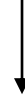


Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**ROSUVASTATİN TAYİNİ İÇİN YENİ BİR YÜKSEK
PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİ**

SENA ÇAĞLAR

**DANIŞMAN
DOÇ.DR.SİDİKA TOKER**

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA DOKTORA PROGRAMI**

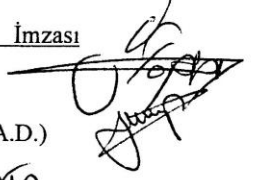
İSTANBUL-2011

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya Programında Sena ÇAĞLAR tarafından hazırlanan Rosuvastatin Tayini için Yeni bir Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi başlıklı Doktora tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

28 / 01 / 2011

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Prof.Dr.Gülaçtı TOPÇU (İstanbul Teknik Üniv., Fen Fak., Organik Kimya A.D.)	
2.Prof.Dr.Serap SAĞLIK ASLAN (İstanbul Üniv., Eczacılık Fak., Analitik Kimya A.D.)	
3.Doç.Dr.Sıdika TOKER (İstanbul Üniv., Eczacılık Fak., Analitik Kimya A.D.)	
4.Doç.Dr.Sevgi TATAR ULU (İstanbul Üniv., Eczacılık Fak., Analitik Kimya A.D.)	
5.Doç.Dr.Armağan ÖNAL (İstanbul Üniv., Eczacılık Fak., Analitik Kimya A.D.)	

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Sena Çağlar

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının yapılmasına imkan sağlayan, desteğini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Sn.Prof. Dr.Aysel Öztunç’a, bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren, motive eden, çalışmama her şekilde destek olan Tez Danışmanım Sn. Doç.Dr. Sıdıka Toker’e,

Çalışmamın son aşamalarında projesiyle bana destek sağlayan Sn. Doç.Dr. Sevgi Ulu’ya, benden desteğini ve dostluğunu esirgemeyen Sn. Doç.Dr. Armağan Önal’a, yardımlarını eksik etmeyen Sn. Doç.Dr. Zeynep Aydoğmuş’a ve Anabilim Dalımızın diğer öğretim üyelerine,

Bana her türlü yardımlarıyla destek olan araştırma görevlisi arkadaşlarım Mehmet Boğa, Ferhat Sarı, Pelin Köseoğlu ve yüksek lisans öğrencimiz Gamze Ergin’e,

Anabilim Dalı kapılarını sonuna kadar açarak yardımlarını esirgemeyen Farmasötik Toksikoloji A.D. öğretim üyeleri Sn. Prof. Dr. Buket Alpertunga, Sn. Doç.Dr. Gül Özhan ve Sn. Yard. Doç.Dr. Sibel Özden’e,

Bugüne kadar bana emeği geçen bütün hocalarıma,

Bütün hayatım boyunca beni destekleyen, arkamda duran, herşeyimi borçlu olduğum çok sevdiğim annem Sema Çağlar, babam Mustafa Çağlar, ablam Nesteren Düz, manevi ağabeyim Ali Düz ve ağabeyim Tarık Çağlar’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1920

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	Xİİİ
Çağlar, S. (2011). Rosuvastatin Tayini için Yeni bir Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya ABD. Doktora Tezi. İstanbul.	xiii
ABSTRACT.....	XİV
Çağlar, S. (2011). A New High Performance Liquid Chromatographic Method for Determination of Rosuvastatin. İstanbul University, Institute of Health Science, Analytical Chemistry Department. Doktora Tezi. İstanbul.	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hiperlipidemi	3
2.2. Hiperlipidemi ile Ateroskleroz Arasındaki İlişki.....	3
2.3. Lipoproteinler ve Hiperlipoproteinemiler Hakkında Genel Bilgiler	4
2.3.1. Plazma lipitleri ve lipoprotein fraksiyonları ve hücrel lipoprotein reseptörleri	4
2.3.2. Lipoprotein tipleri	5
2.4. Antihiperlipidemik İlaçlar.....	6
2.5. Antihiperlipidemik İlaçların Sınıflandırılması.....	6
2.6. HMG-KoA Redüktaz İnhibitörleri (Statinler)	6
2.7. Rosuvastatin Kalsiyum	8
2.7.1. Farmakolojisi	8
2.7.2. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	10
2.7.3. Rosuvastatin için Geliştirilmiş Analiz Yöntemleri	11
2.7.3.1. Spektrofotometrik ve Dansitometrik Yöntemler.....	11

2.7.3.2. HPLC ile Tablet Analizleri	13
2.7.3.3. HPLC ile Biyolojik Sıvı Analizleri	14
2.8. 9-Antrildiazometan (ADAM) Belirteci Hakkında Genel Bilgi ve Bu Belirteçle Yapılan Çalışmalar.....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler	23
3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler	23
3.1.2. Çözeltiler.....	23
3.2. Aletler ve Diğer Gereçler.....	24
3.3. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi İle İlgili Çalışmalar.....	25
3.3.1. Rosuvastatinin kalsiyum tuzunu baz hale dönüştürmek için uygun koşulların saptanması.....	25
3.3.2. Türevlendirme için Reaksiyon Koşullarının İncelenmesi.....	26
3.3.2.1. Reaksiyon süresi ve sıcaklık	26
3.3.2.2. Belirteç miktarı.....	27
3.3.3. Rosuvastatinin HPLC ile Analizi	27
3.3.3.1. Kolon, Mobil Faz ve Dedektör Dalga Boyları Seçimi	27
3.3.3.2. İç Standart (IS) Seçimi	27
3.3.3.3. Sulu Çözeltide Ölçü Eğrilerinin Hazırlanması.....	28
3.3.3.4. Rosuvastatinin Serumdan Ekstraksiyonu	28
3.3.3.5. Serumda Ölçü Eğrilerinin Hazırlanması	31
3.3.3.6. Serumdan Geri Kazanım Oranının Hesaplanması	31
3.4. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu	31
3.4.1. Seçicilik.....	31
3.4.2. Aralık ve Doğrusallık.....	32
3.4.3. Doğruluk	32
3.4.4. Tekrarlanabilirlik (Kesinlik)	33
3.4.5. Tayin sınırı (LOQ) ve Gözlenebilme Sınırı (LOD)	33
3.4.6. Türev Stabilesi	34
3.5. Tabletlerde Rosuvastatin Miktar Tayini	34
3.5.1. Geliştirilen HPLC Yöntemi ile Miktar Tayini	34
3.5.2. Kıyas Yöntemi ile Miktar Tayini	34
3.6. Serumda Rosuvastatin Miktar Tayini ve Farmakokinetik Uygulaması.....	35

4. BULGULAR.....	36
4.1. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi İle İlgili Çalışmalar.....	36
4.1.1. Rosuvastatinin kalsiyum tuzunu baz hale dönüştürmek için uygun koşulların saptanması.....	36
4.1.2. Rosuvastatin ile ADAM Arasındaki Reaksiyon Koşullarının İncelenmesi.....	36
4.1.2.1. Reaksiyon süresi ve sıcaklık	37
4.1.2.2. Belirteç miktarı.....	38
4.1.3. Rosuvastatinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Analizi	39
4.1.3.1. Kromatografik Koşulların Belirlenmesi.....	40
4.1.3.2. IS Seçimi	40
4.1.3.3. Sulu Çözeltide Hazırlanan Ölçü Eğrilerinin Regresyon Analizi.....	41
4.1.3.4. Serumdan Ekstraksiyon İşlemi.....	43
4.1.3.5. Serumda Hazırlanan Ölçü Eğrilerinin Regresyon Analizi.....	43
4.1.3.6. Serumdan Geri Kazanım Oranı	46
4.2. Yöntem Validasyonu	46
4.2.1. Seçicilik.....	46
4.2.2. Doğrusallık Aralığı	48
4.2.3. Doğruluk	48
4.2.4. Tekrarlanabilirlik (Kesinlik)	50
4.2.5. Tayin sınırı (LOQ) ve Gözlenebilme Sınırı (LOD)	54
4.2.6. Türev Stabilesi	54
4.3. Geliştirilen Yöntemin Tabletlerde Rosuvastatin Miktar Tayinine Uygulanması ve Sonuçların Kıyas Yöntemi İle Elde Edilen Sonuçlarla Karşılaştırılması.....	55
4.4. Geliştirilen Yöntem ile Serumda Rosuvastatin Tayini ve Farmakokinetik Parametrelerinin Hesaplanması	56
5. TARTIŞMA	60
KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ	72

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1 Rosuvastatin kalsiyum tuzunun baz hale dönüştürülmesi için denenen sıvı-sıvı ekstraksiyon çeşitleri.....	26
Tablo 3-2 Serumdan ekstraksiyon çalışmalarında denenen yöntemler ve kullanılan çözücü sistemleri.....	30
Tablo 4-1 Rosuvastatin kalsiyum tuzundan baza ekstraksiyon çalışmalarında elde edilen sonuçlar.....	36
Tablo 4-2 Rosuvastatin-ADAM türevlerinin belirli bekleme süreleri sonrasındaki pik alanları	38
Tablo 4-3 Çeşitli mol oranlarında oluşturulan türevin pik alanları	39
Tablo 4-4 Gradient Program	40
Tablo 4-5 Rosuvastatinin 0,01-20 ng/mL konsantrasyon aralığında sulu çözeltide hazırlanan ölçü eğrilerine ait pik alan oranları değerleri ve istatistik verileri	42
Tablo 4-6 Tablo 4-5 deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler	43
Tablo 4-7 Ölçülen alan değerleri ve bunların elde edildiği çözücü karışımları.....	43
Tablo 4-8 Rosuvastatinin 0,01-20 ng/mL konsantrasyon aralığında katkılı serumda hazırlanan ölçü eğrilerine ait pik alan oranları değerleri ve istatistik verileri	45
Tablo 4-9 Tablo 4-8 deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler	45
Tablo 4-10 Rosuvastatinin serumdan geri kazanımı.....	46
Tablo 4-11 Sulu çözeltide doğruluk ve geri kazanım değerleri.....	49
Tablo 4-12 Serumda doğruluk ve geri kazanım değerleri	50
Tablo 4-13 Aynı gün içinde sulu çözeltide yapılan rosuvastatin analizlerinin tekrarlanabilirliği	51
Tablo 4-14 Aynı gün içinde serumda yapılan rosuvastatin analizlerinin tekrarlanabilirliği	52
Tablo 4-15 Farklı günlerde sulu çözeltide yapılan rosuvastatin analizlerinin tekrarlanabilirliği	53
Tablo 4-16 Farklı günlerde serumda yapılan rosuvastatin analizlerinin tekrarlanabilirliği	54
Tablo 4-17 Oda sıcaklığında gün ışığında ve karanlıkta, +4°C de karanlıkta bekletilen Rosuvastatin-ADAM türevinin stabilitesi	55

