştur.



Şekil 5.16. 15 mM fosfat tamponu (pH 2,75) ve 20.0 kV potansiyel altında GRA ve MTP'ye ait elektroferogram

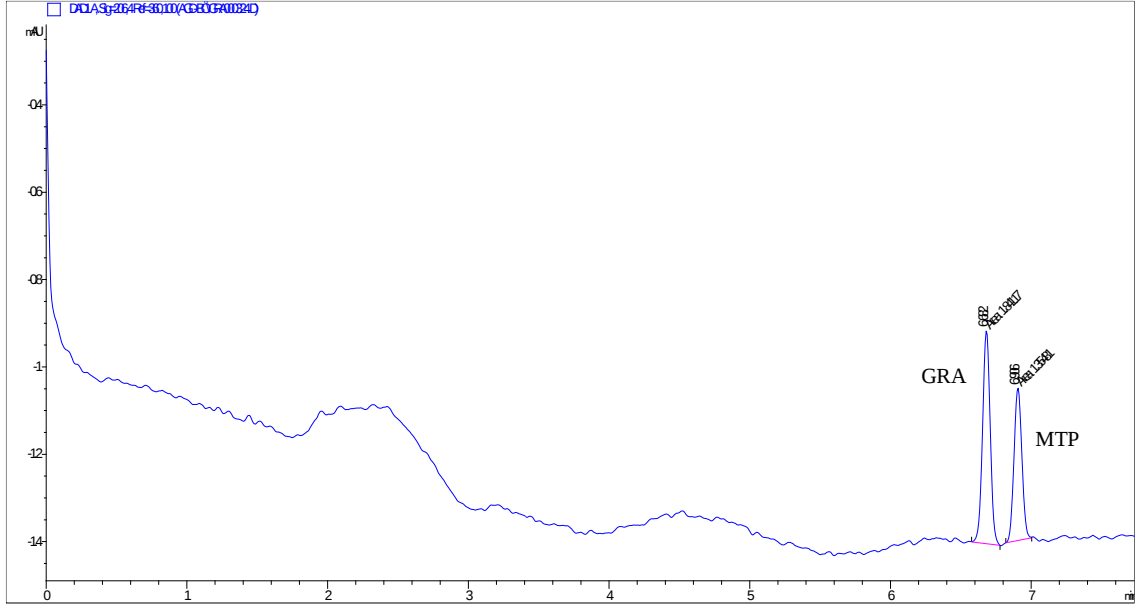
Bu analiz sonucunda hesaplanan R_s değeri (1,54) ile yeterli ayırım sağlanmış olsa da yüksek derişimdeki GRA analizlerinde bu R_s değerinin düşebileceğı düşünülerek ayırımın biraz daha iyileştirilmesi gerektiğı öngörölmüştür. Bu amaçla 20 mM fosfat tamponu (pH 2,75) hazırlanarak analiz 20 kV potansiyel altında tekrarlanmıştır. Şekil 5.17.'de bu analizlerden birine ait elektroferogram sunulmuştur.



Şekil 5.17. 20 mM fosfat tamponu (pH 2,75) ve 20.0 kV potansiyel altında GRA ve MTP'ye ait elektroferogram

Bu analiz sonucunda yapılan hesaplamalarda R_s değerinin 2.40 olduğu bulunmuştur. Fakat Şekil 5.17.'den de göröldüğü gibi analiz süresi daha önceki analizlere göre çok artmıştır.

Analiz süresini biraz kısaltabilmek amacı ile uygulanan potansiyelin 22.5 kV'a yükseltilmesi öngörölmüştür. 20 mM fosfat tamponu (pH 2,75) ile 22.5 kV altında analiz edilen GRA ve IS'ye ait elektroferogram Şekil 5.18.'de sunulmuştur.

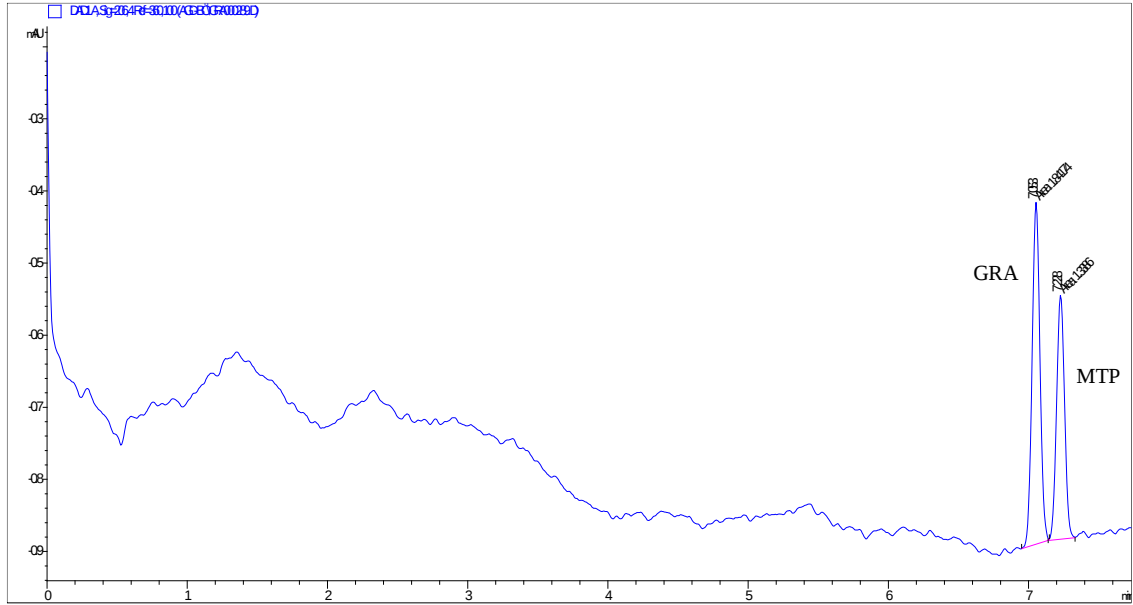


Şekil 5.18. 20 mM fosfat tamponu (pH 2,75) ve 22.5 kV potansiyel altında GRA ve MTP'ye ait elektroferogram

Analiz sonucunda öngörüldüğü şekilde analiz süresi kısalmış ve hesaplanan Rs değeri 2.25 düzeyinde bulunmuştur.

5.2.1.6. Organik çözücü

Çalışma tamponunda organik çözücü bulunmasının ayırma katkısını araştırmak amacı ile %10 (h/h) oranında metanol içeren 20 mM fosfat tamponu (pH 2,75) hazırlanmıştır. Bu tampon ile 22.5 kV potansiyel altında analiz edilen GRA ve IS'ye ait elektroferogram Şekil 5.19.'da sunulmuştur.



Şekil 5.19. %10 metanol içeren 20 mM fosfat tamponu (pH 2,75) ve 22.5 kV potansiyel altında GRA ve MTP'ye ait elektroferogram

Çalışma tamponunda organik çözücü bulunmasına katkı sağlamadığı aksine analiz süresini uzattığı gözlenmiştir. Bu nedenle çalışma tamponunda organik çözücü bulunmamasına karar verilmiştir.

Böylelikle KE yönteminin optimum ayırma koşulları 20 mM fosfat tamponu (pH 2,75) ile 22.5 kV potansiyel altında örneklerin analiz edilmesi şeklinde bulunmuştur. Bu koşullar altında GRA ve MTP için elektroforetik hareketlilik sırasıyla $2,14 \times 10^{-4}$ ve $2,07 \times 10^{-4}$ cm²/Vs olarak hesaplanmıştır.

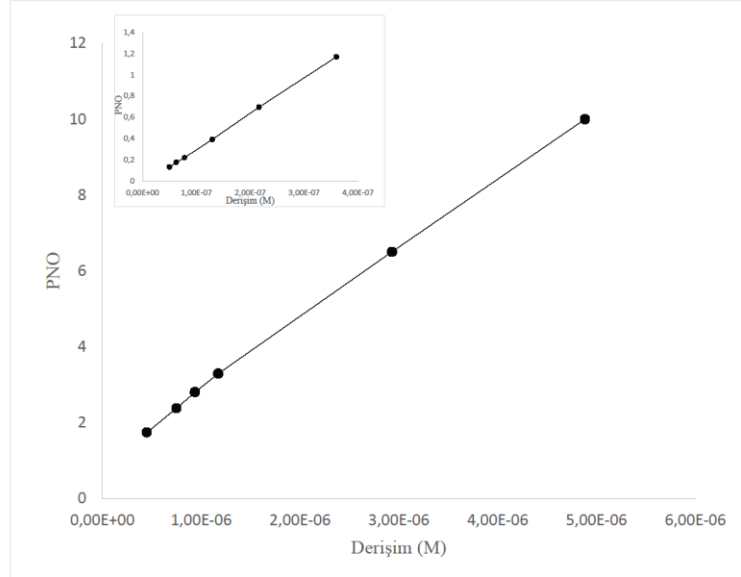
5.2.2. Validasyon

Optimum koşullar belirlendikten sonra geliştirilen yöntemin geçerliliğinin gösterilmesi amacıyla yöntemin doğrusalılık, kesinlik, doğruluk, duyarlılık, kararlılık, spesifiklik ve sağlamlık parametreleri incelenmiştir. Yöntemin sistem uygunluğunu göstermek amacı ile N, Rs, As ve %BSS parametreleri hesaplanmıştır.

5.2.2.1. Doğrusallık

Yöntemin doğrusallığının incelenmesi amacıyla $2,99 \times 10^{-8}$ ve $4,88 \times 10^{-6}$ M aralığında GRA'nın 13 farklı derişimi incelenmiştir. PNO kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda yöntemin $4,98 \times 10^{-8}$ - $4,88 \times 10^{-6}$ M aralığında doğrusal olduğu

ve $y = 3793087x - 0,287$ eşitliğine sahip yüksek korelasyonlu ($r = 0,9968$) bir doğru elde edilmiştir. Şekil 5.20.'de yöntemin doğrusal aralığını gösteren doğru sunulmuştur.



Şekil 5.20. KE yöntemi ile GRA'nın doğrusal olduğu aralığın grafiksel gösterimi

Yöntemin doğrusal olduğu aralıktan hareketle 4.50×10^{-7} - 1.75×10^{-6} M derişim aralığında kalibrasyon setleri hazırlanmıştır. Bu aralıktaki 6 derişimin gün içi ve günler arası analizleri sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmeleri Çizelge 5.2.'de verilmiştir.

Çizelge 5.2. GRA'nın kapiler elektroforez yöntemi ile kalibrasyon verileri

	Günler arası			Tüm Günler (n=18)
	Gün I (n=6)	Gün II (n=6)	Gün III (n=6)	
a	3485951	3219656	3607476	3437694
b	-0,06	0,14	-1,704	-0,11
r	0,9989	0,9987	0,9963	0,9964

a: Eğim, b: Kesim, r: Korelasyon katsayısı

Çizelge 5.2.'den de görüldüğü gibi hem gün içi hem de günler arası yapılan istatistiksel değerlendirmelerde yüksek korelasyon katsayısına sahip doğrular elde edilmiştir.

5.2.2.2. Kesinlik

Kesinlik çalışması için hazırlanan $7,03 \times 10^{-7}$ M GRA ve $6,18 \times 10^{-7}$ M MTP derişimlerinin 3 ardışık günde 6'şar analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirmeleri Çizelge 5.3.'te sunulmuştur.

Çizelge 5.3. GRA'nın kapiler elektroforez yöntemi ile kesinlik verileri

	Günler arası			Tüm Günler (n=18)
	Gün I (n=6)	Gün II (n=6)	Gün III (n=6)	
Ort	2,316	2,326	2,294	2312
ss	0,029	0,042	0,044	0,039
%BSS	1,29	1,83	1,92	1,70
GA (%95)	$\pm 0,14$	$\pm 0,21$	$\pm 0,22$	$\pm 0,29$

Ort: Ortalama, ss: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma, GA (%95): %95 olasılıkla güven aralığı

Değerlendirmeler sonucunda tüm %BSS değerlerinin %2'nin altında bulunmuş olması geliştirilen yöntemin kesinliğinin bir göstergesidir.

5.2.2.3. Duyarlılık

Yöntemin duyarlılığının belirlenebilmesi için kalibrasyon eğrisinin eğimi ve ss'ı kullanılmıştır. GRA için yöntemin gözlenebilme sınırı $1,30 \times 10^{-7}$ M (45,0 ng/mL) ve tayin sınırı $4,30 \times 10^{-7}$ M (150,2 ng/mL) olarak hesaplanmıştır.

5.2.2.4. Doğruluk

Doğruluk analizi için $4,50 \times 10^{-7}$, $8,79 \times 10^{-7}$ ve $1,75 \times 10^{-6}$ M derişimlerde GRA ve IS çözeltileri hazırlanmış gün içi ve günler arası olmak üzere 18'er kez analizi gerçekleştirilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 5.4.'te sunulmuştur.

Çizelge 5.4. GRA'nın kapiler elektroforez yöntemi ile doğruluk verileri

I. gün (n=6)	Eklenen (M)	$4,50 \times 10^{-7}$	$8,79 \times 10^{-7}$	$1,75 \times 10^{-6}$
	Bulunan (Ort $\pm$ ss)	$4,57 \times 10^{-7} \pm 8,62 \times 10^{-9}$	$8,62 \times 10^{-7} \pm 9,64 \times 10^{-9}$	$1,74 \times 10^{-6} \pm 1,55 \times 10^{-8}$
	% Geri Kazanım	101,67	98,12	99,08
	% BH	1,67	-1,87	-0,91
	% BSS	1,88	1,11	0,89

Çizelge 5.4.(Devam) GRA'nın kapiler elektroforez yöntemi ile doğruluk verileri

II. gün (n=6)	Eklenen (M)	$4,50 \times 10^{-7}$	$8,79 \times 10^{-7}$	$1,75 \times 10^{-6}$
	Bulunan (Ort±ss)	$4,67 \times 10^{-7} \pm 3,78 \times 10^{-9}$	$8,67 \times 10^{-7} \pm 1,37 \times 10^{-8}$	$1,72 \times 10^{-6} \pm 1,90 \times 10^{-8}$
	% Geri Kazanım	103,88	98,65	98,53
	% BH	3,88	-1,34	-1,46
	% BSS	0,81	1,58	1,10
III. gün (n=6)	Eklenen (M)	$4,50 \times 10^{-7}$	$8,79 \times 10^{-7}$	$1,75 \times 10^{-6}$
	Bulunan (Ort±ss)	$4,66 \times 10^{-7} \pm 7,90 \times 10^{-9}$	$8,80 \times 10^{-7} \pm 1,60 \times 10^{-8}$	$1,75 \times 10^{-6} \pm 3,30 \times 10^{-8}$
	% Geri Kazanım	103,77	100,14	100,22
	% BH	3,77	0,14	0,22
	% BSS	1,69	1,82	1,88
Tüm günler (n=18)	Eklenen (M)	$4,50 \times 10^{-7}$	$8,79 \times 10^{-7}$	$1,75 \times 10^{-6}$
	Bulunan (Ort±ss)	$4,63 \times 10^{-7} \pm 8,31 \times 10^{-9}$	$8,70 \times 10^{-7} \pm 1,47 \times 10^{-8}$	$1,73 \times 10^{-6} \pm 2,56 \times 10^{-8}$
	% Geri Kazanım	103,06	98,97	99,28
	% BH	3,06	-1,02	-0,71
	% BSS	1,79	1,69	1,47

n: Deney sayısı, Ort: Ortalama, ss: Standart sapma, BH: Bağlı hata, BSS: Bağlı standart sapma

Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda %geri kazanım değerlerinin tüm derişim düzeyleri için %98,12 ile %103,88 aralığında bulunduğu ve %BSS değerlerinin %2'nin altında olduğu gözlenmiştir. Bu değerler ile geliştirilen yöntemin iyi bir kesinlik ve doğruluğa sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Yöntemin matriks ortamlarındaki doğruluğunun araştırılması amacı ile tablet ve ampul matrikslerine 3 farklı derişim düzeyinde GRA eklenerek analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizler sonucunda yapılan istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 5.5. ve 5.6.'da sunulmuştur.