Tablo 4-18 20 mg rosuvastatin içeren tabletlerin analiz sonuçları ve sonuçların istatistiki olarak değerlendirilmesi	56
Tablo 4-19 Serum Rosuvastatin Konsantrasyonunun Zamana Karşı Değişimi	58
Tablo 4-20 1 adet Crestor® 20mg tablet alımından sonra hesaplanan farmakokinetik parametreler	58

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2:1 Rosuvastatin kalsiyum'un kimyasal formülü	10
Şekil 2:2 Rosuvastatinin 8 µg/mL konsantrasyonda asetonitril çözeltisindeki UV spektrumu.....	10
Şekil 2:3 Rosuvastatinin FT-IR spektrumu	11
Şekil 2:4 ADAM belirtecinin kimyasal formülü	18
Şekil 4:1 Rosuvastatin ile ADAM arasında gerçekleşen türevlendirme reaksiyonu	37
Şekil 4:2 Reaksiyon süresi grafiği	38
Şekil 4:3 Rosuvastatinin ADAM türevinin oluşumu üzerine belirteç miktarının etkisi.	39
Şekil 4:4 Lovastatinin kimyasal formülü.....	41
Şekil 4:5 Rosuvastatinin 0,01-20 ng/mL konsantrasyon aralığında sulu çözeltide hazırlanan ölçü eğrisi	42
Şekil 4:6 Rosuvastatinin 0,01-20 ng/mL konsantrasyon aralığında katkılı serumda hazırlanan ölçü eğrisi	44
Şekil 4:7 Boş sulu çözeltiye ait kromatogram	46
Şekil 4:8 10 ng/mL rosuvastatin ve 500 ng/mL iç standart katkılı sulu çözelti örneğine ait kromatogram.....	47
Şekil 4:9 Boş serum örneğine ait kromatogram.....	47
Şekil 4:10 15 ng/mL rosuvastatin ve 500 ng/mL iç standart katkılı serum örneğine ait kromatogram.....	48
Şekil 4:11 Serumda Rosuvastatin Konsantrasyonunun Zamana Karşı Değişimi	57
Şekil 4:12 20 mg tek doz rosuvastatin kalsiyum alan sağlıklı gönüllüden 4 saat sonra alınan serum örneğine ait kromatogram	59
Şekil 4:13 20 mg tek doz rosuvastatin kalsiyum alan sağlıklı gönüllüden 72 saat sonra alınan serum örneğine ait kromatogram	59

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

YDL: Yüksek Dansiteli Lipoprotein

HMG KoA: Hidroksi-Metil-Glutaril-Koenzim-A

KKH: Koroner Kalp Hastalığı

HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

ADAM: 9-Antrildiazometan

Apo-B: Apoprotein B

DDL: Düşük Dansiteli Lipoprotein

ÇDDL: Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

ICH: Uluslar arası Harmonizasyon Konferansı

C_{maks} : Maksimum Plazma Konsantrasyonu

AUC_{24} : Konsantrasyon-Zaman Eğrisi Altındaki Kararlı Hal Alan Ortalaması

t_{maks} : C_{maks} a Ulaşma Zamanı

UV: Ultraviyole

HPTLC: Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi

MS: Kütle Spektrometrik

LC-MS/MS: Tandem Kütle Spektrometrik Sıvı Kromatografik

ESI: Elektro Sprey İyonizasyon

SPE: Katı-Faz Ekstraksiyon

EA: Etil Asetat

MTBE: Metil Tersiyer Butil Eter

IS: İç Standart

SD: Standart Sapma

RSD: Bağlı Standart Sapma

RME: Bağlı Ortalama Hata

ÖZET

Çağlar, S. (2011). Rosuvastatin Tayini için Yeni bir Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Anahtar Kelimeler: Rosuvastatin, 9-Antrildiazometan (ADAM), Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi, Türevlendirme, Serum

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1920

Rosuvastatin etkilerini hidroksi-metil-glutaril-koenzim-A redüktaz enzimini inhibe ederek gösteren statin grubu antihiperlipidemik ilaçların en yeni, en etkili ve en çok kullanılan üyelerinden biridir. Tabletlerdeki kullanım dozları ve kandaki konsantrasyonları düşük olan rosuvastatin için oldukça hassas miktar tayini yöntemlerine ihtiyaç vardır. Bu çalışmada rosuvastatinin tabletlerde ve serumda tayini için spektrofotometrik dedeksiyona dayanan basit ve hassas bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirilmiştir. Yöntem, rosuvastatinin içerdiği asit grubunun 9-Antrildiazometan belirteci ile verdiği reaksiyona dayanmaktadır. Oda sıcaklığında karanlıkta 1 saat bekleme ile gerçekleşen türevlendirme reaksiyonundan sonra kromatografik ayrılma C₁₈ kolonda (250 x 4,6 mm, 4 µ i.d.), 1 mL/dak akış hızında asetonitril/su karışımının gradient uygulanması ile gerçekleştirilmiştir. İç standart olarak lovastatin seçilmiş ve dedeksiyon 366 nm eksitasyon 410 nm emisyon dalga boylarında yapılmıştır. Serumdan analizlerde örnekler etil asetat-metil tersiyer butil eter (1:1) karışımı ile ekstre edilmiştir. Standart sulu çözeltilerde ve katkılı serum örneklerinde konsantrasyona karşılık pik alan oranları kullanılarak elde edilen ölçü eğrileri 0.01-20 ng/mL konsantrasyon aralığında hazırlanmış, tayin sınırı ve gözlenebilirlik sınırları sırasıyla 0,00068 ve 0,0023 ng/mL bulunmuştur. Serumda yapılan analizlerde gün-içi ve günler-arası bağıl standart sapma değerleri sırasıyla % 0,35-3,96 ve % 0,20-4,71 olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemle rosuvastatinin tabletlerdeki miktar tayini çalışılmış ve sonuçlar literatürdeki yöntemle % 95 olasılık düzeyinde kıyaslanmıştır. Yöntemin klinik uygulanabilirliğini test etmek amacıyla, sağlıklı bir gönüllünün 20 mg ilaç almasının ardından rosuvastatinin farmakokinetiği incelenmiş ve ilacın maksimum plazma konsantrasyonu, bu konsantrasyona ulaşma süresi ve eliminasyon yarılanma ömrü sırasıyla 17,5 ng/mL, 3,5 ve 18,09 saat olarak bulunmuştur.

ABSTRACT

Çağlar, S. (2011). A New High Performance Liquid Chromatographic Method for Determination of Rosuvastatin. İstanbul University, Institute of Health Science, Analytical Chemistry Department. Doktora Tezi. İstanbul.

Anahtar Kelimeler: Rosuvastatin, 9-Anthryldiazomethane (ADAM), High Performance Liquid Chromatographic Method, Derivatization, Serum

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No.1920

Rosuvastatin is one of the most effective, widely used and the newest member of statin group of antihyperlipidemic drugs which shows its effects by inhibiting hydroxy methyl glutaryl coenzim A reductase enzyme. Low amount of rosuvastatin active ingredient in tablets and low plasma concentrations of rosuvastatin observed after oral administration require implementation of sensitive quantitation methods for rosuvastatin. In this study, a sensitive high performance liquid chromatographic method with spectrofluorimetric detection was developed for determination of rosuvastatin in tablets and serum. The method is based on the reaction of acid group of rosuvastatin with 9-Anthryldiazomethane reagent. The reaction proceeds quantitatively at room temperature in dark with a reaction time of 1 hour. Chromatographic separation was achieved by using C₁₈ column (250 x 4,6 mm, 4 µ i.d.) and acetonitrile-water mixture in gradient elution mode at a flow rate of 1,0 ml/min. Lovastatin was chosen as internal standard and detection was carried out at 366 nm for excitation and 410 nm for emission wavelength. Serum samples were extracted with ethyl acetate: methyl tertiary buthyl ether (1:1) mixture. Calibration curves of standard solutions and spiked serum samples were obtained by using the ratio of concentration versus peak areas in concentration range of 0.01-20 ng/ml and LOQ and LOD values were found as 0,00068 and 0,0023 ng/mL respectively. Interday-intraday relative standard deviation values of standard solutions and serum analyses were calculated as 0,35-3,96 % and 0,20-4,71 %, respectively. The determination of rosuvastatin in tablets was calculated and the results were compared with literature method with 95 % probability level. To test suitability of the developed methods for clinic use, pharmacokinetics of rosuvastatin was investigated after oral administration of a 20 mg rosuvastatin film tablet by a healthy volunteer and maximum plasma concentration (C_{max}), time to reach that concentration (t_{max}) and elimination half life ($t_{1/2}$) were found to be 17,5 ng/mL, 3,5 and 18,09 hour, respectively.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Son yıllarda teknolojik gelişmelere paralel olarak fiziksel aktivitenin azalması ve hayvansal ürün tüketiminin artışı, insanlar için hiperlipidemi tehdidini arttırmaktadır. Lipitler organizmada önemli fonksiyonlarda görev aldıkları ve hücre membranlarının yapı taşı olduklarından, metabolizmalarının doğru işleyişi oldukça önem kazanmaktadır. Hiperlipidemi; lipit metabolizmasının primer bozukluğu şeklinde olabildiği gibi, bazen de sekonder hiperlipidemi şeklinde ortaya çıkarak ateroskleroza ve koroner kalp hastalığına (KKH) yol açabilmektedir. KKH Türkiye’de başta gelen morbidite ve mortalite nedenidir ve Türk halkında bu hastalık için en önemli risk faktörlerinden biri total/yüksek dansiteli lipoprotein (YDL) kolesterol oranıdır [1, 2]. KKH’den korunma için uygulanacak tedavide hiperlipideminin düşürülmesi hedeflenir. Lipit düşürücü ilaç gruplarından olan statinler (Hidroksi-metil-glutaril-koenzim-A (HMG KoA) redüktaz inhibitörleri) yüksek kan kolesterol düzeylerinden dolayı kardiyovasküler hastalık riski taşıyan kişilerde kolesterolü düşürmek için kullanılırlar ve bu grup ilaçlar hiperlipidemi tedavisinde 1987 yılından beri kullanılan en etkili ilaçlardır.

Rosuvastatin statin grubu ilaçların en yeni ve en çok kullanılan üyelerinden biridir. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) oral yoldan 5-40 mg/gün rosuvastatini primer hiperkolesterolemi, karma dislipidemi ve izole hipertrigliseridemi dâhil değişik lipit bozukluklarının tedavisinde kullanılmak üzere 12 Ağustos 2003’de onaylamıştır.

Rosuvastatin etkisini, diğer statin grubu antihiperlipidemik ilaçlar gibi HMG-KoA redüktaz enzimini selektif ve kompetitif şekilde inhibe etmek suretiyle karaciğerde kolesterol sentezini azaltarak gösterir [3]. Karaciğer hücrelerinde kolesterol düzeylerinin düşmesi ile düşük dansiteli kolesterolün (DDL) dolaşımdan karaciğere geri alımı artar ve böylece dolaşımdaki DDL kolesterol, trigliserit ve total kolesterol düzeyleri düşer.

Rosuvastatinin biyoyararlanımı % 20 dir. Plazma proteinlerine % 80 oranında bağlanır ve neredeyse değişmeden % 90 ı feçes yoluyla % 10 u da renal yoldan atılır.

Rosuvastatinin hem tabletlerdeki kullanım dozunun hem de biyoyararlanımının düşük olması nedeniyle kandaki konsantrasyonu da düşüktür. Bu nedenle rosuvastatinin

biyolojik sıvılardaki analizi için hassas yöntemlere ihtiyaç vardır. UV dedeksiyonlu yöntemlerle kandaki düşük değerleri tayin etmenin zorluğu bilinmektedir. Bu konuda kütle spektrometrik dedektörlerle yapılan hassas çalışmalar mevcuttur ancak bu cihazlar günümüzde hala oldukça pahalı ve her laboratuvarında bulunamayacak cihazlardır. Bunlar göz önüne alındığında maddenin türevlendirilmesiyle geliştirilecek ve yeterli hassasiyete sahip yöntemler bu alandaki kolay, güvenilir ve hassas yöntem ihtiyacını karşılayacaktır.

Bu tez çalışmasının amacı, rosuvastatinin ilaç laboratuvarlarında rutin analizi için fluorimetrik dedeksiyon metodu ile tayinine olanak sağlayacak ve biyoyararlanım-biyoeşdeğerlik çalışmalarında kolaylıkla kullanılabilen yeni bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi geliştirmektir.

Rosuvastatin yapısında karboksilik asit grubu taşıyan bir etken maddedir. Bu tez çalışmasında rosuvastatinin karboksilik asit grubundan 9-antrildiazometan (ADAM) belirteci ile türevlendirilmesine dayanan hem tabletlerden hem de serum örneklerinden analizlerinde kullanılabilen, basit, seçici ve hassas bir yöntemin geliştirilmesi planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hiperlipidemi

Son yıllarda teknolojik gelişmelere paralel olarak fiziksel aktivitenin azalması ve hayvansal ürün tüketiminin artışı, insanlar için hiperlipidemi tehdidini arttırmaktadır. Lipitler organizmada önemli fonksiyonlarda görev aldıklarından ve hücre membranlarının yapı taşı olduklarından, metabolizmalarının doğru işleyişi oldukça önem kazanmaktadır. Hiperlipidemi; lipit metabolizmasının primer bozukluğu şeklinde olabildiği gibi, bazen de sekonder hiperlipidemi şeklinde ortaya çıkarak ateroskleroza ve KKH'a yol açabilmektedir. DDL kolesterol, trigliserit, apoprotein B100, lipoprotein (a) düzeylerinin yüksekliği veya YDL kolesterol ve apoprotein A1 düzeylerinin düşüklüğünün hiperlipidemi gelişiminde önemli olduğu bilinmektedir. Hiperlipidemisinin denetiminde sigarayı bırakma, doğru beslenme, fiziksel aktivite artışı gibi yaşam tarzı değişikliklerinin yanı sıra ilaçlı tedavilerin de başarı oranı oldukça yüksektir [4].

Hiperlipidemiler lipit metabolizmasının primer bir bozukluğu şeklinde meydana geldikleri gibi bazı hastalıklara bağlı olarak ikincil hiperlipidemi şeklinde de ortaya çıkabilirler. İkincil olarak hiperlipidemi yapan etkenler arasında diabetes mellitus, nefrotik sendrom, hipotiroidizm, hipopitüvitarizm, alkolizm, kronik karaciğer hastalıkları (bilyer gibi) ve bazı ilaçlarla uzun süren tedavi (oral kontraseptifler, tiazid türevi diüretikler ve glukokortikoidler gibi) bulunur [2,4-6].

2.2. Hiperlipidemi ile Ateroskleroz Arasındaki İlişki

Ateroskleroz ve onun en yaygın ve ölümcül sonucu olan KKH ile hiperkolesterolemi arasında yakın bir ilişki olduğu birçok epidemiyolojik incelemede inandırıcı bir şekilde gösterilmiştir.

Plazmada total kolesterol ve onun en büyük ögesi olan düşük dansiteli lipoprotein (DDL) ile ateroskleroz arasındaki ilişkiyi gösteren epidemiyolojik ve diğer tür bulgular şunlardır: *i)* ateroskleroza bağlı arter hastalığı özellikle koroner hastalığı olan hastalar, kendi yaş gruplarındaki sağlıklı hastalara oranla daha yüksek serum kolesterol düzeyi gösterirler *ii)* serum kolesterol düzeyi yüksek olan toplumlarda ateroskleroz ve onun komplikasyonları daha sık görülür *iii)* deney hayvanlarını kolesterolden zengin olan ve böylece serum kolesterol düzeyini yükselten diyetle beslemek suretiyle, onların arterlerinde aterosklerotik lezyonlar oluşturmak mümkündür *iv)* aterosklerozlularda intima altında toplanan, kolesterolden zengin

lipitlerin oluşturdukları aterom plaklarında lipit bileşimi, serumdaki lipitlerin bileşimine paralellik gösterir [2,4-6].

2.3. Lipoproteinler ve Hiperlipoproteinemiler Hakkında Genel Bilgiler

2.3.1. Plazma lipitleri ve lipoprotein fraksiyonları ve hücresel lipoprotein reseptörleri

Plazmadaki temel lipitler kolesterol, trigliseridler ve fosfolipitlerdir. Bunlar tek başlarına suda     nmeyen ve plazmada     nm ş olarak taşınma olanağı bulunmayan maddelerdir. Plazmada oldukları gibi değil özel apoproteinlerle birleşmek suretiyle oluşturdukları     nm ş lipoprotein (lipit-protein kompleksi) adlı yuvarlak partiküller halinde bulunurlar. Bu partiküllerin çapı türüne göre değişiklik gösterir ve genellikle 10 nm nin altındadır. Bu duruma göre lipoproteinler büyüklük olarak alyuvarlardan çok daha ufaktırlar; ışık mikroskopuyla görülemezler; elektron mikroskopuyla görülebilirler. Lipoprotein küresel partikülü, yüzlerce lipit ve protein molekülünden oluşur ve partikülün bir öz bir de kabuk kısmı vardır. Kolesterol esterleri (kolesteril linoleat ve oleat gibi) ve trigliseridler gibi suda     nmeyen hidrofobik moleküller öz kısmında yer alırlar. Fosfolipitler, serbest kolesterol gibi hem suda ve hem de lipitte     nen lipitler ve hidrofilik nitelikte olan apoproteinler plazma suyuyla temasta olan kabuk kısmında yer alırlar ve lipoprotein partikülünün plazmada asılı kalmasını sağlarlar. Apoproteinler lipoproteinlerin vücutta taşınma, dağılma ve metabolize edilmelerinin düzenlenmesinde kritik bir öneme sahiptirler. Lipoprotein partikülünde lipit ve apoprotein molekülleri stabil bir kompleks oluşturur.

Vücutta lipoproteinlerin hücreler arasında taşınmasında ve hücrelere alınmasında en önemli rolü oynayan apoproteinler apoprotein B (apo-B) lerdir. Bunlardan Apo-B100 karaciğer hücresinde sentez edilen trigliseridin ve kolesterolün çok düşük dansiteli lipoprotein ( DDL) yapısı şekline getirilmesini sağlar. Böylece karaciğer hücresi içinde sentez edilen yağ asitleri enerji kaynağı olarak kullanılmak üzere  DDL şeklinde kas ve yağ hücrelerine sevk edilirler bu hücreler tarafından trigliseridler alındıktan sonra küçülmüş olan  DDL partikülü düşük dansiteli lipoproteine DDL'ye dönüşmüş olur. DDL ler kanın kolesterol taşıyan başlıca partikülleridir.

2.3.2. Lipoprotein tipleri

Plazmada elektriksel yükleri, dansiteleri, molekül büyüklükleri ve kolesterol, trigliserid ve fosfolipit oranları farklı olan başlıca beş tip lipoprotein partikülü (molekül kompleksi) bulunur.