Çizelge 5.5. Tablet matriks ortamına eklenen GRA'nın kapiler elektroforez yöntemi ile doğruluk verileri

Eklenen (M) (n=3)	$6,71 \times 10^{-7}$	$8,38 \times 10^{-7}$	$1,05 \times 10^{-6}$
Bulunan (Ort±ss)	$6,62 \times 10^{-7} \pm 3,7 \times 10^{-9}$	$8,8 \times 10^{-7} \pm 2,4 \times 10^{-9}$	$1,04 \times 10^{-6} \pm 1,8 \times 10^{-8}$
% Geri Kazanım	98,91	100,07	99,78
% BH	-1,08	0,07	-0,21
% BSS	0,55	0,28	1,80

Ort: Ortalama, ss: Standart sapma, % BSS: % Bağlı standart sapma, BH: Bağlı hata

Çizelge 5.6. Ampul matriks ortamına eklenen GRA'nın kapiler elektroforez yöntemi ile doğruluk verileri

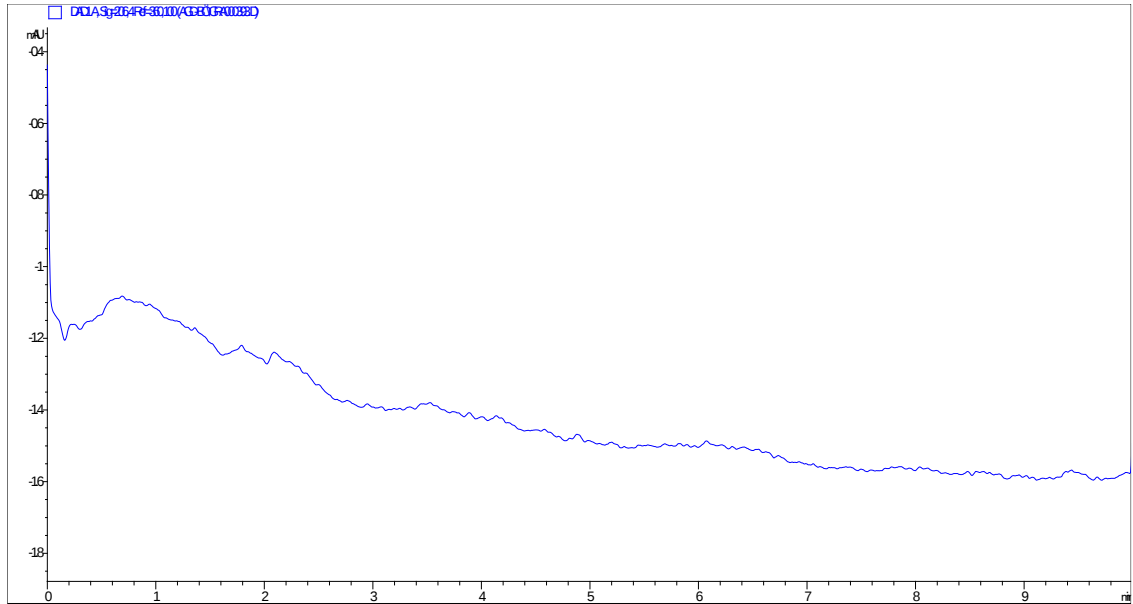
Eklenen (M) (n=3)	$6,71 \times 10^{-7}$	$8,38 \times 10^{-7}$	$1,05 \times 10^{-6}$
Bulunan (Ort$\pm$ss)	$6,63 \times 10^{-7} \pm 9,4 \times 10^{-9}$	$8,4 \times 10^{-7} \pm 5,47 \times 10^{-9}$	$1,06 \times 10^{-6} \pm 4,28 \times 10^{-9}$
% Geri Kazanım	98,86	100,34	101,73
% BH	-1,14	0,34	1,73
% BSS	1,42	0,65	0,40

Ort: Ortalama, ss: Standart sapma, % BSS: % Bağıl standart sapma, BH: Bağıl hata

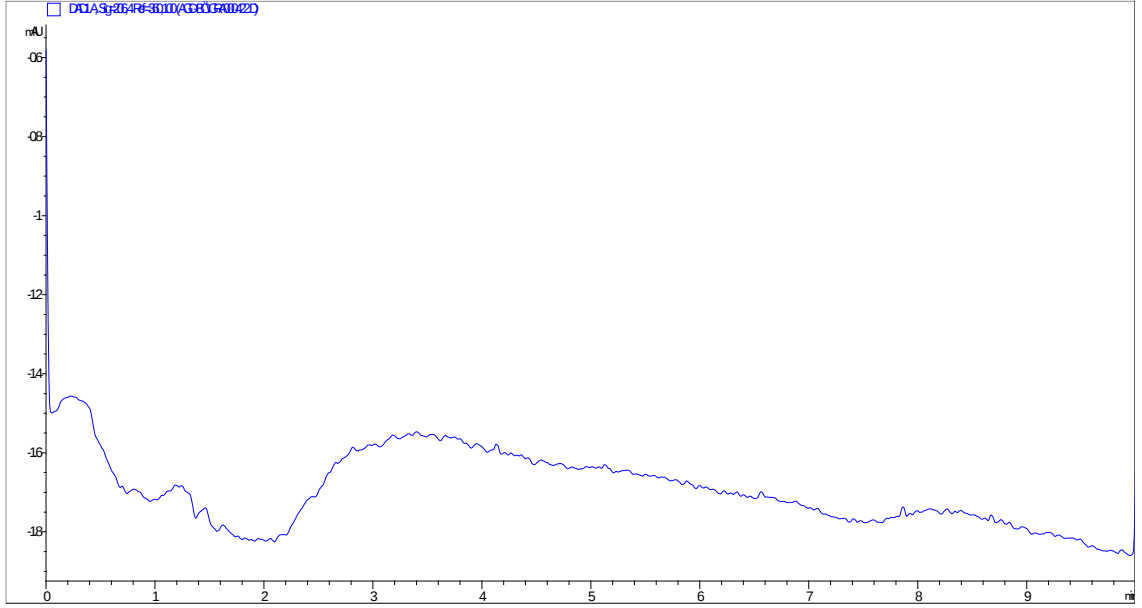
Çizelge 5.5. ve 5.6.'dan görüldüğü gibi her iki matriks ortamında da %geri kazanım değerleri %100 düzeyinde ve %BSS değerleri %2'nin altında bulunmuştur. Bu veriler ile geliştirilen yöntemin bu matriks ortamlarında da iyi bir doğruluk ve kesinliğe sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

5.2.2.5. Spesifiklik

Yöntemin spesifikliğinin gösterilmesi amacı ile yöntemin uygulanacağı tablet ve ampul formlarının matriks ortamları analiz edilmiştir. Şekil 5.21. ve 5.22.'de sırasıyla tablet ve ampul matrikslerine ait elektroferogramlar görülmektedir.



Şekil 5.21. Tablet matriks ortamına ait elektroferogram



Şekil 5.22. Ampul matris ortamına ait elektroferogram

Elde edilen elektroferogramlardan matris ortamlarının GRA analizini etkileyen herhangi bir girişime neden olmadığı görülmüştür.

5.2.2.6. Kararlılık

Yöntemin kararlılık çalışması için -18°C 'de karanlıkta 1 ay bekletilmiş ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de karanlıkta 24 saat bekletilmiş GRA çözeltileri analiz edilerek sonuçlar taze hazırlanmış GRA çözeltilerinin sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 5.7.'de verilmiştir.

Çizelge 5.7. GRA'nın kapiler elektroforez yöntemi ile kararlılık verileri

	Taze çözelti	24 saat	1 ay
Ort (n=3)	2,829	2,747	5,881
ss	0,022	0,026	0,080
% BSS	0,79	0,95	1,36
% Geri kazanım	102,16	99,33	208,03

Ort: Ortalama, n: Deney sayısı, ss: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma

Hesaplanan %geri kazanım ve %BSS değerleri sonucunda GRA'nın kısa dönemde kararlı olduğu fakat uzun dönemde kararlı olmadığı anlaşılmıştır. Bu nedenle

çalışmada analizler dışında GRA karanlıkta ve +4°C’de saklanmış ve GRA’nın ana stok çözeltisi iki haftadan daha uzun süre kullanılmamıştır.

5.2.2.7. Sağlamlık

Yöntemin geçerliliğini göstermek için yapılan sağlamlık çalışmalarında tampon derişimi, pH, dalga boyu ve uygulanan potansiyel parametrelerinde küçük değışimler yaparak bunların istatistiksel olarak yöntemi nasıl değıştirdiğı incelenmiştir. Parametrelerdeki değışikliklerin istatistiksel olarak değerdendirmeleri Çizelge 5.8.’de sunulmuştur.

Çizelge 5.8. *GRA’nın kapiler elektroforez yöntemi ile sağlamlık verileri*

	Tampon pH’ı	Tampon Derişimi (mM)	Dalga Boyu (nm)	Ort±ss (n=3)	%BSS
Optimum Koşullar	2,75	20	205.5	1,37±0,01	0,90
1. Koşul	2,70	20	205.5	1,29±0,01	0,90
2. Koşul	2,80	20	205.5	1,41±0,01	0,71
3. Koşul	2,75	19	205.5	1,39±0,02	1,07
4. Koşul	2,75	21	205.5	1,52±0,02	1,54
5. Koşul	2,75	20	207	1,50±0,02	1,52
6. Koşul	2,75	20	204	1,37±0,02	1,83

Ort: Ortalama, n: Deney sayısı, ss: Standart sapma, % BSS: % Bağıl standart sapma

Elde edilen ortalamalar ve %BSS değerdleri sonucunda yöntemin sağlamlığını göstermek amacı ile yapılan küçük değışikliklerin yöntemi etkilemediğı ve önerilen yöntemin sağlam bir yöntem olduğı sonucuna varılmıştır.

5.2.2.8. Sistem uygunluk testleri

Geliştirilen yöntemin sistem uygunluğunu göstermek amacı ile hesaplanan parametreler ve kabul sınırları Çizelge 5.9.’da verilmiştir.

Çizelge 5.9. GRA'nın kapiler elektroforez yöntemi ile sistem uygunluk testleri

	N	%BSS	Rs	As
Hesaplanan Değer	45024	0,25	2,40	0,978
Kabul Sınırı	>2000	≤ 1	>1,5	$0,95 < As < 1,2$

N: Tabaka sayısı, %BSS: Pik yanıtının % bağıl standart sapması, Rs: Ayrım gücü, As: Asimetri faktörü

Geliştirilen elektroforetik yöntemde asidik ortamda çalışılmış ve dolayısı ile elektroozmotik akışın etkisi ortadan kaldırılmıştır. Bu nedenle sistem uygunluk testleri arasında elektroozmozun göç zamanını kullanarak yapılan kapasite faktörü (k') ve seçicilik faktörü (α) hesaplanmamıştır. Bunların dışında hesaplanan tüm sistem uygunluk parametrelerinde kabul kriterleri sağlanmış ve geliştirilen yöntemin sistem uygunluğu gösterilmiştir.

5.3. YPSK Yöntemi

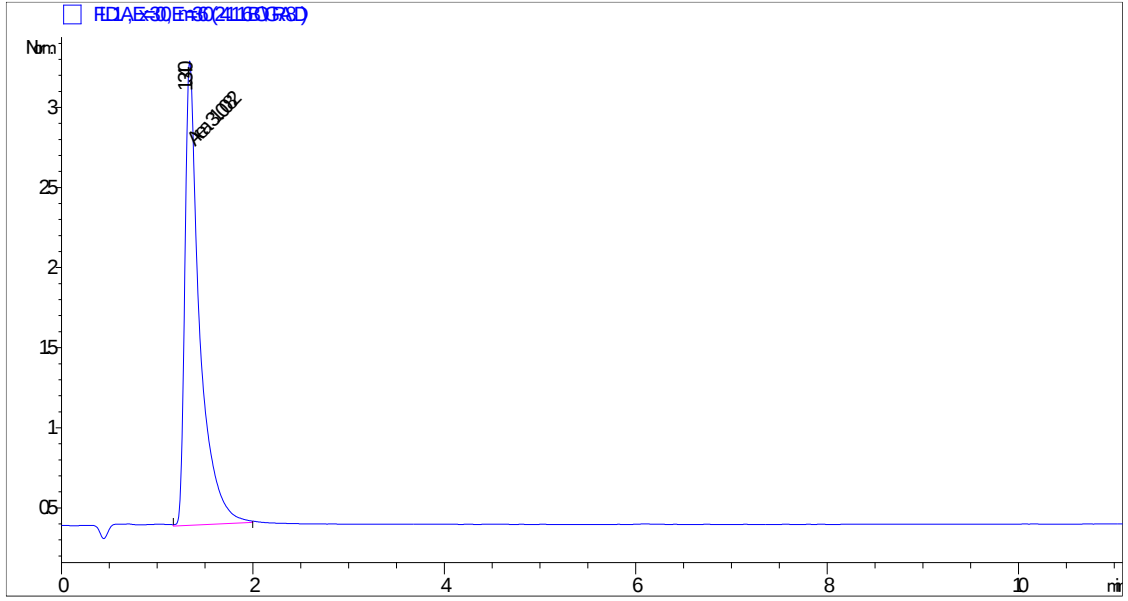
Geliştirilen KE yöntemini karşılaştırmak amacı ile sıvı kromatografik bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemde GRA'nın doğal flüoresansından yararlanmak amacı ile deteksiyon flüoresans detektörle sağlanmıştır. KE yönteminde IS olarak kullanılan MTP'nin de flüoresans verici özellikte olması nedeniyle bu yöntemde de IS olarak seçilmiştir. Yöntemin optimizasyonu ve validasyonu sağlandıktan sonra geliştirilen yöntem GRA'nın farmasötik preparatlarına uygulanmıştır ve sonuçlar KE yöntemi ile karşılaştırılmıştır.

5.3.1. Optimizasyon

YPSK yönteminde optimum koşulları belirlemek için sabit faz, dalga boyu, hareketli fazdaki derişimi, pH, organik çözücü yüzdesi ve akış hızı parametreleri incelenmiştir.