- i) *Kilomikronlar*: Besin kaynaklı trigliseridleri taşıyan ve en büyük molekül (mol.ağ. 10^6 - 10^7 kDa) olan lipoproteinlerdir; kütlesinin % 84 kadarını trigliseridler (eksojen) ve % 5 e yakın bir kısmını kolesterol oluşturur.
- ii) *Çok düşük dansiteli lipoproteinler (ÇDDL, beta öncesi lipoproteinler)*: Daha küçük molekül (mol ağ. 5×10^3 kDa) lipoproteinlerdir. Yaklaşık olarak % 50 oranında endojen trigliserid ve % 24 oranında kolesterol içerir. Büyük kısmı karaciğerde serbest yağ asitleriyle gliserolün esterleşmesi apo-B100 ile kombine edilmesi suretiyle oluşturulur. Diyetle fazla karbonhidrat alınması bu öğelerin oluşumunu artırarak ÇDDL yapımını artırır.
- iii) *Orta dansiteli lipoproteinler (ODL)*: Karaciğerden kana salıverilen ÇDDL nin dokularda kapillerlerden geçerken lipofiz sonucu düşük dansiteli lipoproteinlere (DDL) dönüşümü sırasında oluşan kısa ömürlü ara metabolitlerdir; DDL prekürsörüdürler.
- iv) *Düşük dansiteli lipoproteinler (DDL, beta-lipoproteinler)*: ÇDDL'den dönüşüm sonucu oluşan daha ufak molekül ağırlıklı lipoproteinlerdir. Plazmada en önemli kolesterol taşıyıcıdır; plazmadaki total kolesterolün % 60-75 i bu fraksiyon içindedir.
- v) *Yüksek dansiteli lipoproteinler (YDL, alfa-lipoproteinler)*: En ufak molekül (mol ağ. $2-4 \times 10^2$ kDa dolayında olan ve yüksek oranda (% 50 ye yakın) protein içeren lipoproteinlerdir. YDL'ler plazmadan trigliseridlerin ve kolesterolün temizlenmesinde ve kolesterolün dokulardan karaciğere geri taşınmasında ve metabolizmasında önemli rol oynarlar. Plazmada YDL kolesterolü düzeyinin 35 mg/dL (0,9 mmol/L) nin altında olması özelde KKH için ve genelde ateroskleroz gelişmesi için bir risk faktörüdür [4].

2.4. Antihiperlipidemik İlaçlar

Antihiperlipidemik ilaçlar, hiperlipidemili hastalarda kronik olarak ağızdan uygulanmak suretiyle lipideyi azaltan ilaçlardır. Arterlerde ateroskleroz gelişmesini yavaşlatmak, oluşmuşsa ilerlemesini yavaşlatmak ve özellikle KKH riskini azaltmak amacıyla kullanılırlar. Ateroskleroz, intima altında lipit birikmesi ve buna bağlı ikincil olaylarla karakterize bir arter hastalığıdır. Ateroskleroz ve onun, arterini bozduğu organların hastalıkları (kalp, beyin, böbrek vb) sanayileşmiş ülkelerde en başta gelen ölüm nedenlerini oluştururlar. Aterosklerozun en ölümcül yanı KKH insidensini ve ona bağlı mortaliteyi arttırmasıdır; gelişmiş ülkelerde yapılan istatistikler, toplam ölümlerin % 30,7 ile % 35,8 arasındaki bir bölümünün KKH ye bağlı olduğunu göstermiştir [2,4-6].

2.5. Antihiperlipidemik İlaçların Sınıflandırılması

Antihiperlipidemik ilaçların çoğu primer etkilerine göre lipoprotein sentezini azaltanlar ve lipoprotein katabolizmasını arttıranlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar [4,5].

Lipoprotein sentezini azaltanlar

- HMG-KoA Redüktaz İnhibitörleri (Statinler)
- Fibrik Asit Türevleri (Fibratlar)
- Nikotinik Asit (Niasin) ve Türevleri

Lipoprotein katabolizmasını arttıranlar

- Safra Asidi Bağlayan Reçineler (Kolestiramin ve Kolestipol)

2.6. HMG-KoA Redüktaz İnhibitörleri (Statinler)

HMG-KoA redüktaz, insanda hepatik ve ekstra hepatik kolesterol biyosentezinde hız-kısıtlayıcı basamağı oluşturan HMG-KoA'nın mevalonat'a dönüşmesi olayını katalize eder. *Penicillium citrinum*'dan elde edilen mevastatin (kompaktin), *Aspergillus terreus*'tan elde edilen lovastatin ile *Nocardia autotrophica*'dan elde edilen simvastatin fungal kaynaklı doğal statinlerdir; daha sonra pravastatin, atorvastatin ve benzerleri gibi yarı sentetik türevleri yapılmıştır. Bu ilaçlar genellikle ön ilaçlardır ve absorbe edildikten sonra etkin şekillerine dönüştürülürler. HMG-KoA redüktaz enziminin substratı olan HMG-KoA'ya ve onun yarı indirgenmiş metabolitine benzerler; adı geçen enzimi kompetitif bir şekilde inhibe ederler. Bu olay sonucu karaciğer hücresindeki kolesterol ve lipoprotein düzeyinin düşmesi bu

hücrelerin yüzeyindeki DDL reseptörlerinin dansitesinde (sıklığında) artmaya yol açar. Böylece söz konusu ilaçlar hem lipoprotein sentezini azaltmak ve hemde apo-B içeren lipoproteinlerin (başta aterojenik DDL olmak üzere) karaciğer hücrelerine ve diğer hücrelere girişini orada yıkımını (katabolizmasını) artırmak suretiyle kolesterolemiyi düşürürler. Öte yandan antiaterojenik YDL düzeyinde artma yaparlar [2,4,5,6].

Statinler hiperkolesterolemi, familyal apo-B100 eksikliği ve hipertrigliseridemi ile hiperkolesteroleminin birlikte olduğu karma hiperlipidemilerde KKH ve inmeye karşı primer ve özellikle sekonder profilaksi için genellikle düşük dozda kullanılırlar.

DDL düzeyinde yaptıkları düşme, safra asidi bağlayan antihiperlipidemik ilaçların yaptığından fazladır. Bu bakımdan halen en güçlü etki yapan ilaçlardır. Ailesel hiperlipoproteinemili olmayan tip 2 hiperlipoproteinemi olgularında lovastatin ile yapılan incelemeler bu ilacın DDL kolesterol ve total kolesterol düzeyini % 31- 40 oranında düşürdüğünü göstermiştir. Diğer statinler de benzer derecede düşme yaparlar.

HMG-KoA redüktaz inhibitörlerin etkinliklerinin yüksek oluşu ve diğer ilaçlara göre yan etkilerinin daha az oluşu nedeniyle tedavide kullanımları diğer antihiperlipidemik ilaçlara göre daha fazladır. Halen tedavide kullanılmakta olan statinler aşağıdakilerdir:

Atorvastatin

Fluvastatin

Lovastatin

Pitavastatin

Pravastatin

Rosuvastatin

Serivastatin

Simvastatin

2.7. Rosuvastatin Kalsiyum

2.7.1. Farmakolojisi

FDA Endokrinoloji ve Metabolik İlaçlar Danışma Komitesi rosuvastatini (5-40 mg/gün) primer hiperkolesterolemi, karma dislipidemi ve izole hipertrigliseridemi dâhil değişik lipit bozukluklarının tedavisinde kullanılmak üzere 12 Ağustos 2003'te onaylamıştır [3].

Rosuvastatin HMG-KoA redüktaz enziminin selektif ve kompetitif bir inhibitörüdür. Bu enzim insanda hepatik ve ekstra hepatik kolesterol biyosentezinde hız kısıtlayıcı basamağı oluşturan HMG-KoA'nın mevalonat'a dönüşmesi olayını katalize eder. Mevalonat kolesterol de dâhil sterollerin başlangıç maddesidir. HMG-KoA'nın rosuvastatin tarafından selektif bir şekilde inhibe edilmesi mevalonat miktarının azalmasına ve buna bağlı olarak karaciğer hücrelerinde kolesterol düzeylerinin düşmesine neden olur. Bunun sonucunda DDL kolesterolün dolaşımdan hepatik alımı artar ve sonunda dolaşımdaki DDL kolesterol, trigliserit ve total kolesterol düzeyleri düşer. İki plasebolu değişen doz kontrollü çalışmalardan elde edilen bilgilere göre hiperkolesterolemi hastalarında rosuvastatinin etkisi tedavinin ilk iki haftasında gözlenir. İlk iki haftada serum DDL-kolesterol seviyesinde rosuvastatine bağlı % 90 azalma gerçekleşir [7, 9]. Rosuvastatin primer hiperkolesterolemisi olan hastalara günde 5 mg, 10 mg, 20 mg ve 40 mg dozda verildiğinde DDL-kolesterolü, sırasıyla % 45, % 52, % 55 ve % 63 oranında düşürür. Diğer statinlerin yaptığına benzer şekilde, önerilen dozlarda YDL'de orta düzeyde artışa neden olur (% 8-12) [7].

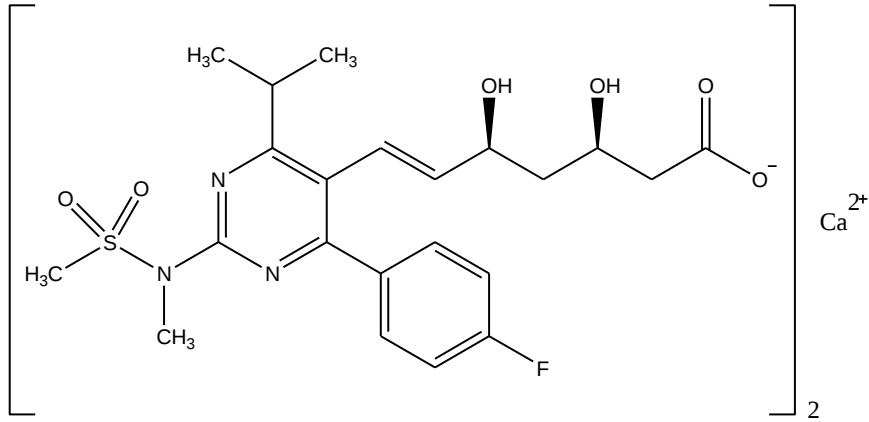
Rosuvastatinin, kendisine özgü yapısal bağlanma yerleri ve diğer statinlerle kıyaslandığında göreceli hipofilikliğı nedeniyle hepatositlere daha iyi penetre olur ve HMG-KoA redüktaz enzimine daha yüksek bir afinite ile bağlanır. HMG-KoA redüktaza yüksek afinite göstermesi, hepatik olmayan dokular tarafından minimal alınırken hepatik hücrelere daha yüksek selektiflik göstermesi nedeniyle, DDL kolesterolü düşürme bakımından halen mevcut diğer HMG-KoA redüktaz enzim inhibitörlerine (örn. atorvastatin, pravastatin, simvastatin) kıyasla daha etkilidir. Hiperkolesterol hastalarının lipit profillerini geliştirmek için yapılan 6–52 hafta süreli denemelerde rosuvastatinin atorvastatin, simvastatin ve pravastatinden üstün olduğu gözlenmiştir. 1 yıl süreli bir doz çalışmasında günde 13,4 mg rosuvastatin alan

hastalarda hedeflenen DDL kolesterol seviyelerine günde 20,8 mg atorvastatin alan hasta sayısından daha çok sayıda hasta ulaşmıştır [7].

Rosuvastatin oral yoldan kullanılır. Biyoyararlanımı yaklaşık % 20'dir. Oral yoldan verildiğinde plazmada doruk konsantrasyona 3-5 saatte ulaşır [9]. Lovastatin ve simvastatin gibi ilaçlarla karşılaştırıldığında, plazmadaki HMG-KoA redüktaz inhibitörü aktivitesinin büyük bölümü (% 90) ana ilaca bağlıdır. Yiyecekler absorpsiyon hızını % 20 oranında azaltır, fakat genel biyoyararlanımını etkilemez [9]. Dozlarının sabah veya akşam alınmasının farmakokinetiği veya kolesterol düzeyini düşürücü etkisi üzerinde herhangi bir etkisi yoktur [11]. Rosuvastatin plazma proteinlerine yaklaşık % 80 oranında bağlanır [9]. Rosuvastatin sınırlı ölçüde N-desmetil metabolitine (etki gücü rosuvastatine göre 7 kat daha az) ve 5 S-lakton ürününe metabolize olur [9]. İnsan hepatik mikrozomları ve insan hepatositleri ile yapılan araştırmalar rosuvastatinin CYP3A4 izoenzimi ile çok az metabolize olduğunu veya hiç metabolize olmadığını göstermiştir [9, 10]. Ayrıca, hepatik metabolizma rosuvastatinin eliminasyonunda çok az etkilidir ve bu nedenle metabolizmalarla ilişkili anlamlı klinik ilaç etkileşimleri de çok azdır. Rosuvastatin esas olarak feçes yoluyla değişmeden (absorbe olmamış bölüm dâhil % 90) itrah edilirken, % 10 kadarı da renal yoldan elimine olur [9]. Absorbe olan dozunun yaklaşık % 70'i safra yoluyla ve % 28 kadarı renal yoldan atılır [9]. Rosuvastatinin plazma eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 20 saattir [9]. Üç, rastgele seçilmiş, plasebo kontrollü, çift körlü denemede 20 mg dan 80 mg a kadar tek dozlarda rosuvastatin alan sağlıklı erkek gönüllülerde rosuvastatinin dozu ile maksimum plazma konsantrasyonu (C_{maks}) ve konsantrasyon-zaman eğrisi altındaki kararlı durum alan ortalaması (AUC_{24}) arasında, alımdan sonra 0-24 saat'e kadar, doğrusal bir ilişki olduğu gözlenmiştir. Kararlı durumda, günde 40 mg rosuvastatin ile 7 günlük tedaviden sonra, C_{maks} 37 $\mu\text{g/L}$ ve C_{maks} a ulaşma zamanı (t_{maks}) 3,5 saattir. Plazma eliminasyon yarı ömrü ($t_{1/2, el}$) 20,8 saattir [7].

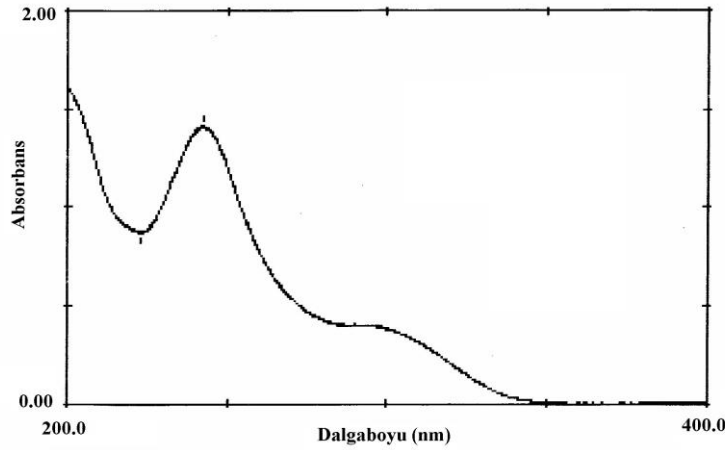
Rosuvastatin diğer statinlerle kıyaslandığında HMG-KoA redüktaz enzimine daha yüksek bir afinite ile bağlanır ve hepatik olmayan dokular tarafından çok az tutulur. Bu nedenle yan etkileri diğer statinlere göre daha düşüktür. 14 faz II/III klinik denemesinde kayıtlı 2579 hastada yapılan analizde, rosuvastatin alan hastaların % 63 ünde yan etkiler gözlenmiştir. En çok görülen yan etkiler; farenjit (% 12,2), ağrı (% 6,7), baş ağrısı (% 6,6), grip sendromu (% 5,3), kas ağrısı (% 5,1) dır.

2.7.2. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

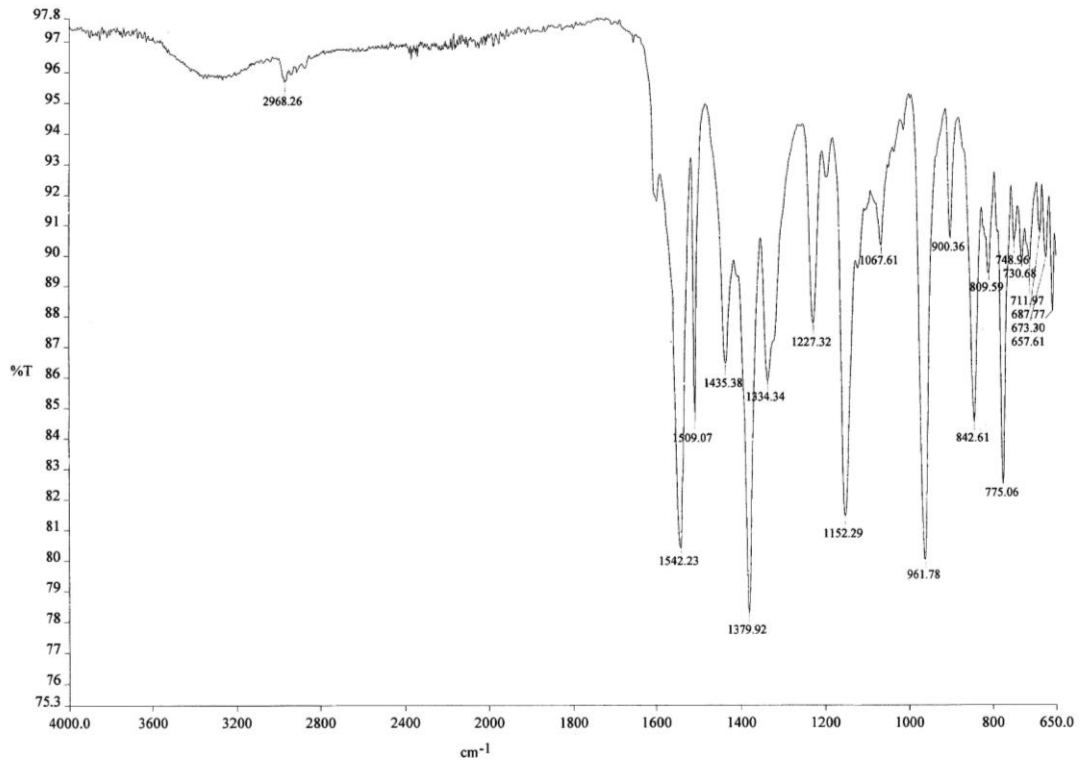


Şekil 2:1 Rosuvastatin kalsiyum'un kimyasal formülü

Rosuvastatin, kimyasal adı bis[(E)-7-[4-(4-fluorofenil)-6-izopropil-2-[metil-(metilsulfonil)amino] pirimidin-5-il]](3R,5S)-3,5-dihidroksihept-6-enoik asit] kalsiyum tuzu ya da monokalsiyum bis (+) 7-[4-(4-fluorofenil)-6-isopropyl-2-(N-metil-N-metansulfonilaminopirimidin)-5-il]]-(3R,5S)-dihidroksi-(E)-6-heptenoat (Şekil 2.1), kapalı formülü $(C_{22}H_{27}FN_3O_6S)_2Ca$, molekül ağırlığı 1001,14 olan beyaz, amorf bir tozudur. Asetonitril, su ve metanolde kolay, etanolde eser miktarda çözünür. Erime derecesi $122^{\circ}C$ dir. Elementel analiz değerleri C: % 51,01, H: % 5,64, N: % 8,10, F: % 3,66, asitlik sabiti değeri pKa: 3,8 olarak bildirilmiştir.



Şekil 2:2 Rosuvastatinin 8 µg/mL konsantrasyonda asetonitril çözeltisindeki UV spektrumu



Şekil 2:3 Rosuvastatinin FT-IR spektrumu

2.7.3. Rosuvastatin için Geliştirilmiş Analiz Yöntemleri

2.7.3.1. Spektrofotometrik ve Dansitometrik Yöntemler

Rosuvastatinin farmasötik preparatlarda ve diğer ilaçlarla yanyana tayinleri için spektrofotometri ve dansitometri yöntemleri kullanılarak yapılan çalışmalar aşağıda özet halinde sunulmuştur.

Gupta ve arkadaşları [12] rosuvastatinin tabletlerde analizi için 2-18 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusal olan ultraviyole (UV)-spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde ölçmeleri 244 nm dalgaboyunda yapmışlar ve metanoldeki molar absorptivite katsayısını $7,22345 \times 10^4$ L/mol.cm olarak bulmuşlardır.

Prajapati ve arkadaşları [13] rosuvastatin kalsiyumun tabletlerde analizi için ekstraktif spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Rosuvastatin ve safranin arasında pH 7,2 fosfat tamponunda oluşan iyon çiftine dayanan bu yöntemde ölçmeler 518 nm dalgaboyunda yapılmış ve yöntemin doğrusallık aralığı 5-25 µg/mL, geri kazanım oranı % 100,94 olarak bulunmuştur.