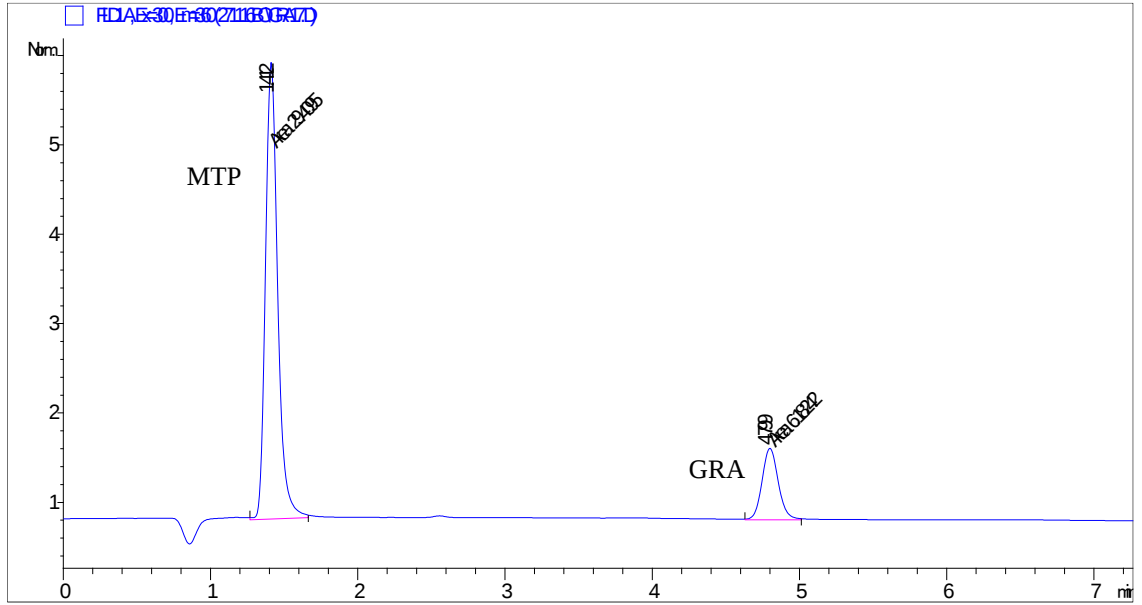
5.3.1.1. Sabit faz

Ayrım için önce 5,0 μ m partikül çapına sahip 3,0×50 mm boyutlarında C18 kolon kullanılmıştır. Flüoresans detektörün uyarma ve yayma dalga boyları sırası ile 300 nm ve 360 nm'ye ayarlanmıştır. Hareketli faz olarak %40 metanol içeren 20 mM asetat tamponu (pH 4,5) 0,5 mL/dk akış hızında kullanılmıştır. Bu kolonla gerçekleştirilen GRA analizine ait kromatogram Şekil 5.23'te sunulmuştur.



Şekil 5.23. C18 kolon ve asetat tamponu ile GRA'nın analizine ait kromatogram

Bu analiz sonucunda GRA'ya ait pikte kuyruklanma olduğu gözlenmiştir. YPSK ile gerçekleştirilen analizlerde, bazik örnekler için silika bazlı kolon dolgu materyallerinin pik şekillerinde kuyruklanmalara neden olduğu bilinmektedir. GRA da pKa 9 değeri ile oldukça bazik bir maddedir. Bu kuyruklanmanın önüne geçebilmek amacı ile fenil bağlı C6 kolon ile analiz gerçekleştirilerek pik morfolojisi incelenmiştir. Bu dolgu maddesi ile daha düzgün pik morfolojisi elde edilince aynı koşullarda IS'nin analizi de gerçekleştirilmiştir. 150 × 3,0 mm boyutunda ve 5,0 µm partikül çapına sahip C6 fenil bağlı silika kolon, hareketli faz olarak %30 metanol içeren 40 mM asetat tamponu (pH 4,5) ile 0,85 mL/dk akış hızında incelenmiştir. GRA ve IS'nin analizine ait kromatogram Şekil 5.24'te sunulmuştur.



Şekil 5.24. C6 fenil bağlı silika kolon ile GRA ve IS analizine ait kromatogram

Kullanılan bu sabit faz ile maddelerin pik morfolojilerinin düzgün olduğu ve uygun alıkonma zamanlarına sahip olduğu görülmüş ve çalışmada bu sabit fazın kullanılmasına karar verilmiştir.

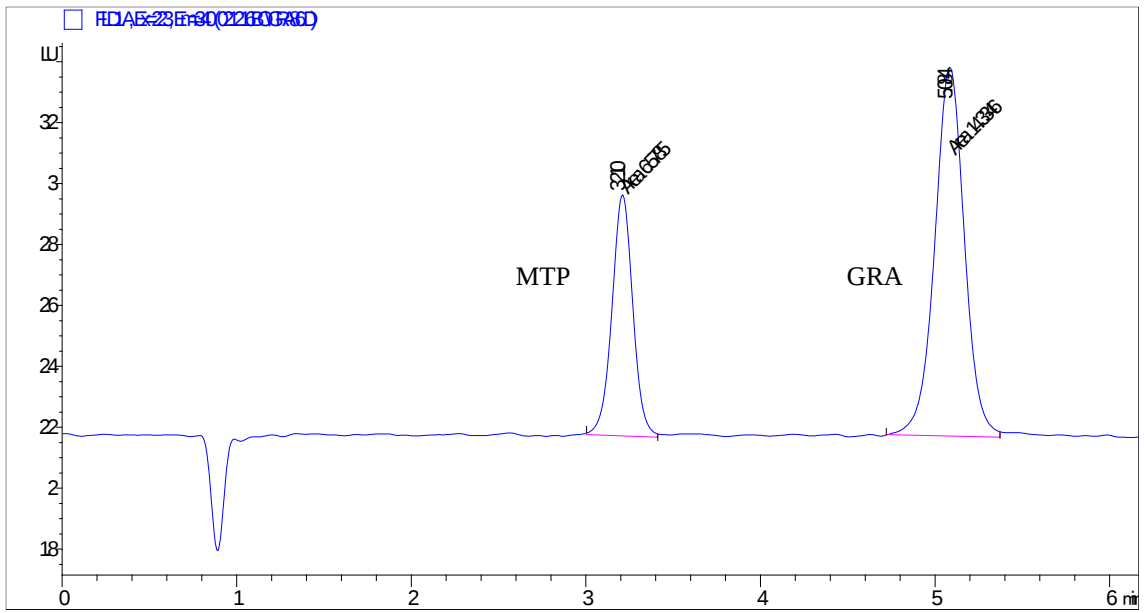
5.3.1.2. Dalga boyu

GRA'nın uygun uyarma ve yayma dalga boylarını belirlemek amacı ile çeşitli dalga boylarında analizleri gerçekleştirilmiştir. İncelenen 5 farklı dalga boyu çiftine ait veriler Çizelge 5.10'da verilmiştir.

Çizelge 5.10. GRA'nın çeşitli dalga boylarında analiz verileri

Dalga boyu (nm)		GRA Alıkonma Zamanı (dk)	GRA Pik Alanı	IS Alıkonma Zamanı (dk)	IS Pik Alanı
Uyarma	Yayma				
220	310	-	-	3.546	23,748
220	360	5.491	25,988	3.46	1,336
300	360	5.444	26,995	-	-
250	310	-	-	3.419	1,4549
223	340	5.421	14,87	3.416	5,262

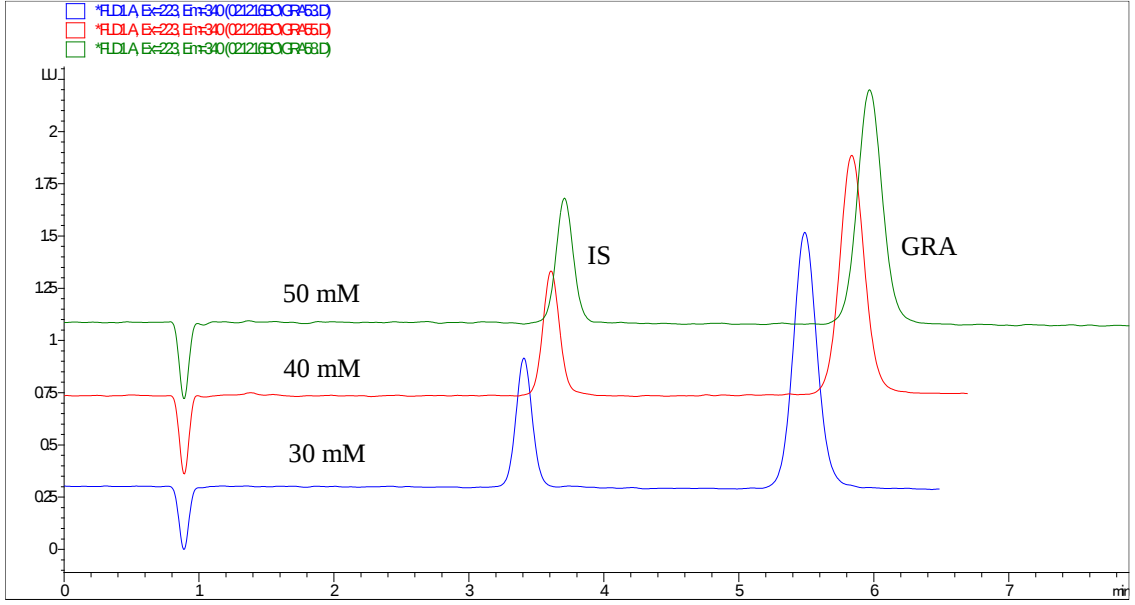
GRA için literatürde sıklıkla kullanılan 305-360 nm (Boppana, 1996; Huang, 1999) ve 305-365 nm (Pinguet, 1996) dalga boylarına yakın olarak 300-360 nm denenmiş ve literatür ile uyumlu olacak şekilde yüksek pik alanı gözlenmiştir. Fakat IS'nin bu dalga boylarında flüoresans sinyali gözlenememiştir. İki maddenin de sinyalinin gözlemlendiği, pik alanı ve pik morfolojisine göre en uygun çalışılabilecek uyarma ve yayma dalga boyları sırasıyla 223-340 nm olarak belirlenmiş ve çalışmaya bu dalga boyuyla devam edilmiştir. Şekil 5.25.'de bu dalga boylarında elde edilen kromatogram verilmiştir.



Şekil 5.25. GRA'nın optimum dalga boyundaki analizine ait kromatogram

5.3.1.3. Hareketli fazdaki tampon derişimi

Hareketli fazdaki tampon derişimini belirlemek için %30 metanol içeren 30 mM, 40 mM ve 50 mM asetat tamponu (pH 4,5) hazırlanmış ve GRA ve IS'nin analizleri gerçekleştirilmiştir. Hareketli fazların akış hızları 0,9 mL/dk'da sabit tutulmuştur. Şekil 5.26.'da bu analizlere ait kromatogramlar görölmektedir.

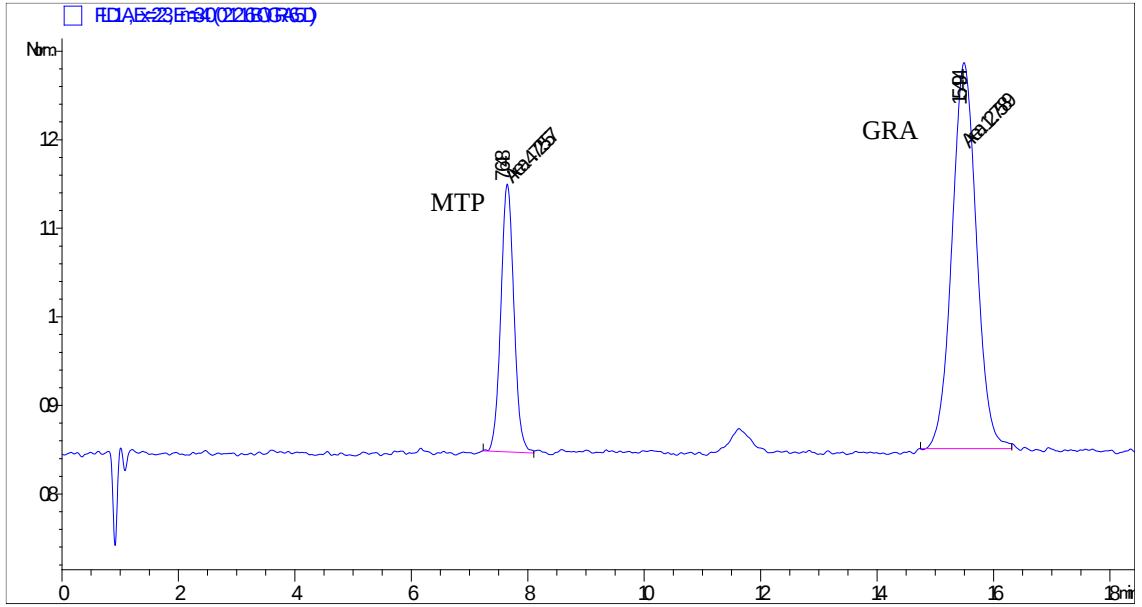


Şekil 5.26. Hareketli fazdaki tampon derişiminin incelenmesi

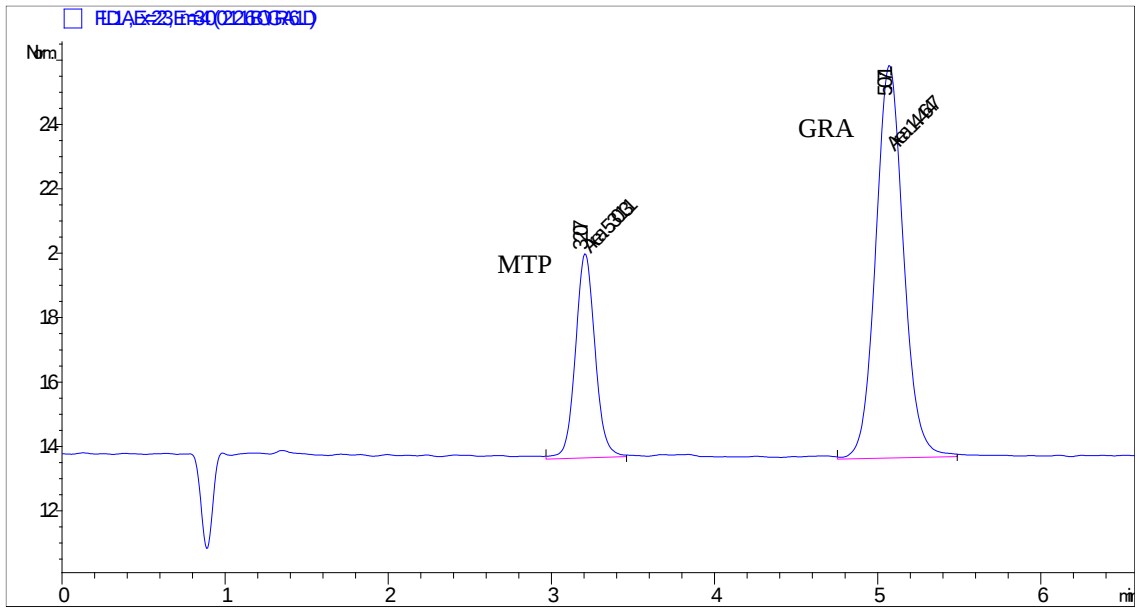
İncelenen tüm tampon derişimleri için düzgün pik morfolojileri ve uygun alıkönma zamanları elde edilmiştir. Hareketli fazdaki tampon derişiminin artmasıyla alıkönma zamanlarında bir miktar artış olduğu gözlenmiştir. Tampon derişimini arttırma ile ayırma bir katkı ya da pik morfolojisinde bir iyileşme gözlenmediği için en düşük derişim olan 30 mM asetat tamponunun hareketli faz bileşiminde kullanılmasına karar verilmiştir.