Uyar ve arkadaşları [14] da rosuvastatinin tabletlerde analizi için UV-spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişler ve 243 nm dalgaboyunda yaptıkları ölçmelerle metodun doğrusallık aralığını, 1- 60 µg/mL, gözlenebilme sınırını 0,33 µg/mL olarak belirlemişlerdir.

Rosuvastatinin farmasötik preparatlarda görünür bölgedeki tayini için Tuljarani ve arkadaşları [15] yükseltgen serik amonyum sülfat varlığında 3-metilbenztiyazolinon-2-hidrazon belirteci ile türevlendirilmesine (Yöntem A) ve rosuvastatin ile kobalt tiyosiyanat arasında oluşan kompleksin tayinine (Yöntem B) dayanan iki yöntem geliştirmişlerdir. Yöntem A ve Yöntem B için doğrusallık aralıkları sırasıyla, 2-14 µg/mL ve 50-250 µg/mL dir. Her iki yöntemde rosuvastatinin tabletlerde analizine başarıyla uygulanmıştır.

Gajjar ve arkadaşları [16] rosuvastatin ve ezetimib'in yanyana türev spektrofotometrisi yöntemi ile tayinini yapmışlardır. Spektrumların birinci türevlerini alarak yaptıkları çalışmada rosuvastatin için 237,4 nm, ezetimib için 223.4 nm dalgaboylarını kullanmışlar ve her iki ilacın doğrusallık aralığını 2,5-15 µg/mL olarak belirlemişlerdir. Geri kazanım oranı % 98-102 olan yöntemi bu ilaçların tabletlerden yanyana analizlerine uygulamışlardır.

Kumari ve arkadaşları [17] da geliştirdikleri üç ayrı yöntemde oluşan renkli bileşiklerin görünür bölgedeki absorpsiyonlarını ölçmek suretiyle rosuvastatinin tayinini yapmışlardır. Yöntem A da 2,2'-bipiridin ile oluşan turuncu renkli kromojeni 490 nm de, Yöntem B de demir klorür ve potasyum ferrisiyanür ile rosuvastatin arasında oluşan yeşil kompleksi 730 nm de, Yöntem C de ise Solokrom Siyah T ile oluşan mor renkli kompleksi 470 nm de tayin etmişlerdir.

Sane ve arkadaşları [18] rosuvastatin kalsiyumun tabletlerde analizi için geliştirdikleri dansitometrik yöntemde silikajel 60 F₂₅₄ HPTLC (Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi) plaklarına uyguladıkları örnekleri, toluen-metanol-etil asetat-formik asit (6,0:1,0:3,0:0,1) mobil faz sisteminde yürütmüşler ve 265 nm dalgaboyunda tayin etmişlerdir. Yapılan analizde doğrusallık aralığı 1-5 µg/mL olarak bulunmuştur.

Chaudhari ve arkadaşları [19] rosuvastatin, simvastatin ve pravastatinin tabletlerde HPTLC ile tayini için basit ve tekrarlanabilir bir dansitometrik yöntem

geliştirmişlerdir. Bu yöntemde stasyonier faz olarak silikajel 60 F₂₅₄ plak, mobil faz olarak kloroform-metanol-toluen (6:2:2) karışımı kullanarak simvastatin, pravastatin ve rosuvastatin için gözlenebilme sınırlarını sırasıyla 15, 9, 8 ng olarak tayin etmişlerdir.

2.7.3.2. HPLC ile Tablet Analizleri

Rao ve arkadaşları [20] rosuvastatinin farmasötik dozaj formlarında HPLC ile analizini ve bu yöntemin validasyonunu yapmışlardır. Bu yöntemde tayin C₁₈ kolonda, 0,02 M fosfat tamponu (pH 6,8)-asetonitril (60:40) mobil faz karışımı ile 0,6 mL/dak akış hızında 242 nm dalgaboyunda gerçekleştirilmiştir.

Rosuvastatinin farmasötik preparatlar ve hammadde bozunma ürünleri varlığındaki tayini için Hasumati ve arkadaşları [21] bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde C₁₈ kolon ve asetonitril-% 0,5 formik asit (50:50) mobil faz karışımı kullanılmış, dedeksiyon 248 nm dalgaboyunda yapılmış ve 5-300 µg/mL aralığında bir doğrusallık saptanmıştır.

Krishnaiah ve arkadaşları [22] rosuvastatinin, ilgili bileşiklerinin ve bozunma ürünlerinin tayini için bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmiştir. Rosuvastatinin asit, baz, su hidrolizi, fotolitik ve termal stres gibi stres koşullarına maruz bırakılmasıyla oluşan ilgili bileşiklerinin ve bozunma ürünlerinin tayini, C₁₈ kolonda, 0,02 M potasyum dihidrojen ortofosfat (pH:3)-asetonitril-su mobil faz karışımının gradient olarak uygulanmasıyla gerçekleştirilmiştir. Gözlenebilme sınırı 0,05 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Sankar ve arkadaşları [23] rosuvastatinin tabletlerde ve yığında ters faz sıvı kromatografik analizini C₁₈ kolonda, asetonitril-orto fosforik asit (pH: 3) (48:52) karışımını mobil faz olarak kullanarak, 245 nm dalgaboyundaki dedeksiyon ile yapmışlardır. Bu analizde doğrusallık aralığı 5-30 µg/mL olarak saptanmıştır.

Bozunma ürünlerinin varlığında rosuvastatinin kromatografik analizi Mehta ve arkadaşları [24] tarafından gerçekleştirilmiştir. İlacın farklı pH larda ve oksidatif, fotolitik ve termal stress altında bozundurulmasıyla yapılan bu çalışmada elde edilen sonuçlar, yöntemin tabletlere uygulanmasıyla elde edilen sonuçlarla uyumludur.

Sharma ve arkadaşları [25] rosuvastatin kalsiyum ve ezetimibin kombine preparatlarda tayinini C₁₈ kolonda Tween-20-n-butanol misel karışımından (60:20:20) oluşan mobil faz sistemi ile gerçekleştirmişlerdir. 314 nm dalgaboyunda yapılan

analizde 5-10 mg/L konsantrasyon aralığında doğrusallık saptanmıştır. Aynı çalışmacılar [26] bu iki etken maddenin tabletlerde analizi için bir de ters faz sıvı kromatografik yöntem geliştirmişlerdir. C₁₈ kolonda, metanol-asetonitril-fosfat tamponu (pH: 3,5) (60:20:20) mobil fazıyla gerçekleştirilen analizde dedeksiyon 279 nm de yapılmış, doğrusallık aralığı aynı bulunmuştur.

Varghese ve arkadaşları [27] ezetimib ve rosuvastatin kombine tabletlerinde yaptıkları yanyana analizde C₁₈ kolon, % 0,1 ortofosforik asit (pH: 3,5)-asetonitril (63:37) mobil faz karışımı kullanarak 245 nm dalgaboyunda çalışmışlardır. Doğrusallık aralığını 0,5-10 µg/mL olarak belirledikleri çalışmayı Uluslar arası Harmonizasyon Konferansı (ICH) kılavuzlarına göre valide etmişler ve tablet yardımcı maddelerinin girişim yapmadığını bildirmişlerdir.

Doshi ve arkadaşları [28] rosuvastatin ve telmisartanın farmasötik dozaj formlarında analizi için basit bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde ayrılma C₁₈ kolonda, amonyum dihidrojen fosfat (pH: 3)-metanol (65:35) mobil faz karışımı kullanılarak sağlanmıştır. Akış hızı 1,5 mL/dak, dalgaboyu 298 nm olan yöntemin doğrusallık aralığı 6-18 µg/mL olarak bulunmuştur.

Gomes ve arkadaşları [29] pravastatin, fluvastatin, atorvastatin ve rosuvastatinin farmasötik preparatlarda HPLC ile tayini için, ayrılmanın C₁₈ kolonda ve metanol-su (60:40) mobil faz karışımı ile sağlandığı bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde rosuvastatin için gözlenebilme sınırı 1,55 µg/mL olarak tayin edilmiştir.

Rajkondawar [30] ezetimib ve rosuvastatinin yanyana tayini için bir analiz yöntemi sunmuştur. Bu yöntemde stasyonier faz C₁₈ kolon, mobil faz 0,05 M potasyum dihidrojen fosfat-asetonitril (55:45) karışımı, dedeksiyon dalgaboyu 235 nm olarak kullanılmıştır.

2.7.3.3. HPLC ile Biyolojik Sıvı Analizleri

Rosuvastatinin biyolojik sıvılarda HPLC ile bugüne kadar yapılan analizleri UV dedeksiyon ve kütle spektrometrik (MS) dedeksiyona dayanmaktadır. Bu tez kapsamında geliştirilen yöntem maddenin analizindeki ilk türevlendirme çalışması ve fluorimetrik dedeksiyona dayanan ilk yöntemdir.

Kumar ve arkadaşlarının [31] rosuvastatinin sıçan plazmasında HPLC ile tayini için geliştirdikleri yöntemde plazmadan ekstraksiyon için asetonitril kullanılmış,

çöktürmeden sonra kalan organik faz uçurulmuş ve kalıntı mobil fazda çözülüp sisteme enjekte edilmiştir. C₁₈ kolon ve 0,05 M formik asit-asetonitril (55:45) mobil faz sisteminde gerçekleştirilen analizde etkin bir ayrılma sağlanmış, 0,02-10 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusal sonuçlar elde edilmiştir. Dedektör dalgaboyu 240 nm, mobil faz akış hızı 1 mL/dak seçilmiştir.

Sultana ve arkadaşları [32] seftriakson sodyum ve statin grubu ilaçların (simvastatin, rosuvastatin, atorvastatin ve pravastatin) farmasötik formülasyonda ve serumda yan yana analizi için bir ters faz sıvı kromatografik yöntem geliştirmişlerdir. Yöntemde C₁₈ kolon ve metanol-pH: 2,8 orto fosforik asit-asetonitril (70:15:20) mobil faz karışımı kullanılmış ve 240 nm dalga boyunda çalışılmıştır. Doğrusallık aralığı 2,5-25 µg/mL, geri kazanım oranı % 98,72 olarak belirlenmiştir. Geliştirilen yöntem statinlerin tek başına veya seftriakson ile kombine olarak analizine imkân sağlamıştır.