5.3.1.4. Organik çözücü yüzdesi

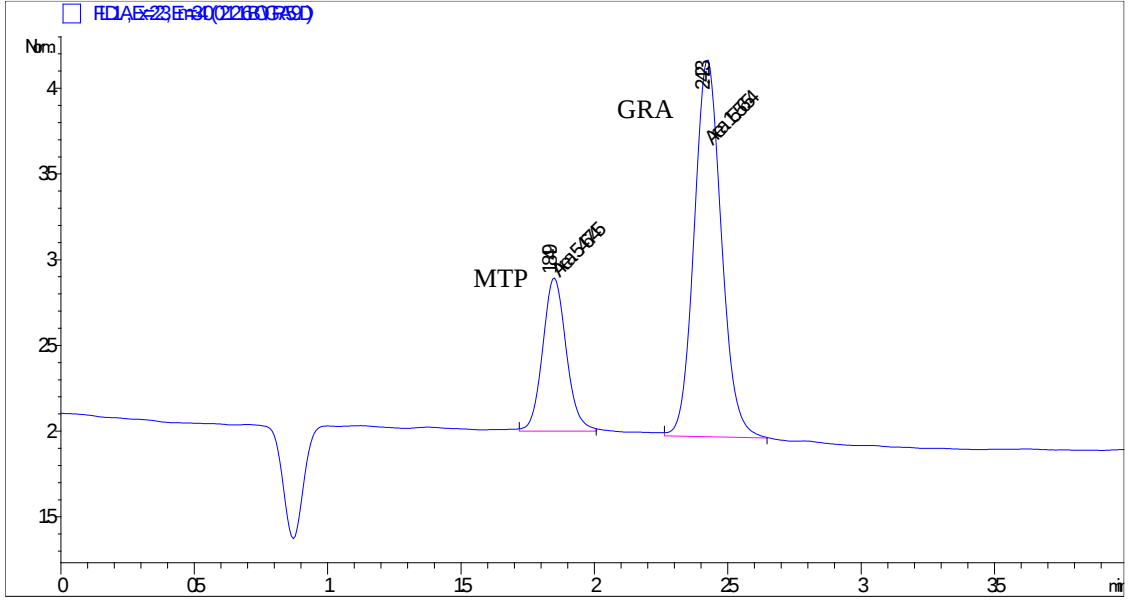
Hareketli fazdaki tampon derişimine karar verildikten sonra organik çözücü olarak kullanılacak olan metanolün hareketli fazdaki oranına karar verebilmek için %20, %30 ve %40 oranlarında metanol içeren 30 mM asetat tamponu (pH 4,5) şeklinde hareketli fazlar hazırlanmıştır. Hareketli fazların akış hızları 0,9 mL/dk'da sabit tutulmuştur. Bu analizler sonucu elde edilen kromatogramlar sırası ile Şekil 5.27., Şekil 5.28. ve Şekil 5.29.'da sunulmuştur.



Şekil 5.27. %20 metanol içeren hareketli faz ile GRA ve MTP'ye ait kromatogram



Şekil 5.28. %30 metanol içeren hareketli faz ile GRA ve MTP'ye ait kromatogram

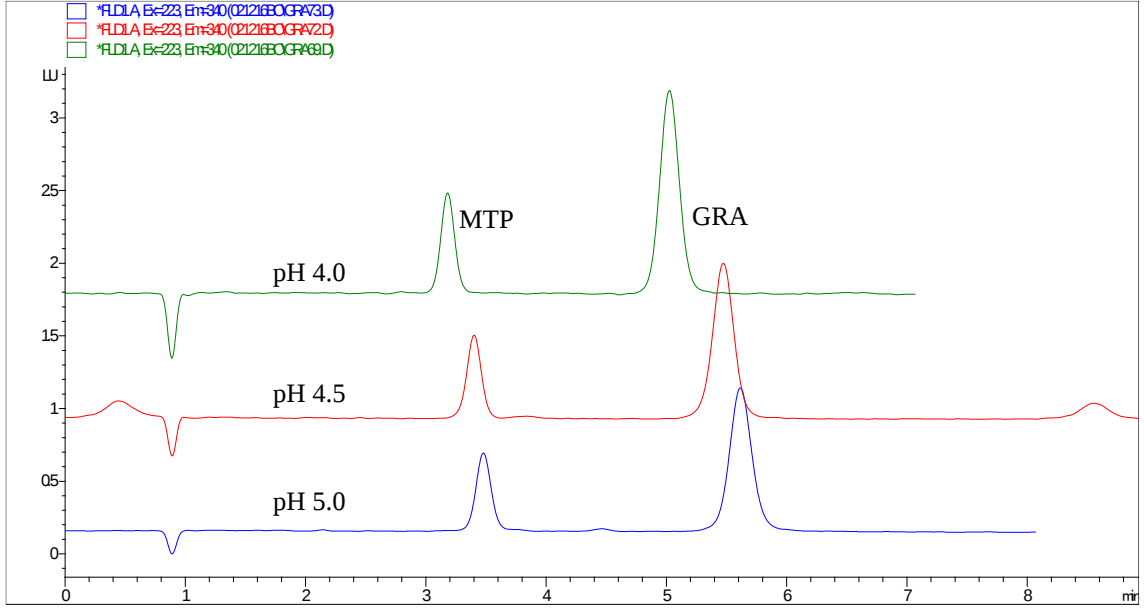


Şekil 5.29. %40 metanol içeren hareketli faz ile GRA ve MTP'ye ait kromatogram

Elde edilen sonuçlardan %20 metanol kullanılan hareketli faz ile alıkonma zamanlarının çok arttığı gözlenmiştir. %40 metanol kullanılan hareketli fazda ise piklerin alıkonma zamanlarının azaldığı fakat aynı zamanda piklerin ayrılmasının da azaldığı gözlenmiştir. İncelenen organik çözücü oranları arasında en uygun sonuçlar %30 metanol içeren hareketli faz ile elde edilmiş ve çalışmaya bu organik çözücü yüzdesiyle devam edilmiştir.

5.3.1.5. pH

Tampon derişimi ve organik çözücü oranı belirlenen hareketli fazın pH'ını belirlemek için %30 metanol içeren 30 mM asetat tamponunun pH'ı 4,0, 4,5 ve 5,0'e ayarlanarak GRA ve IS'nin analizleri gerçekleştirilmiştir. Hareketli fazların akış hızları 0,9 mL/dk'da sabit tutulmuştur. Şekil 5.30.'da analizler sonucu elde edilen kromatogramlar gösterilmektedir.

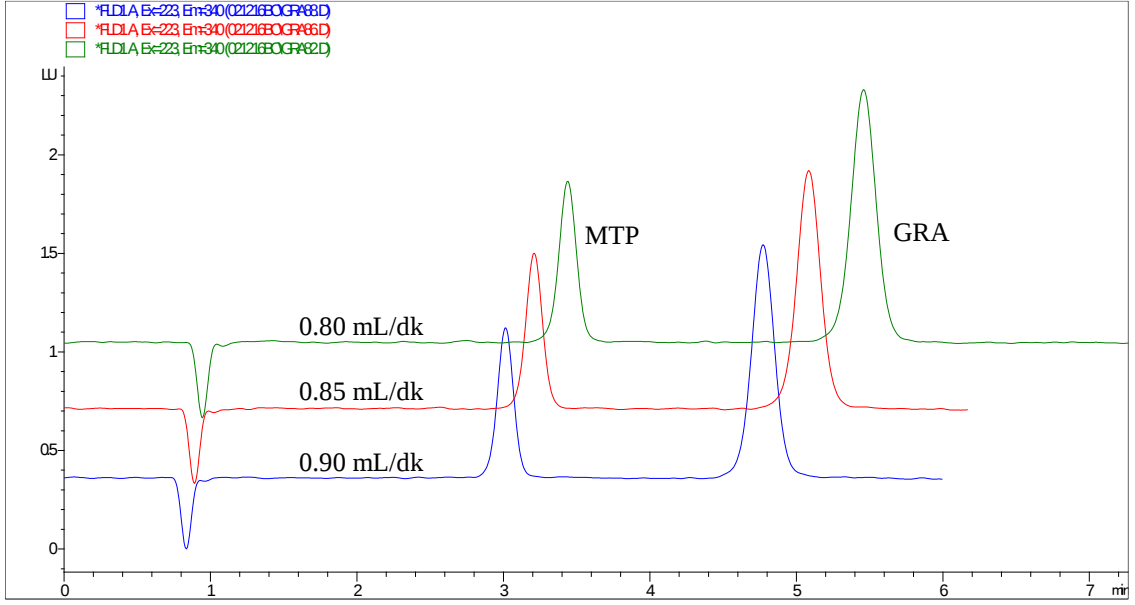


Şekil 5.30. Hareketli faz pH'nın incelenmesi

Analiz sonucu elde edilen verilerde incelenen tüm pH'larda piklerin keskin olduğu, alıkonma zamanlarının ve piklerin ayrılmasının kabul edilebilir düzeyde olduğu gözlenmiştir. En kısa analiz süresinin gözlemlendiği pH olan pH 4,0'un hareketli faz pH'ı olarak seçilmesine karar verilmiştir.

5.3.1.6. Akış hızı

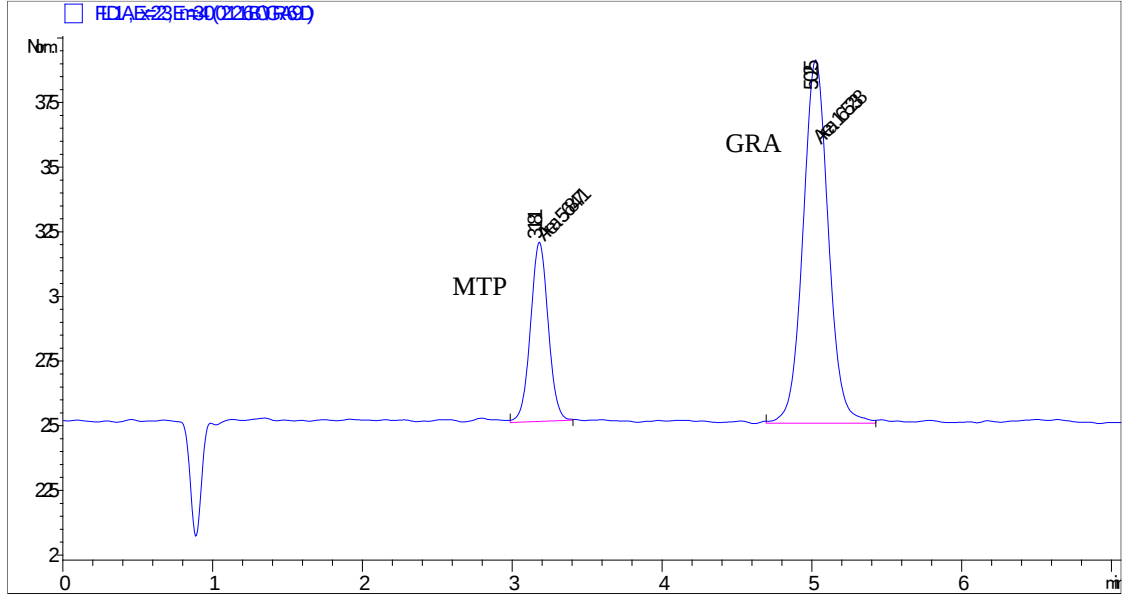
Hareketli fazın optimum akış hızının belirlenmesi amacıyla GRA'nın %30 metanol içeren 30 mM asetat tamponu (pH 4,0) şeklinde belirlenen hareketli fazı ile 0,80, 0,85 ve 0,90 mL/dk akış hızlarında analizleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 5.31.'de bu analizler sonucu elde edilen kromatogramlar verilmiştir.



Şekil 5.31. Akış hızının incelenmesi

İncelenen akış hızlarının hepsinde GRA için uygun alıkonma zamanları ve pik morfolojileri elde edilmiştir. Toplam analiz süresi de göz önünde bulundurularak hareketli fazın akış hızının 0,85 mL/dk olarak seçilmesine karar verilmiştir.

İncelenen parametreler sonucunda YPSK yöntemi için optimum çalışma koşulları; deteksiyonun 223-340 nm uyarma ve yayma dalga boylarında gerçekleştirilmesi, % 30 metanol içeren 30 mM asetat tamponu (pH 4,0) sisteminin hareketli faz olarak kullanılması ve hareketli fazın 0,85 mL/dk akış hızında olması şeklinde belirlenmiştir. Şekil 5.32.'de optimum koşullarda analizi yapılan GRA'nın kromatogramı gösterilmiştir.



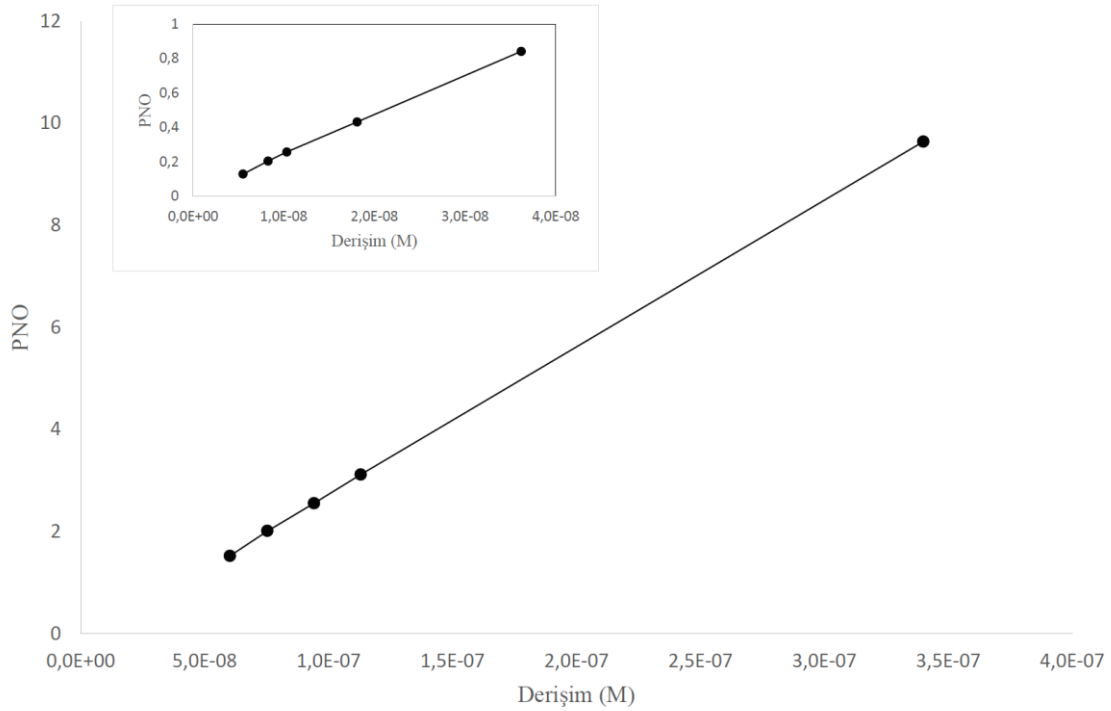
Şekil 5.32. Optimum koşullar altında analizi gerçekleştirilen GRA ve MTP'ye ait kromatogram

5.3.2. Validasyon

Optimizasyon koşulları belirlenen YPSK yönteminin geçerliliğinin gösterilmesi amacıyla doğrusallık, kesinlik, doğruluk, duyarlılık, kararlılık, spesifiklik ve sağlamlık parametreleri incelenmiştir. Yöntemin sistem uygunluğunu göstermek amacı ile ise N, Rs, As ve %BSS parametreleri hesaplanmıştır.

5.3.2.1. Doğrusallık

Yöntemin doğrusallık çalışması için GRA'nın $5,65 \times 10^{-7}$ ve $1,10 \times 10^{-9}$ M aralığında 13 farklı derişimi hazırlanarak bunların analizleri gerçekleştirilmiştir. PNO kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda yöntemin $5,51 \times 10^{-9}$ - $3,40 \times 10^{-7}$ M aralığında doğrusal olduğu bulunmuş ve $y = 28557443x - 0,107$ eşitliğine sahip yüksek korelasyonlu ($r = 0,9997$) bir doğru elde edilmiştir. Şekil 5.33.'te yöntemin doğrusal aralığını gösteren doğru sunulmuştur.



Şekil 5.33. YPSK yöntemi ile GRA'nın doğrusal olduğu aralığın grafiksel gösterimi

Yöntemin doğrusal olduğu aralıktan hareketle $2,41 \times 10^{-8}$ ve $3,40 \times 10^{-7}$ M arasında değişen 7 farklı derişimde kalibrasyon setleri oluşturulmuştur. Bu derişimlerin gün içi ve günler arası yapılan analizleri sonucu elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmeleri Çizelge 5.11.'de sunulmuştur.

Çizelge 5.11. GRA'nın YPSK yöntemi ile kalibrasyon verileri

	Günler arası			Tüm Günler (n=21)
	Gün I (n=7)	Gün II (n=7)	Gün III (n=7)	
a	8370371	7994134	8180049	8181518
b	-0,19	0,63	-0,069	0,12
r	0,9994	0,9931	0,9993	0,9968

a: Eğim, b: Kesim, r: Korelasyon katsayısı

Kalibrasyon setlerinin analizi sonucunda kesin noktaları sıfıra yakın ve yüksek korelasyon katsayısına sahip doğrular elde edilmiştir.

5.3.2.2. Kesinlik

YPSK yönteminin kesinliğinin gösterilebilmesi amacı ile $7,54 \times 10^{-8}$ M GRA ve $6,18 \times 10^{-8}$ M MTP'nin 3 ardışık günde 6'şar defa analizi gerçekleştirilmiştir. Çizelge 5.12.'de analiz sonuçlarına ait istatistiksel değerlendirmeler verilmiştir.

Çizelge 5.12. GRA'nın YPSK yöntemi ile kesinlik verileri

	Günler arası			Tüm Günler (n=18)
	Gün I (n=6)	Gün II (n=6)	Gün III (n=6)	
Ort	2,017	1,981	1,986	1,99
ss	0,035	0,035	0,022	0,032
%BSS	1,75	1,78	1,12	1,64
GA (%95)	$\pm 0,17$	$\pm 0,17$	$\pm 0,11$	$\pm 0,24$

Ort: Ortalama, ss: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma, GA (%95): %95 olasılıkla güven aralığı

Gün içi ve günler arası olmak üzere yapılan istatistiksel değerlendirmelerde analiz sonuçlarının %2'nin altında %BSS değerlerine sahip olduğu ve incelenen aralıkta yöntemin tekrarlanabilir olduğu bulunmuştur.

5.3.2.3. Duyarlılık

Yöntemin duyarlılığının belirlenebilmesi için kalibrasyon eğrisinin eğimi ve ss'ı kullanılmıştır. GRA için yöntemin gözlenebilme sınırı $6,13 \times 10^{-9}$ M (2,14 ng/mL) ve tayin sınırı $2,04 \times 10^{-8}$ M (7,13 ng/mL) olarak hesaplanmıştır.

5.3.2.4. Doğruluk

Doğruluk çalışmaları için GRA'nın $2,41 \times 10^{-8}$, $7,54 \times 10^{-8}$ ve $3,40 \times 10^{-7}$ M derişim düzeyindeki çözeltileri hazırlanmış ve IS'nin son derişimi $6,18 \times 10^{-8}$ M olacak şekilde çözeltilere eklenmiştir. Bu çözeltilerin gün içi ve günler arası olmak üzere 6'şar kez analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirmeleri Çizelge 5.13'te verilmiştir.

Çizelge 5.13. GRA'nın YPSK yöntemi ile doğruluk verileri

I. gün (n=6)	Eklenen (M)	$2,41 \times 10^{-8}$	$7,54 \times 10^{-8}$	$3,40 \times 10^{-7}$
	Bulunan (Ort±ss)	$2,41 \times 10^{-8} \pm 2,24 \times 10^{-10}$	$7,37 \times 10^{-8} \pm 9,55 \times 10^{-10}$	$3,35 \times 10^{-7} \pm 5,07 \times 10^{-9}$
	% Geri Kazanım	99,88	97,77	98,61
	% BH	-0,12	-2,23	-1,39
	% BSS	0,93	1,29	1,51
II. gün (n=6)	Eklenen (M)	$2,41 \times 10^{-8}$	$7,54 \times 10^{-8}$	$3,4 \times 10^{-7}$
	Bulunan (Ort±ss)	$2,48 \times 10^{-8} \pm 3,14 \times 10^{-10}$	$7,43 \times 10^{-8} \pm 1,09 \times 10^{-9}$	$3,34 \times 10^{-7} \pm 4,24 \times 10^{-9}$
	% Geri Kazanım	102,68	98,59	98,37
	% BH	2,68	-1,41	-1,63
	% BSS	1,27	1,47	1,28
III. gün (n=6)	Eklenen (M)	$2,41 \times 10^{-8}$	$7,54 \times 10^{-8}$	$3,4 \times 10^{-7}$
	Bulunan (Ort±ss)	$2,45 \times 10^{-8} \pm 3,69 \times 10^{-10}$	$7,47 \times 10^{-8} \pm 6,46 \times 10^{-10}$	$3,41 \times 10^{-7} \pm 5,58 \times 10^{-9}$
	% Geri Kazanım	101,87	99,17	100,28
	% BH	1,87	-0,83	0,28
	% BSS	1,51	0,86	1,64
Tüm günler (n=18)	Eklenen (M)	$2,41 \times 10^{-8}$	$7,54 \times 10^{-8}$	$3,4 \times 10^{-7}$
	Bulunan (Ort±ss)	$2,45 \times 10^{-8} \pm 4,08 \times 10^{-10}$	$7,42 \times 10^{-8} \pm 9,69 \times 10^{-10}$	$3,37 \times 10^{-7} \pm 5,55 \times 10^{-9}$
	% Geri Kazanım	101,4	98,51	99,09
	% BH	1,4	-1,49	-0,91
	% BSS	1,67	1,30	1,65

n: Deney sayısı, Ort: Ortalama, ss: Standart sapma, BH: Bağlı hata, BSS: Bağlı standart sapma

Yapılan istatistiksel değerlendirmelerde tüm gün içi ve günler arası sonuçlarda %2'nin altında %BSS değerleri ve %100 civarında %geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Bu değerler ile yöntemin incelenen aralıkta iyi bir kesinlik ve doğruluğa sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

YPSK yönteminin matriks ortamlarındaki doğruluğunun araştırılması amacı ile 3 farklı derişim düzeyindeki GRA, tablet ve ampul matrikslerine eklenmiş ve analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizler sonucunda yapılan istatistiksel değerlendirmeler sırasıyla Çizelge 5.14. ve 5.15.'te verilmiştir.

Çizelge 5.14. Tablet matriks ortamına eklenen GRA'nın YPSK yöntemi ile doğruluk verileri

Eklenen (M) (n=3)	$4,19 \times 10^{-8}$	$6,98 \times 10^{-8}$	$1,74 \times 10^{-7}$
Bulunan (Ort$\pm$ss)	$4,34 \times 10^{-8} \pm 3,79 \times 10^{-10}$	$7,12 \times 10^{-8} \pm 1,15 \times 10^{-9}$	$1,74 \times 10^{-7} \pm 7,48 \times 10^{-10}$
% Geri Kazanım	103,69	101,96	99,94
% BH	3,68	1,96	-0,05
% BSS	0,87	1,61	0,43

ss: Standart sapma, % BSS: % Bağlı standart sapma, BH: Bağlı hata

Çizelge 5.15. Ampul matriks ortamına eklenen GRA'nın YPSK yöntemi ile doğruluk verileri

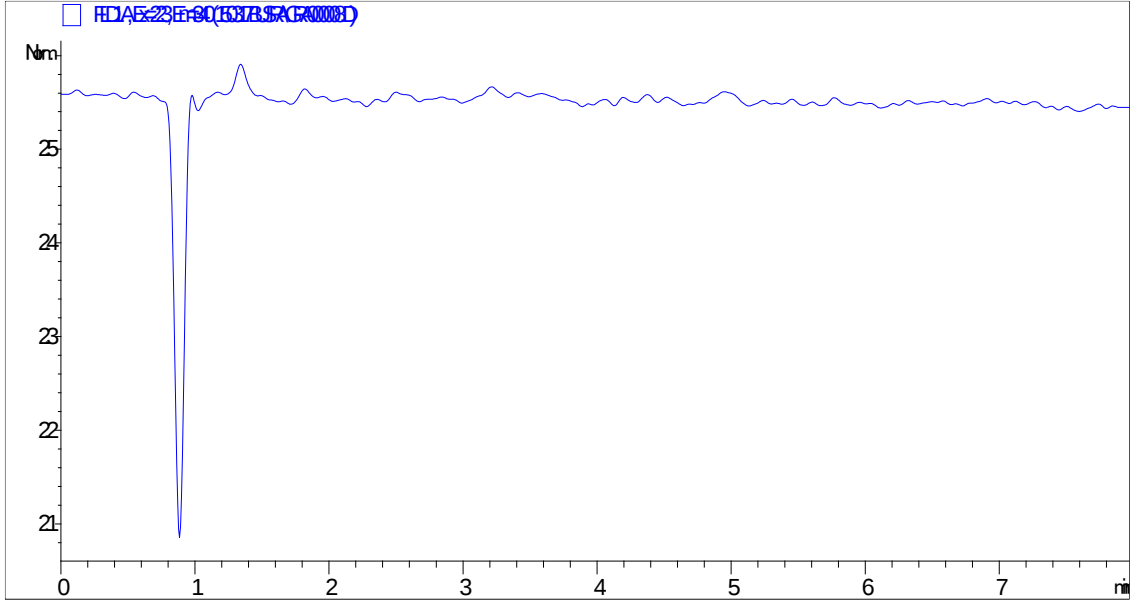
Eklenen (M) (n=3)	$4,19 \times 10^{-8}$	$6,98 \times 10^{-8}$	$1,74 \times 10^{-7}$
Bulunan (Ort$\pm$ss)	$4,37 \times 10^{-8} \pm 3,61 \times 10^{-10}$	$7,17 \times 10^{-8} \pm 1,08 \times 10^{-9}$	$1,74 \times 10^{-7} \pm 1,45 \times 10^{-9}$
% Geri Kazanım	104,44	102,80	99,96
% BH	4,44	2,80	-0,04
% BSS	0,83	1,51	0,83

ss: Standart sapma, % BSS: % Bağlı standart sapma, BH: Bağlı hata

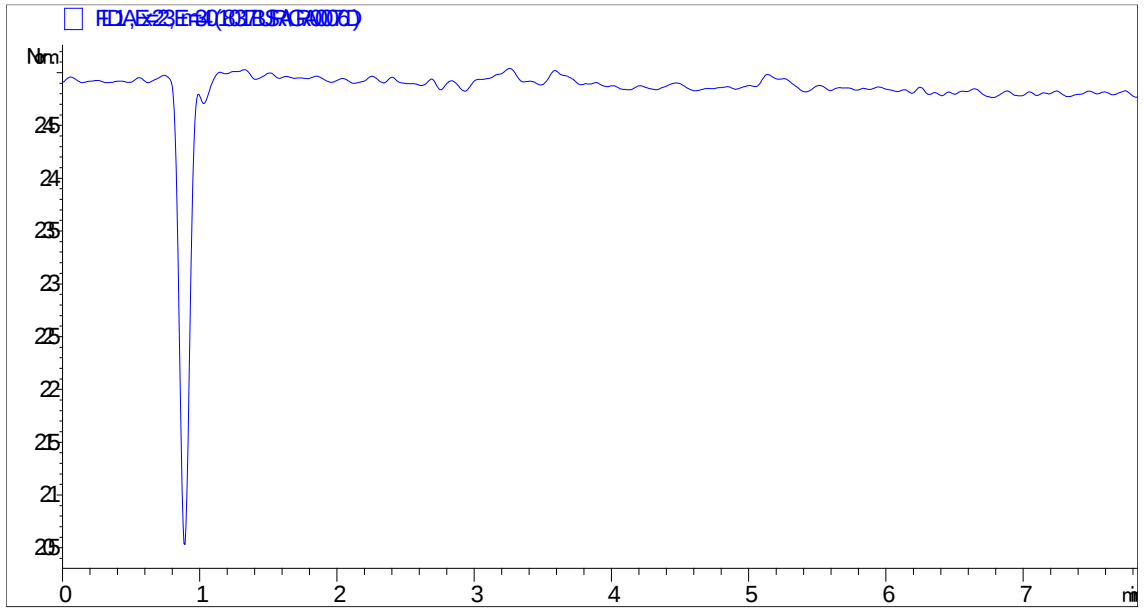
Yöntemin matriks ortamlarındaki doğruluğunu araştırmak amacı ile yapılan değerlendirmelerde yalnız en düşük derişim düzeylerinde %geri kazanım oranları %100'den uzak çıkmıştır. Fakat bu derişim düzeyleri için bu durum beklenen bir durumdur. Daha yüksek derişimlerde %geri kazanım değerleri %100'e daha yakın ve dolayısı ile %BH değerleri daha düşüktür. Tüm analizlerde %BSS değerleri %2'nin altında bulunmuştur. Değerlendirmeler sonucunda geliştirilen yöntemin bu matriks ortamlarında da iyi bir doğruluk ve kesinliğe sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

5.3.2.5. Spesifiklik

Geliştirilen YPSK yönteminin spesifikliğinin gösterilebilmesi için GRA'nın farmasötik preparatlarına ait matriks ortamları analiz edilmiştir. Şekil 5.34. ve 5.35.'te sırasıyla tablet ve ampul matrikslerine ait kromatogramlar verilmiştir.



Şekil 5.34. Tablet matriks ortamına ait kromatogram



Şekil 5.35. Ampul matriks ortamına ait kromatogram

Kromatogramlardan da görüldüğü gibi farmasötik preparatların matriks ortamlarında GRA analizini etkileyecek herhangi bir girişim yapan sinyal ile karşılaşılmamıştır.

5.3.2.6. Kararlılık

Yöntemin kararlılık çalışması için GRA'nın -18°C'de karanlıkta 1 ay bekletilmiş ve +4°C'de karanlıkta 24 saat bekletilmiş çözeltileri ile taze hazırlanmış GRA çözeltileri analiz edilerek sonuçlar karşılaştırılmıştır. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 5.16.'da verilmiştir.

Çizelge 5.16. GRA'nın YPSK yöntemi ile kararlılık verileri

	Taze çözelti	24 saat	1 ay
Ort (n=3)	2,165	2,172	3,059
ss	0,008	0,005	0,047
% BSS	0,35	0,22	1,55
% Geri kazanım	99,83	100,12	137,86

Ort: Ortalama, n: Deney sayısı, ss: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma

Bu yöntem ile yapılan analizlerde de KE yöntemi ile uyumlu sonuçlar elde edilmiş ve GRA'nın kısa dönemde kararlı olduğu fakat uzun dönemde kararlı olmadığı anlaşılmıştır.