Atenolol, rosuvastatin, spirolakton, glibenklamit ve naproksenin kandaki analizleri Yin-Hai ve arkadaşları [33] tarafından geliştirilen yöntemle yapılmıştır. Bu yöntemde maddeler ortamdan asetonitrille ekstre edilmişler ve C₁₈ kolonda metanol-0,01M asetik asit (78:22) mobil faz karışımı ile elüe edilmişlerdir. Bu yöntemde geri kazanım oranı % 94-103 olarak bildirilmiştir.

Atenolol, rosuvastatin, spironolakton, glibenklamit ve naproksen sodyumun farmasötik preparatlarda ve insan plazmasında yan yana tayini Sultana ve arkadaşlarının [34] geliştirdikleri bir yöntemle yapılmıştır. Metanol-pH: 3,4 orto fosforik asit (80:20) çözücü sistemi ile C₁₈ kolonda ayrılan maddeler 235 nm dalga boyunda tayin edilmişlerdir. Geliştirilen yöntem atenolol, rosuvastatin, spironolakton, glibenklamit ve naproksenin ilaç etkileşimleri çalışmalarına uygulanmış ve dört farklı terapötik sınıftan olan bu ilaçların birlikte alındıklarında tayin edilebilmelerine olanak sağlamıştır.

Rosuvastatin ve gemfibrozilin insan plazmasında yan yana analizinde Shivva ve arkadaşları [35] plazma proteinlerini asetonitrille çöktürdükten sonra kalan kısmı uçurmuşlar ve mobil fazda çözerek sisteme vermişlerdir. Stasyoner faz olarak C₁₈ kolon kullanılmış, mobil faz bileşimi de 0,01 M amonyum asetat-asetonitril-metanol (50:40:10) olarak seçilmiştir. Yöntemde rosuvastatin için tayin sınırı 0,3 µg/mL olarak saptanmış, geliştirilen yöntem sıçanlarda yapılan farmakokinetik tayine uygulanmıştır.

Atorvastatin, lovastatin, pravastatin, rosuvastatin ve simvastatinin farmasötik formülasyonlarda ve in vitro metabolizma çalışmalarında tayini için Khalid ve arkadaşları [36] kapsamlı bir çalışma yapmışlardır. C₁₈ kolonda 0,01 M amonyum asetat (pH:5)-asetonitril-metanol mobil faz karışımının gradient uygulanması ile 237 nm dalga boyunda gerçekleştirilen analizde, in vitro çalışma için ekstraksiyon çözütüsü olarak etil asetat kullanılmıştır. Beş statinin birbirinden ayrılması sağlanmış, yöntemin rutin analizlere uygulanabilirliği gösterilmiştir.

Rosuvastatinin insan plazmasında tandem kütle spektrometrisi sıvı kromatografisi (LC-MS/MS) kullanılarak gerçekleştirilen tayininde Chang ve arkadaşları [37] ekstraksiyon yöntemi olarak sıvı-sıvı ekstraksiyonundan faydalanmışlardır. Etil asetat-diklormetan (4:1) karışımı ile ekstre edilen plazmalar, C₁₈ kolonda % 7,5 metanol: % 2,5 0,005 M amonyum format-asetonitril-% 1 lik metanoik asit (7.5: 2.5: 70: 20) karışımından oluşan mobil faz ile elüe edilmişlerdir. Mobil faz akış hızı 0,5 mL/dak, kolon sıcaklığı 40°C olarak ayarlanmıştır. Elektro sprey iyonizasyonlu (ESI) ve iyon tuzak kaynaklı tripl quadropol MS dedektörde, pozitif iyon takibi ile izlenen analizde doğruluk aralığı 0,1-60 µg/L olarak bulunmuştur.

Saleh ve arkadaşları da [38] insan plazmasında rosuvastatin tayini için bir LC-MS/MS yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde çok sayıda numune ile çalışılırken plazmadan sıvı –sıvı ekstraksiyon ile madde ekstraksiyonu yapıldığında meydana gelen zorlukların azaltılması için ekstraksiyon otomatik hale getirilmiştir. C₁₈ kolonda gradient mobil faz uygulaması ile yapılan analizde rosuvastatin, çoklu reaksiyon görüntüleme yolu ile saptanmıştır. Tayinin doğruluk aralığı 50-2500 pg/mL dir. Valide edilen yöntem biyoeşdeğerlik çalışmalarına başarıyla uygulanmıştır.

Rosuvastatinin insan plazmasının küçük hacimlerindeki hassas tayini için, yeni bir LC-MS/MS metodu geliştiren Reddy ve arkadaşları [39] plazmadan ekstraksiyon için asetonitril ile çöktürme uygulamışlar, geri kazanım oranını ortalama % 91,39 olarak bulmuşlardır. 0,5 mL/dak akış hızındaki 0,05 M formik asit-asetonitril (20: 80) mobil faz ile ODS–3 kolonda yapılan analizde gözlenebilme sınırı 0,05 ng/mL olarak bulunmuştur.

Lei ve arkadaşları [40] idrarda rosuvastatinin tayini için iç standart olarak pitavastatinin kullanıldığı bir yöntem geliştirmişlerdir. Metil tersiyer butil eter ile ekstre edilen maddeler C₁₈ kolonda, metanol-su-formik asit (70: 30: 1) mobil faz sisteminde

0,25 mL/dak akış hızında analiz edilmiştir. Kütle spektrometre pozitif ESI ile çalıştırılmış, iyonların izlenmesi çoklu reaksiyon görüntüleme kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 7 gün boyunca günde 5, 10, 20 mg rosuvastatin alan 20 sağlıklı gönüllünün idrar örneklerinden yapılan analizlerde doğrusallık aralığı 2–500 µg/L, tayin sınırı 2 µg/L olarak bulunmuştur.

Rosuvastatinin insan plazmasında tayini için Jun ve arkadaşları [41] hassas bir LC-MS/MS yöntem geliştirmişlerdir. Plazma örneklerinden rosuvastatinin ekstre edilmesi için etil eter kullanmışlar kromatografik ayrılmayı C₁₈ kolonda, metanol-pH:6 amonyak çözeltisi (75: 25) mobil faz karışımı ile gerçekleştirmişlerdir. Dedeksiyon ESI ile negatif iyonlar izlenerek yapılmıştır. 200 µl plazma ile yapılan çalışmada doğrusallık aralığı 0,020-60 ng/mL tayin sınırı 0,020 ng/mL olarak saptanmıştır. Geliştirilen yöntem rosuvastatinin farmakokinetik çalışmasına başarıyla uygulanmıştır.

Lan Ke ve arkadaşları [42] rosuvastatinin insan plazmasında analizi için iyon çifti sıvı sıvı ekstraksiyonu kullanarak ESI/MS dedeksiyona dayanan bir yöntem geliştirmişlerdir. Kromatografik ayrılma C₁₈ kolonda % 2 formik asit-metanol (20: 80) mobil faz karışımı ile 1 mL/dak akış hızında sağlanmıştır. Metodun tayin sınırı 0,1 ng/mL olarak belirlenmiş ve analitin plazmadaki stabilitesi incelenmiştir.

Dong-Hang ve arkadaşları [43] rosuvastatinin insan plazmasındaki analizi için geliştirdikleri LC-MS/MS yöntemde, eter ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu yaptıktan sonra maddeyi C₁₈ kolonda, % 0,2 formik asit-metanol (30:70) mobil faz karışımı ile ayırmışlardır. Yöntemin tayin sınırı 0,2 ng/mL olarak belirlenmiştir.

Rosuvastatinin insan plazmasındaki tayini Oudhoff ve arkadaşları tarafından [44] uygulanan mikrobör LC-MS/MS yöntemi ile yapılmıştır. Yöntemde 0,5, 1,0 ve 2,0 mm iç çaplı HPLC kolonları kullanılmış, bu kolonların etkinlikleri ve kütle hassasiyetleri 4,6 mm iç çaplı kolonlarla karşılaştırılmıştır. Katı-faz ekstraksiyonu (SPE) kullanılarak hazırlanan plazma örnekleri mikrobör kolona verilmiş ve kolon tıkanması ve hızlı bozunma gibi herhangi bir problemle karşılaşılmamıştır. Bu yöntemle gözlenebilen rosuvastatin miktarı 0,3 pg'dır ve geleneksel HPLC metoduna göre çok daha az numune tüketimi olmuştur.

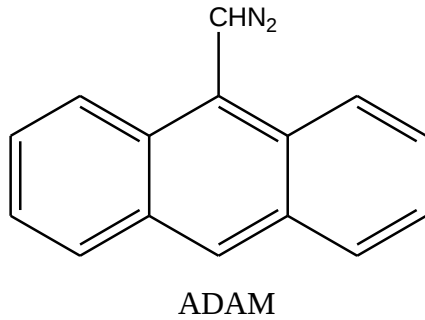
Singh ve arkadaşları [45] rosuvastatinin plazmada tayini için bir LC-MS/MS yöntem geliştirmişlerdir. Plazma matriksinden analitin ayrılması için katı-faz

ekstraksiyonu kullanmışlar ardından maddeyi C₁₈ kolonda % 0,2 formik asit-asetonitril (40:60) mobil faz karışımı ile 1,0 mL/dak akış hızında ayırmışlardır. Doğrusallık aralığı 1,0- 50,0 ng/mL olan yöntem ile maddenin stabilitesi de çalışılmıştır.

Rosuvastatin ve fenofibrik asitin plazmada yan yana tayini Trivedi ve arkadaşları [46] tarafından çalışılmış, geliştirilen yöntem valide edilmiş ve klinik çalışmaya uygulanmıştır. 500 µl plazma örnekleri etil asetatla ekstre edilmiş, organik faz ayrılmış, azot altında uçurulmuş, elde edilen kalıntıdaki maddeler (0,05 M formik asit-asetonitril (45: 55)) mobil fazı ile çözündürüldükten sonra C₁₈ kolonda ayrılmıştır. ESI pozitif iyon takibi ile saptanan maddelerin doğrusallık aralıkları rosuvastatin ve fenofibrik asit için sırasıyla 1,0-50,0 ng/mL, 0,5-20,0 ng/mL olarak belirlenmiştir.