5.3.2.7. Sağlamlık

Geliştirilen yöntemin sağlamlığını gösterebilmek amacı ile tampon pH'ı, hareketli fazdaki tampon derişimi, hareketli fazın organik çözücü faz oranı ve akış hızı parametrelerinde küçük değişimler yaparak bunların istatistiksel olarak yöntemi nasıl değiştirdiği incelenmiştir. Parametrelerdeki değişikliklerin istatistiksel olarak değerlendirmeleri Çizelge 5.17'de sunulmuştur.

Çizelge 5.17. GRA'nın YPSK yöntemi ile sağlamlık verileri

	Tampon pH'ı	Tampon Derişimi (mM)	Organik Çözücü Oranı (Metanol)	Akış Hızı (mL/dk)	Ort±ss (n=3)	%BSS
Optimum Koşullar	4,0	30	%30	0,85	1,77±0,01	0,65
1. Koşul	4,05	30	%30	0,85	1,82±0,02	1,34
2. Koşul	3,95	30	%30	0,85	1,78±0,03	1,46
3. Koşul	4,0	31	%30	0,85	1,78±0,02	1,24

Çizelge 5.17. (Devam) GRA'nın YPSK yöntemi ile sağlamlık verileri

4. Koşul	4,0	29	%30	0,85	1,76±0,02	1,19
5. Koşul	4,0	30	%31	0,85	1,69±0,01	0,84
6. Koşul	4,0	30	%29	0,85	1,65±0,01	0,72
7. Koşul	4,0	30	%30	0,90	1,78±0,03	1,45
8. Koşul	4,0	30	%30	0,80	1,74±0,01	0,70

Ort: Ortalama, n: Deney sayısı, ss: Standart sapma, % BSS: % Bağıl standart sapma

Sağlamlık incelemesi sonucunda yöntem parametrelerinde yapılan küçük değişikliklerin yöntemi etkilemediği incelenen koşullarda geliştirilen yöntemin sağlam bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

5.3.2.8. Sistem uygunluk testleri

Geliştirilen YPSK yönteminin sistem uygunluğunu göstermek amacı ile Çizelge 5.18.'de sunulan parametreler hesaplanmış ve kabul sınırları verilmiştir.

Çizelge 5.18. GRA'nın YPSK yöntemi ile sistem uygunluk testleri

	N	%BSS	Rs	As	k'	α
Hesaplanan Değer	6451	0,76	4,08	0,999	4,57	1,80
Kabul Sınırı	>2000	≤%1	>1,5	0,95<As<1,2	1-5	>1

N: Tabaka sayısı, %BSS: Pik yanıtının % bağıl standart sapması, Rs: Ayrım gücü, As: Asimetri faktörü, k': Kapasite faktörü, α : Seçicilik faktörü

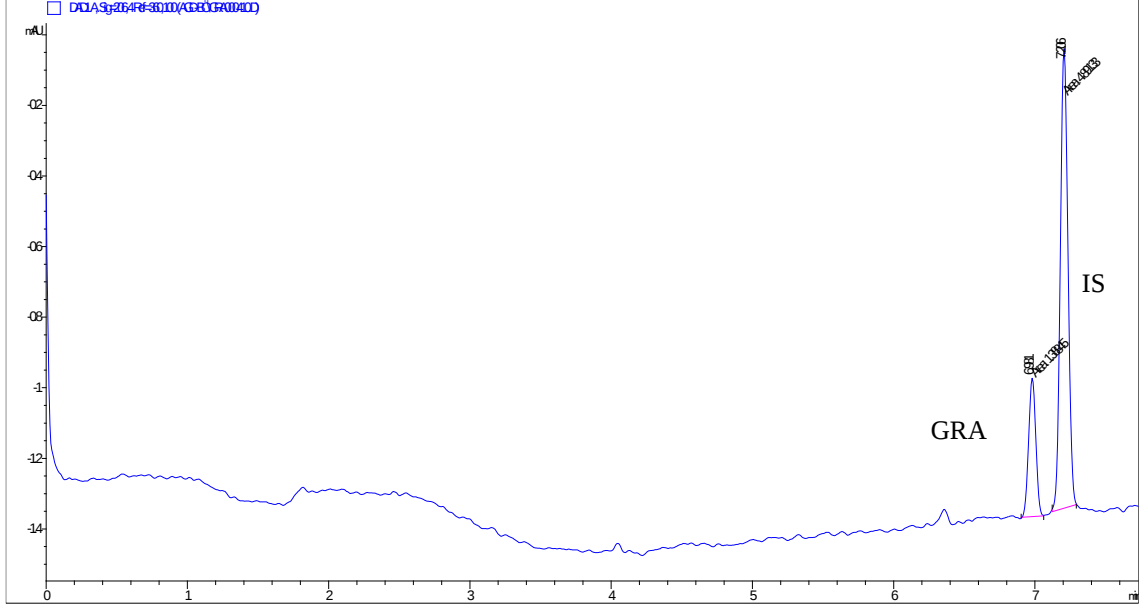
Yapılan hesaplamalar sonucunda tüm sistem uygunluk parametrelerinin gerekli kriterleri sağladığı bulunmuş ve bu şekilde geliştirilen yöntemin sistem uygunluğu gösterilmiştir.

5.4. Yöntemlerin Uygulanması

5.4.1. Granisetronun tabletlerden miktar tayini

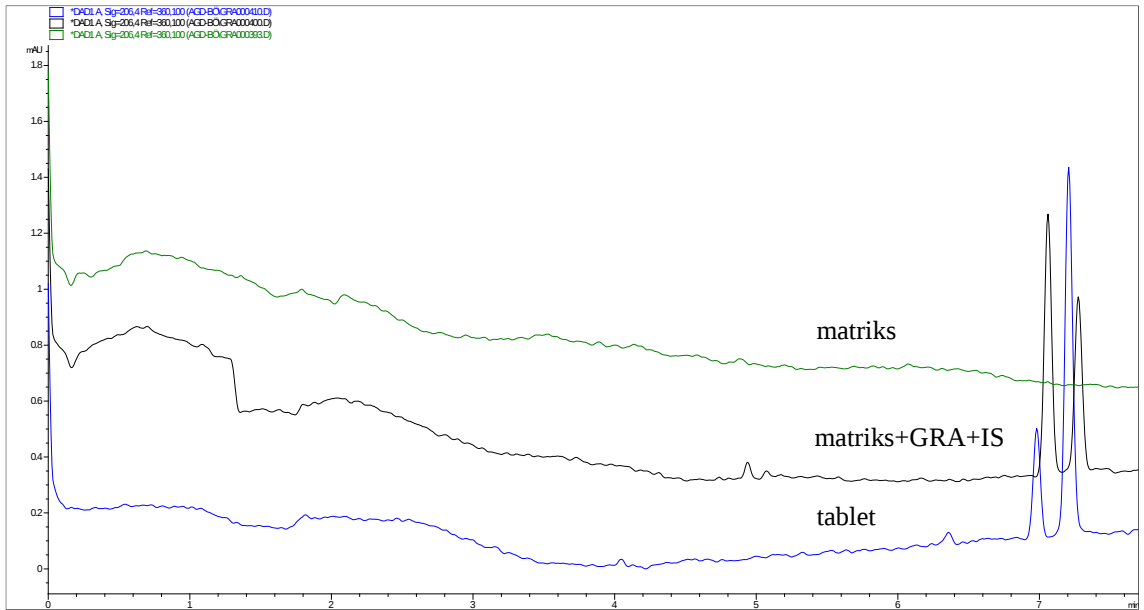
GRA'nın tabletlerinden tayini için yerel eczaneden satın alınan ve 1 mg GRA içerdiği bildirilen Kytril® tablet kullanılmıştır.

KE yönteminde ticari tabletin 3 farklı derişimi hazırlanarak 3'er kez analiz edilmiştir. Şekil 5.36.'da bu analizlerden birine ait elektroferogram verilmiştir.



Şekil 5.36. Tablet analizine ait elektroferogram

Şekil 5.37.'de tablet matriksi, tablet matriks ortamına eklenmiş GRA ve IS ve ticari tablet çözeltisine ait elektroferogramlar karşılaştırma amacı ile verilmiştir.



Şekil 5.37. Matriks, tablet matriksine eklenmiş GRA ve IS ve tablet analizine ait elektroferogramlar

Şekil 5.37.'den de görüldüğü gibi tablet analizi sonucunda elde edilen GRA piki aynı karakteristikleri taşımakta ve tablet ortamında herhangi bir girişim yapan sinyal bulunmamaktadır.

KE yöntemi ile GRA'nın tabletlerden miktar tayinine yönelik istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 5.19.'da sunulmuştur.

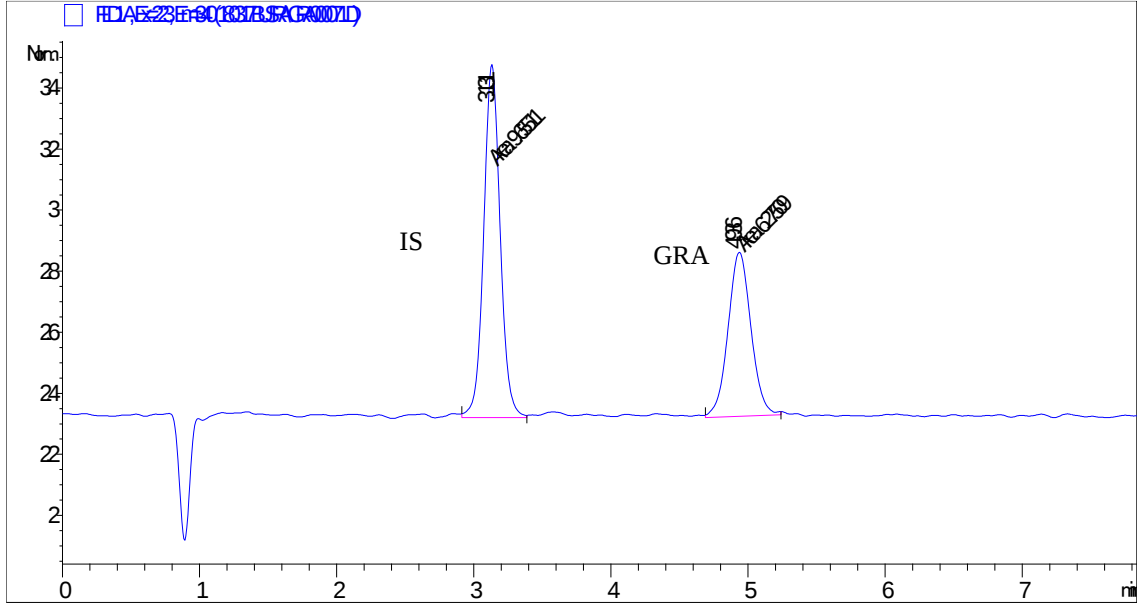
Çizelge 5.19. GRA tabletlerin kapiler elektroforez yöntemi ile miktar tayini verilerinin istatistiksel değerlendirilmesi

Derişim (M)	5.74×10^{-7}	Ort Bulunan GRA (mg) (n=3)	0,987
		ss	0,016
		% BSS	1,65
		% Geri Kazanım	97,92
	8.61×10^{-7}	Ort Bulunan GRA (mg) (n=3)	1,013
		ss	0,003
		% BSS	0,38
		% Geri Kazanım	100,49
	1.72×10^{-6}	Ort Bulunan GRA (mg) (n=3)	1,034
		ss	0,011
		% BSS	1,15
		% Geri Kazanım	102,67
	Tüm derişimler için	Ort Bulunan GRA (mg) (n=9)	1,011
		GA (%95)	$\pm 0,13$

Ort: Ortalama, n: Deney sayısı, ss: Standart sapma, % BSS: % Bağıl standart sapma, GA (%95): %95 olasılıkla güven aralığı

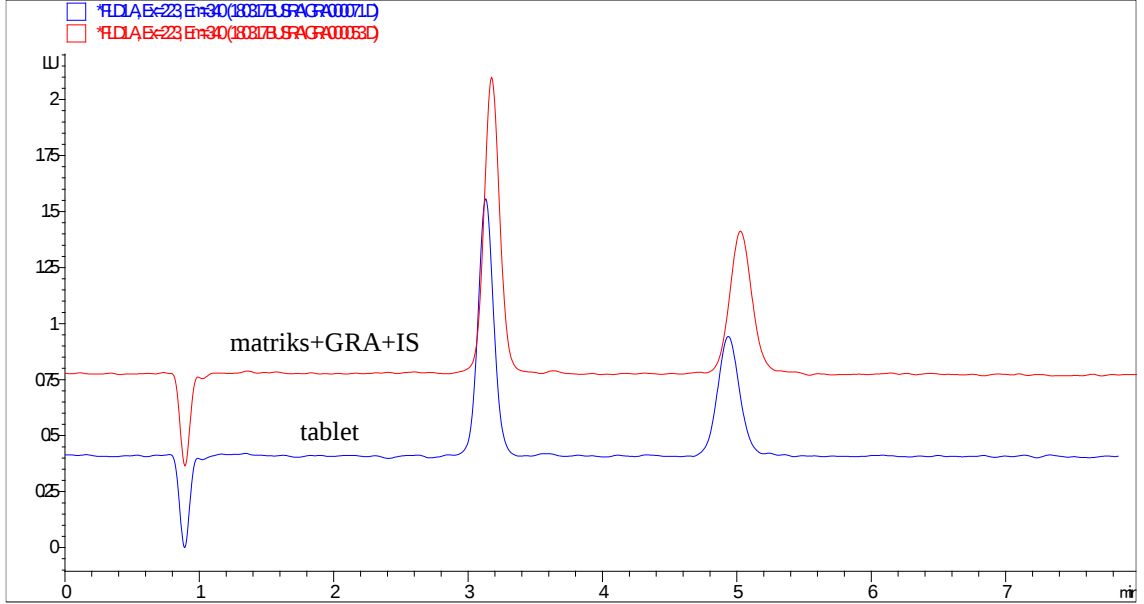
Yapılan değerlendirmelerde 1 mg GRA içeren ticari tabletlerden hazırlanan 3 derişim düzeyi için de hesaplanan %geri kazanım değerlerinin USP39'da GRA tabletleri için belirtilen sınırlar (%92-108) içerisinde olduğu bulunmuştur. Bu şekilde geliştirilen KE yöntemin GRA'nın tabletlerinden tayini için kullanılabileceği gösterilmiştir.

YPSK yönteminde de 1 mg GRA içeren tabletlerden 3 farklı derişim düzeyinde hazırlanmış ve her çözelti 3'er kez analiz edilmiştir. Şekil 5.38.'de bu analizlerden birine ait kromatogram verilmiştir.



Şekil 5.38. Tablet analizine ait kromatogram

Şekil 5.39.'da ise matriks ortamına eklenmiş GRA ve IS kromatogramı ile tablet çözeltisinden elde edilen kromatogram karşılaştırılmıştır.



Şekil 5.39. Tablet matriksine eklenmiş GRA ve IS ve tablet analizine ait kromatogramlar

Bu karşılaştırma sonucunda tablet çözeltisinde gözlenen pikin, aynı karakteristikleri taşıdığı ve tablet matriks ortamının herhangi bir girişime neden olmadığı gözlenmiştir.

GRA'nın YPSK yöntemi ile tabletlerinden miktar tayini için yapılan istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 5.20.'de sunulmuştur.

Çizelge 5.20. GRA tabletlerin YPSK yöntemi ile miktar tayini verilerinin istatistiksel değerlendirilmesi

Derişim (M)	4.13×10⁻⁸	Ort Bulunan GRA (mg) (n=3)	0,999
		ss	0,008
		% BSS	0,87
		% Geri Kazanım	102,24
	7.74×10⁻⁸	Ort Bulunan GRA (mg) (n=3)	1,026
		ss	0,014
		% BSS	1,45
		% Geri Kazanım	101,79
	1.94×10⁻⁷	Ort Bulunan GRA (mg) (n=3)	1,030
		ss	0,010
		% BSS	1,01
		% Geri Kazanım	99,17
	Tüm derişimler için	Ort Bulunan GRA (mg) (n=9)	1,018
		GA (%95)	±0,09

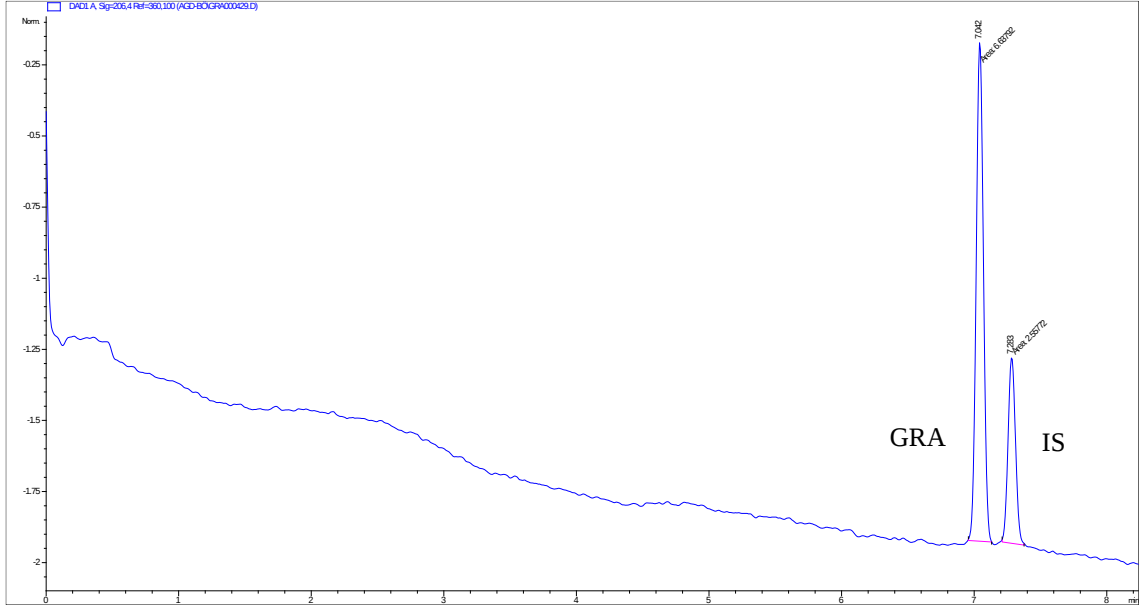
Ort: Ortalama, n: Deney sayısı, ss: Standart sapma, % BSS: % Bağlı standart sapma, GA (%95): %95 olasılıkla güven aralığı

Bu yöntemde de elde edilen sonuçlar USP39'da belirtilen sınırlar içerisinde yer almıştır ve geliştirilen yöntem GRA'nın tabletlerinden tayini için uygulanabilir.

5.4.2. Granisetronun ampullerden miktar tayini

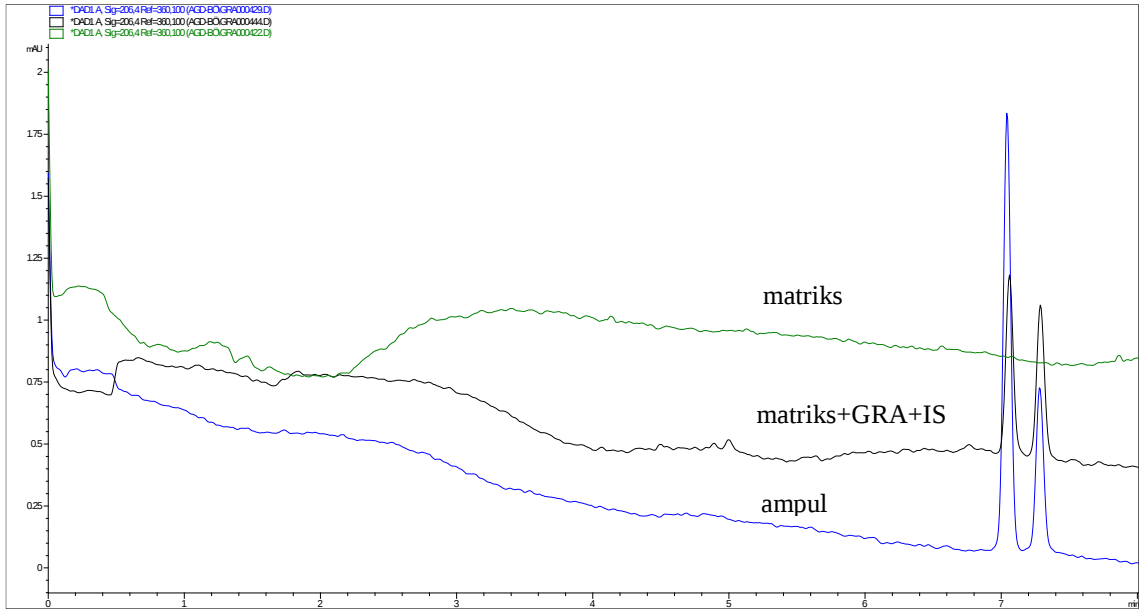
GRA'nın ampullerinden miktar tayini amacı ile 3 mL çözeltide 3 mg GRA içerdiği bildirilen Kytril® ampul yerel eczaneden satın alınmış ve kullanılmıştır.

KE yönteminde ticari tabletlerde olduğu gibi yine 3 farklı derişimde ampul çözeltisi hazırlanarak 3'er kez analiz edilmiştir. Şekil 5.40.'ta bu analizlerden birine ait elektroferogram verilmiştir.



Şekil 5.40. Ampul analizine ait elektroferogram

Şekil 5.41.'de de pik karakteristiklerini karşılaştırmak amacı ile ampul matriksi, ampul matriks ortamına eklenmiş GRA ve IS ve ticari ampul çözeltisine ait elektroferogramlar karşılaştırma amacı ile verilmiştir.



Şekil 5.41. Matriks, ampul matriksine eklenmiş GRA ve IS ve ampul analizine ait elektroferogramlar

KE yöntemi ile yapılan bu karşılaştırmada ampul matriksinden kaynaklı herhangi bir girişim olmadığı ve ampul çözeltisinin analizi sonucunda elde edilen pikin aynı özelliklerde olduğu gözlenmiştir.

KE yöntemi ile GRA'nın ampullerinden miktar tayini için yapılan istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 5.21.'de verilmiştir.

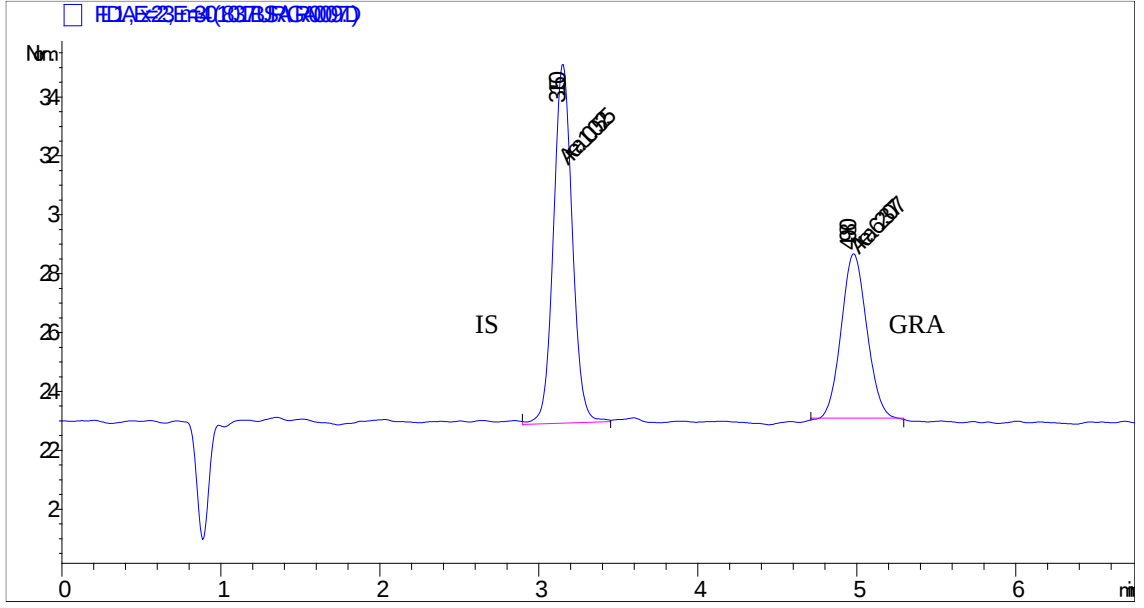
Çizelge 5.21. *GRA ampullerinin kapiler elektroforez yöntemi ile miktar tayini verilerinin istatistiksel değerlendirilmesi*

Derişim (M)	6.40×10^{-7}	Ort Bulunan GRA (mg) (n=3)	3,094
		ss	0,018
		% BSS	0,58
		% Geri Kazanım	103,14
	9.60×10^{-7}	Ort Bulunan GRA (mg) (n=3)	3,025
		ss	0,017
		% BSS	0,58
		% Geri Kazanım	100,86
	1.44×10^{-6}	Ort Bulunan GRA (mg) (n=3)	3,005
		ss	0,025
		% BSS	0,85
		% Geri Kazanım	100,19
	Tüm derişimler için	Ort Bulunan GRA (mg) (n=9)	3,041
		GA (%95)	$\pm 0,24$

Ort: Ortalama, n: Deney sayısı, ss: Standart sapma, % BSS: % Bağlı standart sapma, GA (%95): %95 olasılıkla güven aralığı

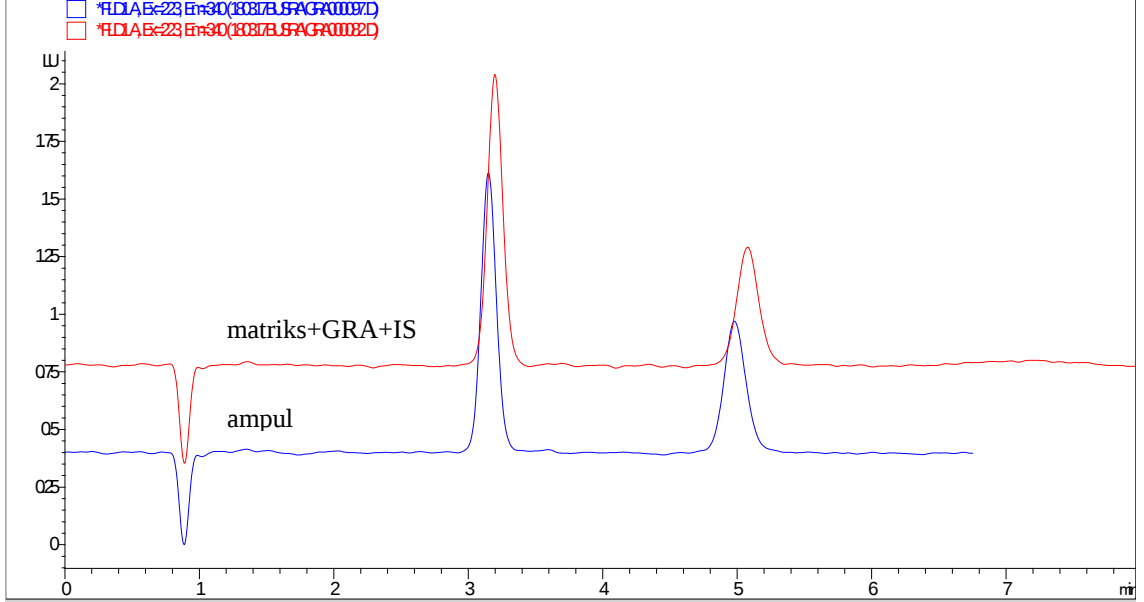
Her 3 derişim düzeyi için de elde edilen %geri kazanım değerleri USP39'da GRA ampulleri için belirtilen sınırlar (%93-107) içerisinde yer almaktadır. Bu çalışma ile geliştirilen KE yöntemin GRA'nın ticari ampullerinden tayini için önerilmektedir.

GRA'nın ampullerinden miktar tayini için geliştirilen diğer yöntem olan YPSK yönteminde de 3 mg/mL düzeyinde GRA içerdiği bildirilen ampullerden 3 farklı derişim düzeyinde çözelti hazırlanmış ve her çözelti 3'er kez analiz edilmiştir. Şekil 5.42.'de bu analizlerden birine ait kromatogram sunulmuştur.



Şekil 5.42. Ampul analizine ait kromatogram

Şekil 5.43'te ise ampul matriks ortamına eklenmiş GRA ve IS çözeltisi ile ticari ampul çözeltisinden elde edilen kromatogramlar karşılaştırılmıştır.



Şekil 5.43. Ampul matriksine eklenmiş GRA ve IS ve ampul analizine ait kromatogramlar

Bu kromatogramlardan da görüldüğü üzere ticari ampullerin analizi sonucunda gözlenen GRA piki, daha önceki analizlerde elde edilen kromatogramlarla aynı karakteristikleri taşımaktadır ve ampul matriks ortamından kaynaklanan herhangi bir girişim sinyali gözlenmemiştir.

Geliştirilen YPSK yönteminin ticari ampullerden GRA tayinine uygulanması ile elde edilen verilere ait istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 5.22.'de verilmiştir.

Çizelge 5.22. GRA ampullerinin YPSK yöntemi ile miktar tayini verilerinin istatistiksel değerlendirilmesi

Derişim (M)	4.61×10^{-8}	Ort Bulunan GRA (mg) (n=3)	3,015
		ss	0,034
		% BSS	1,14
		% Geri Kazanım	100,50
	7.68×10^{-8}	Ort Bulunan GRA (mg) (n=3)	3,087
		ss	0,043
		% BSS	1,41
		% Geri Kazanım	102,90
	1.92×10^{-7}	Ort Bulunan GRA (mg) (n=3)	3,030
		ss	0,014
		% BSS	0,46
		% Geri Kazanım	101,02
	Tüm derişimler için	Ort Bulunan GRA (mg) (n=9)	3,044
		GA (%95)	$\pm 0,24$

Ort: Ortalama, n: Deney sayısı, ss: Standart sapma, % BSS: % Bağıl standart sapma, GA (%95): %95 olasılıkla güven aralığı

Geliştirilen YPSK yönteminde hesaplanan %geri kazanım değerleri USP39'da belirtilen sınırlar içerisinde ve bu yöntemin de GRA'nın ampullerinden miktar tayini uygulanabilir olduğu gösterilmiştir.

5.5. Yöntemlerin Karşılaştırılması

Geliştirilen yöntemlerin karşılaştırılabilmesi için t ve F testleri kullanılmıştır.

Yöntemlerin ortalamalarının t testi ile karşılaştırılabilmesi için yöntemlerin uygulandığı farmasötik preparatların analizlerinden hesaplanan %geri kazanım değerleri kullanılmıştır.

Yöntemlerin kesinliklerinin karşılaştırılabilmesi için ise yöntemlerin kesinlik deneylerinde hesaplanan standart sapma değerleri kullanılmıştır.

Yöntemler için hesaplanan değerler ve tablodan bulunan değerler Çizelge 5.23.'te sunulmuştur.

Çizelge 5.23. Yöntemlerin karşılaştırılması

t_{tablo} (SD = n₁+n₂-2 = 16)	1.746
t_{hesap} (tablet)	0.727
t_{hesap} (ampul)	0.115
F_{tablo} (SD = n-1 = 17)	2.271
F_{hesap}	1.452

SD: Serbestlik derecesi, n: Deney sayısı

Çizelge 5.23.'ten de görüldüğü gibi tabletler ve ampuller için hesaplanan t değerleri, tablodan bulunan t değerinden küçüktür. Böylelikle %95 güven düzeyinde geliştirilen yöntemlerin ortalamaları arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemsiz olduğu söylenebilir. Yöntemlerin kesinliklerini karşılaştırmak için hesaplanan F değeri ise tablodan bulunan F değerinden küçüktür. %95 güven düzeyinde geliştirilen yöntemlerin kesinlikleri arasında istatistiksel olarak fark önemsizdir.

6. SONUÇ, TARTIŞMA ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, GRA'nın piyasada bulunan ampul ve tablet farmasötik formlarından miktar tayini için basit, hızlı ve duyarlı bir KE yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntem ile elde edilen sonuçlar geliştirilen diğer bir yöntem olan YPSK yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Her iki yöntemin de validasyonu gösterilmiş ve sonuçları istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

KE yönteminde deteksiyon 205.5 nm'de DAD ile sağlanmıştır. Ayrım 40 cm efektif (48,5 cm toplam) uzunluğa ve 75 µm iç çapa sahip kapiler ile gerçekleştirilmiştir. En uygun analiz koşulları çalışma tamponu olarak 20 mM fosfat tamponu (pH 2,75) kullanılması ve 22.5 kV potansiyel uygulanması ile elde edilmiştir. Belirtilen koşullarda GRA'nın göç zamanı 6.71 dk ve IS olarak kullanılan MTP'nin göç zamanı 6.94 dk olarak tespit edilmiştir.

YPSK yönteminde deteksiyon flüoresans detektörün uyarma dalga boyu olarak 223 nm'ye yayma dalga boyu olarak da 340 nm'ye ayarlanması ile sağlanmıştır. Ayrım için 150 × 3,0 mm boyutunda ve 5,0 µm partikül çapına sahip C6 fenil bağlı silika kolon kullanılmıştır. Hareketli faz olarak %30 metanol içeren 30 mM asetat tamponu (pH 4,0) 0,85 mL/dk akış hızında kullanılmıştır. Bu koşullarda GRA'nın alıkonma zamanı 4.57 dk ve MTP'nin alıkonma zamanı 2.95 dk olarak belirlenmiştir.

Her iki yöntemin de validasyonu ICH tarafından belirlenen kriterler doğrultusunda doğruluk, kesinlik, doğruluk, duyarlılık, kararlılık, spesifiklik ve sağlamlık parametreleri ile incelenmiştir. KE yöntemi için $1,75 \times 10^{-6}$ M ve $4,50 \times 10^{-7}$ M aralığındaki kalibrasyon çözeltilerinin gün içi ve günler arası değerlendirmeleri sonucu kesim değeri sıfıra yakın ve $r > 0,998$ olan eşitlikler elde edilmiştir. YPSK yöntemi için de $3,4 \times 10^{-7}$ M ve $2,41 \times 10^{-8}$ M aralığında oluşturulan kalibrasyon çözeltilerinin gün içi ve günler arası değerlendirmeleri sonucu kesim noktası sıfıra yakın ve $r > 0,999$ olan eşitlikler elde edilmiştir. İki yöntemin de kalite kontrol standartları ve tablet matriksinde yapılan doğruluk ve kesinlik incelemelerinde %100 dolayında geri kazanım ve %2'nin altında %BSS değerleri elde edilerek geliştirilen yöntemlerin iyi bir doğruluk ve kesinliğe sahip olduğu gösterilmiştir. KE yönteminin gözlenebilme sınırı $1,29 \times 10^{-7}$ M ve tayin sınırı $4,3 \times 10^{-7}$ M, YPSK yönteminin gözlenebilme sınırı $6,13 \times 10^{-9}$ M ve tayin sınırı $2,04 \times 10^{-8}$ M olarak bulunmuştur. Kararlılık çalışmaları sonucunda GRA'nın uygun saklama koşulunun +4°C'de alüminyum folyoya sarılı olarak buzdolabında

bekletilmesi olduğu sonucuna varılmıştır. Tablet ve ampul matriks ortamlarının analizleri sonucunda elde edilen elektroferogram ve kromatogramlarda girişim yapan herhangi bir sinyalin olmadığı ve geliştirilen yöntemlerin GRA analizi için spesifik olduğu sonucuna varılmıştır. Her iki yöntemin sağlamlığının araştırılması için çalışma koşullarında ufak değışimler yapılarak sonuçların etkilenmediğı gösterilmiştir. Son olarak yöntemlerin sistem uygunluğunu göstermek amacı ile N, Rs, As gibi çeşitli parametreler hesaplanmış ve kabul edilen sınırlar içerisinde oldukları gösterilmiştir.

Optimizasyon ve validasyonu gerçekleştirilen yöntemler, GRA'nın 1 mg GRA içeren tabletlerinden ve 3 mg GRA içeren ampullerinden tayinine uygulanmıştır. Her iki yöntem için de yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda analiz sonuçlarının USP39'da belirtilen sınırlar içerisinde olduğu bulunmuştur.

Bu tez çalışması kapsamında geliştirilen yöntemlerin doğrulukları ve kesinlikleri t ve F testleri ile karşılaştırılmış ve aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemsiz olduğu bulunmuştur.

GRA'nın miktar tayinine yönelik yapılan çalışmalar incelendiğinde literatürde GRA'nın KE yöntemi analizinin bulunmadığı görülmüştür. Bu nedenle burada geliştirilen KE yöntemi literatürde bir ilk olacaktır.

Analiz süresi açısından KE yöntemi, literatürdeki pek çok çalışmadan (Boppana, 1995; Hewala, 2010; Hewala, 2011; Maksic, 2016; Wada, 1998; Woo, 2016; Xiang, 2001) daha hızlı bir yöntemdir. Geliştirilen YPSK yöntemi ise 5.5 dk'lık analiz süresi ile bu çalışmalara ek olarak literatürdeki bazı kromatografik yöntemlere (Boppana, 1996; Chen, 2017; Huang, 1998; Pinguet, 1996; Rao, 2012) göre daha üstündür.

Yöntemlerin duyarlılığı açısından her iki yöntemin de literatüre göre daha duyarlı olduğu pek çok çalışma (Chen, 2017; Heda, 2011; Hewala, 2011; Hewala, 2013; Sourı, 2011, Rao, 2012) bulunmaktadır. Flüoresans detektörün DAD'a göre daha duyarlı olması nedeniyle YPSK yönteminde daha düşük duyarlılık düzeyine ulaşılmıştır. Geliştirilen bu yöntemin de yukarıda belirtilen çalışmalar haricinde literatürdeki iki çalışmadan (Hewala, 2010; Jain, 2012) daha duyarlı olduğu görülmüştür. Literatür araştırması sonucunda burada önerilen yöntemlerden daha duyarlı olan yöntemlerin (Boppana, 1996; Jiang, 2016, Nirogi, 2006; Woo, 2016; Xiang, 2001; Zhao, 2015; Zhou, 2014) çoğunlukla MS detektör kullanılan kromatografik yöntemler olduğu görülmüştür.

Burada geliştirilen yöntemlerde kullanılmış olan IS ile çalışmanın güvenilirliği arttırılmış ve olası bazı hataların önüne geçilmiştir. Ayrıca yöntemlerin her ikisi de günümüzde geçerli kılavuzların gerektirdiği şekilde tam olarak valide edilmiştir. Yöntemlerin uygulanması görece daha az karmaşık olan farmasötik preparatlarda yapıldığı için tablet ve ampul örneklerinin hazırlanması aşamasında santrifüj ve filtrasyondan başka bir aşamaya gerek duyulmamıştır.

Bu tez çalışması ile geliştirilen her iki yöntem de basit, ucuz, duyarlı ve hızlı olmaları nedeni ile GRA'nın rutin analizleri için önerilmektedir. Ayrıca burada önerilen yöntemlerin GRA'nın biyolojik sıvılardan tayini için de bir temel oluşturabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

- Allen, A., Asgill, C.C., Pierce, D.M., Upward, J., Zussman, B.D., (1994). Pharmacokinetics and tolerability of ascending intravenous doses of granisetron, a novel 5-HT₃ antagonist, in healthy human subjects. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 46, 159-162.
- Baker, D.R. (1995). *Capillary electrophoresis*. New York: John Wiley&Sons Inc.
- Boppana, V.K. (1995). Simultaneous determination of granisetron and its 7-hydroxy metabolite in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography utilizing fluorescence and electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*, 692, 195-202.
- Boppana, V.K., Miller-Stein, C., Schaefer, W.H. (1996). Direct plasma liquid chromatographic-tandem mass spectrometric analysis of granisetron and its 7-hydroxy metabolite utilizing internal surface reversed-phase guard columns and automated column switching devices. *Journal of Chromatography B*, 678, 227-236.
- Capacio, B.R., Byers, C.E., Jackson, T.K., Matthews, R.L. (1993). An HPLC method for the determination of granisetron in guinea pig plasma. *Journal of Analytical Toxicology*, 17, 151-155.
- Chen, F., Wang, L., Guo, J., Shi, X., Fang, B. (2017). Simultaneous determination of dexamethasone, ondansetron, granisetron, tropisetron and azasetron in infusion samples by HPLC with DAD detection. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 6, 137-141.
- Gündüz, T. (2002). *İnstrümental analiz (6)*. Ankara: Gazi Kitabevi.
- Heda, A.A., Kathiriya, J.M., Gadade, D.D., Puranik, P.K. (2011). Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous determination of granisetron and dexamethasone. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73 (6), 696-699.
- Hamilton, R.J., Sewel, P.A. (1998). *Introduction to high performance liquid chromatography*. New York: Chapman and Hall.
- Hewala, I., El-Fatatreh, H., Emam, E., Mubrouk, M. (2010). Development and application of a validated stability-indicating HPLC method for simultaneous determination of granisetron hydrochloride, benzyl alcohol and their main degradation products in parenteral dosage forms. *Talanta*, 82 (1), 184-195.

- Hewala, I., El-Fatatry, H., Emam, E., Mabrouk, M. (2011). Development and application of a validated stability-indicating high performance liquid chromatographic method using photodiode array detection for simultaneous determination of granisetron, methylparaben, propylparaben, sodium benzoate and their main degradation products in oral pharmaceutical preparations. *Journal of AOAC International*, 94 (5), 1447-1460.
- Hewala, I., I., Bedair, M., M., Shousha, S., M. (2013). First derivative spectrophotometric determination of granisetron hydrochloride in presence of its hydrolytic products and preservative and application to pharmaceutical preparations. *Drug Testing and Analysis*, 5, 234-241.
- Huang, C.T., Chen, K.C., Chen, C.F., Tsai, T.H. (1998). Simultaneous measurement of blood and brain microdialysates of granisetron in rat by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 716, 251-255.
- Jain, R., Sharma, R. (2012). Cathodic adsorptive stripping voltammetry of anti-emetic agent granisetron in pharmaceutical formulation and biological matrix. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2 (6), 443-449.
- ICH Steering Committee (2005) *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, Q2(R1). Harmonized Tripartite Guideline.
- Jiang, Y., Lin, M., Fan, G., Chen, Y., Li, Z., Zhao, W., Wu, Y., Hu, J. (2006). Rapid determination of granisetron in human plasma by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry and its application to bioequivalence study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 42, 464-473.
- Kayaalp, S.O., (2009). *Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji (12)*. Ankara: Pelikan Yayıncılık.
- Kudoh, S., Sato, T., Okada, H., Kumakura, H., Nakamura, H. (1994). Simultaneous determination of granisetron and 7-hydroxygranisetron in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 660 (1), 205-210.
- Maksic, J., Tumpa, A., Stajic, A., Jovanovic, M., Rakic, T., Jancic-Stojanovic, B. (2016). Hydrophilic interaction liquid chromatography in analysis of granisetron HCl and its related substances. Retention mechanisms and method development. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 123, 93-103.

- Nirogi, R.V.S., Kandikere, V.N., Shukla, M., Mudigonda, K., Maurya, S., Boosi, R. (2006). Quantification of granisetron in human plasma by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 20, 888-897.
- Pinguet, F., Bressolle, F., Martel, P., Salabert, D., Astre, C. (1996). High-performance liquid chromatographic determination of granisetron in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 675, 99-105.
- Prabu, S.P., Selvamani, P., Latha, S. (2010). HPTLC method for quantitative determination of granisetron hydrochloride in bulk drug and in tablet. *Latin America Journal of Pharmacy*, 29 (8), 1455-1458.
- Rao, S.V.V., Ramu, G., Kumar, D.R., Rambabu, C. (2012). A new isocratic RP-HPLC method development for the assay of granisetron HCL in API and dosage forms. *Rasayan Journal of Chemistry*. 5 (2), 229-233.
- Souri, E., Kargar, Z., Saremi, S., Ravari, N.S., Alvandifar, F., Amanlou, M. (2011). Development and validation of a stability indicating HPLC method for determination of granisetron. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 58, 443-449.
- Wada, I., Satoh, M., Takeda, T., Nakabayashi, T., Honma, T., Saitoh, H., Takada, M., Hirano, K. (1998). A rapid assay of granisetron in biological fluids from cancer patients. *Biol. Pharm. Bull.*, 21 (5), 535-537.
- Woo, J., S. (2006). Nasal absorption studies of granisetron in rats using a validated high-performance liquid chromatographic method with mass spectrometric detection. *Archives of Pharmacol Research*, 30 (6), 778-784.
- Xiang, S., Wang, W., Xiang, B., Deng, H., Xie, S. (2007). Periodic modulation-based stochastic resonance algorithm applied to quantitative analysis for weak liquid chromatography-mass spectrometry signal of granisetron in plasma. *International Journal of Mass Spectrometry*, 262 (3), 174-179.
- Zhao, Y., Chen, H.J., Caritis, S., Venkataramanan, R. (2015). Development and validation of a sensitive liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the simultaneous analysis of granisetron and 7-hydroxy granisetron in human plasma and urine samples: application in a clinical pharmacokinetic study in pregnant subject. *Biomedical Chromatography*, 30, 149-154.
- Zhou, Y., Jiang, J., Hu, P., Wang, H. (2014). A high-performance liquid

chromatography-tandem mass spectrometry method coupled with protein precipitation for determination of granisetron in human plasma and its application to a comparative pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*, 28, 1597-1600.

U.S. Pharmacopeia National Formulation 39 (2016). *The National Formulary* 34 (2.baskı). Rockville: United States Pharmacopeial Convention.

http-1: <http://www.rxlist.com/sancuso-drug.htm> (Erişim tarihi: 01.12.2017)

http-2: <http://www.rxlist.com/kytril-drug.htm> (Erişim tarihi: 01.12.2017)

http-3: <http://theses.ulaval.ca/archimede/fichiers/24330/apa.html> (Erişim tarihi: 01.12.2017)

http-4: <http://www.laboratory-journal.com/applications/analytics/hplc-analysis> (Erişim tarihi: 01.12.2017)

http-5: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00889> (Erişim tarihi: 01.12.2017)

http-6: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/compound/inspect/CHEMBL1237080> (Erişim tarihi: 01.12.2017)