2.8. 9-Antrildiazometan (ADAM) Belirteci Hakkında Genel Bilgi ve Bu Belirteçle Yapılan Çalışmalar

9-Antrildiazometan (ADAM) kırmızı-turuncu renkli, kokusuz bir tozdur, aseton, asetonitrilde çözünür. Kapalı formülü C₁₅H₁₀N₂, molekül ağırlığı 218,25 g/mol dür. Stabilitesinin düşüklüğü nedeniyle -20°C de muhafaza edilmelidir (Şekil 2.4).



Şekil 2:4 ADAM belirtecinin kimyasal formülü

Diazometil belirteçlerinden biri olan ADAM'ın sentezlenmesi basittir ve ortamdaki suyun varlığında bile bir katalizöre ihtiyaç duymadan, basit koşullar altında reaksiyon verebilir. ADAM floresans belirteci olarak geniş bir kullanım alanına sahiptir ve biyolojik olarak önemli olan karboksilik asitlerin pikomol seviyesinde tayinine imkan sağlar [47].

Belirtecin ilaç analizlerinde kullanıldığı az sayıda çalışma ve diğer kullanım alanlarından seçilen yayınlar aşağıda özetlenmiştir.

Hayakawa ve arkadaşlarının [48] yüksek performanslı afinite kromatografisi ile biotin (vitamin H) tayini için geliştirdikleri yöntemde, tripsin ile muamele edilmiş avidin silikajel kolon ve 2-propanolün 0,7 M sodyum klorür içeren asidik fosfat tamponundaki mobil faz çözeltisi kullanılmıştır. % 0,1 lik ADAM çözeltisi ile türevlendirilen örnekler oda sıcaklığında 1 saat bekletildikten sonra HPLC sistemine enjekte edilmişlerdir. Geliştirilen yöntem yiyecekler, dokular ve vücut sıvılarına başarıyla uygulanmıştır.

Noguerias ve arkadaşları [49] deniz fitoplanktonunda asidik polieter toksinlerin tayini için üç farklı floresans belirteci (3-bromometil-6,7-dimetoksi-1-metil-2(1*H*)-kinoksalinon, 9-klorometilantrasen ve ADAM) kullanarak geliştirdikleri HPLC yöntemlerini karşılaştırmışlardır. Standart toksinler ve fitoplanktonları metanole ekstre edildikten sonra çözücü uçurulmuş ve kalıntı belirteçlerle türevlendirilmiştir. ADAM ile yapılan türevlendirmenin kromatografik koşulları; C₁₈ kolon, asetonitril-metanol-su (70:15:15) mobil faz karışımı, 1 mL/dak akış hızı olarak belirlenmiştir. Yöntemin eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 254 nm, 412 nm ve tayin sınırı 0,714 ng olarak saptanmıştır.

Jurenka ve arkadaşları [50] tarafından geliştirilen tırtıl larvalarındaki bakteriyel enfeksiyona cevaben üretilen prostaglandin miktar tayini yönteminde prostaglandinler etil asetata ekstre edildikten sonra % 0,15 lik ADAM çözeltisiyle dört saat süreyle oda sıcaklığında türevlendirilmiştir. Ters faz C₁₈ kolonda asetonitril-su mobil fazıyla ayrılan örnekler 250 nm eksitasyon, 410 nm emisyon dalga boylarında tayin edilmiştir. Yöntemin doğrusallık aralığı 50-500 pg/mL olarak belirlenmiştir.

Fenoksi asit herbisitleri olarak adlandırılan 2,4-diklorofenoksiasetik asit ve 2-metil-4-klorofenoksiasetik asitin köpek plazmasında ve idrarında yan yana analizi için Dickow ve arkadaşları [51] ADAM belirteci ile fluorimetrik türevlendirmeye dayanan bir ters faz sıvı kromatografik yöntem geliştirmişlerdir. Plazma örnekleri etil asetat: hekzan karışımıyla ekstre edildikten sonra ADAM ile türevlendirilmiş ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra C₁₈ kolonda, 1 mL/dak akış hızındaki asetonitril-su (75:25) mobil fazı ile ayrılmışlardır. Bu iki maddenin yan yana analizindeki ilk çalışma olan bu yöntem 0,5- 5,0 mg/L doğrusallık aralığına sahiptir.

Kitamori ve arkadaşları [52], prostoglandinlerin plazmadaki eser miktarlarını tayin edebilmek için femtomol seviyesinde hassasiyete sahip lazer indüksiyonuna dayanan fluorimetrik dedeksiyonlu (HPLC/LIF) bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Plazma örnekleri etanol ekstraksiyonunu takiben katı-faz ekstraksiyonu ön işlemlerinden sonra, n-pentan-su-etanol ekstraksiyonu ile saflaştırılan ADAM belirteci ile karanlıkta, bir saat, oda sıcaklığında türevlendirilmiştir. Normal faz HPLC kolonunda ayrılan türev, izooktan- etilasetat-etanol-asetik asit (75:20:5:2) mobil fazı ile ayrılmıştır. Dedeksiyon He-Cd lazer ışık kaynağı kullanılarak eksitasyon dalgaboyu 325 nm, emisyon dalgaboyu 412 nm de yapılmıştır. Yöntemin doğrusalılık aralığı 25-500 pg/mL, geri kazanım oranı % 89 olarak belirlenmiştir.

Bir anjiyotensin-I-dönüştürücü enzim inhibitörü olan imidapril ve aktif metabolitinin insan plazma ve idrarındaki tayini için Kozo ve arkadaşları [53] ADAM belirteci ile türevlendirmeye dayanan bir yöntem geliştirmişlerdir. Katı faz ekstraksiyonu ile plazma ve idrardan ekstre edilen imidapril ve metaboliti, ADAM ile türevlendirildikten sonra silikajel yapıli katı faz ekstraksiyon kartuşunda saflaştırılmış ve sonra türevler HPLC ile analiz edilmiştir. Yöntemin gözlenebilme sınırı plazma için 0,2 ng/mL, idrar için 10 ng/mL olarak bulunmuş, geliştirilen yöntem imidaprilin sağlıklı gönüllülerdeki farmakokinetik çalışmasına başarıyla uygulanmıştır.

Stein ve arkadaşlarının [54] 3-(2-karboksietiltiyo)-3- [2-(8-feniloktil) fenil] propanoik asitin plazmada tayini için geliştirdikleri HPLC yönteminde analit plazma örneklerinden sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile çözücüye alındıktan sonra ADAM ile türevlendirilmiştir. HPLC cihazına bağlanan bir kolon değıştirme ünitesiyle analizin iki ayrı kolonda yapılması sağlanmıştır. Türevlendirilen örnekler önce katı faz ekstraksiyonuna tabi tutulmuş sonra kısa silika kolona enjekte edilmiştir. Silika kolonda ayrılan madde pikleri daha ileri kromatografik ayrılma için analitik silika kolona aktarılmış ve 365 nm eksitasyon, 415 nm emisyon dalga boylarında tayin edilmişlerdir, yöntemin doğrusalılık aralığı 10-5000 ng/mL dir.

Oksalik asitin plazmada tayini için Shimizu ve arkadaşları [55] oksalik asiti de içeren düşük molekül ağırlıklı karboksilik asitleri plazmadan bir ultra filtreden süzerek ve C₁₈ kartuştan geçirerek ayırmışlardır. Oksalik asit tri-butıl fosfat ile ekstre edilmiş, organik tabaka ADAM ile reaksiyona sokularak fluoresans gösteren bir türeve

esterleştirilmiştir. Türev HPLC sistemine enjekte edilmiş, 0,2-20 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusallık saptanmıştır.

Hauptle ve arkadaşları [56] hücre kültürü skalasında dolikol-fosfatların (Dol-P) HPLC ve kütle spektrometrisi ile analizi için yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. Dolikoller, ökaryotik membranların temel yapısal bileşenleri olan poliprenol yağlarıdır. Dol-P lerin biyolojik önemleri Dol-kinaz eksikliği gibi dol biyosentetik kusurlarına bağlı düzensizlikler ile açıklanabilir. Genetik insan hastalıklarının karakterizasyonu ve terapötik denemelerin değerlendirilmesi için hücre kültürleri muhtemel deney kaynakları olarak kabul edilirler. Bu tayinde insan hücre kültüründe Dol-P analizi ve miktar tayini için, doğal Dol-P kompozisyonu ve α -izopiren birimleri negatif iyon ESI/MS ile tanımlanmış, ADAM ile fluorimetrik olarak etiketlenen Dol-P HPLC ile ayrılmış ve poliprenol-P iç standart miktarı ile kıyaslanarak tayin edilmiştir. Bu çalışmada pravastatinin hücrelerde Dol-P oluşumuna etkisi de incelenmiştir.

Hayakawa ve arkadaşları [57] lipoik (tiyotik) asit tayini için bir afinite kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Avidin bağlı silikajel tripsin ile muamele edilmiş ve 20 x 4,0 mm boyutlu bir kolon yapılmıştır. Maddeyi elüe etmek için sodyum klorür içeren asidik fosfat tamponundaki 2-propanol çözeltisi (pH: 2,4) kullanılmış ve lipoik asit ADAM ile türevlendirilmiştir. Yöntemin tayin sınırı 2,68 pmol olarak saptanmıştır. Test edilen yiyecekler arasında yumurta sarısı, ıspanak, pirinç kepeği, kuru mayanın yüksek miktarlarda lipoik asit içerdikleri görülmüştür.

Su mercimeğinde yasmonik asit (JA) tayini Kristl ve arkadaşları [58] tarafından geliştirilen fluorimetrik dedeksiyonlu HPLC yöntemi ile yapılmıştır. Bitki materyalleri ekstre edilmiş ve ADAM belirteci ile türevlendirilmiştir. Örnek hazırlama adımlarındaki JA kayıplarının düzeltilmesi için iç standart olarak dihidroyasmonik asit kullanılmıştır. LC/MS analizi bir mol JA ile bir mol ADAM belirtecinin reaksiyona girdiğini doğrulamıştır. Türevler C₁₈ kolonda asetonitril- su karışımının gradient uygulanması ile ayrılmıştır. Eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 254 ve 412 nm, gözlenebilme sınırı 2,9 ng/mL dir. Geliştirilen yöntemin seçicilik ve doğruluğu LC-MS/MS metoduyla doğrulanmıştır.

Nishimura ve arkadaşları [59] konjuge linoleik asitlerin ters faz HPLC ile tayini için basit ve hassas bir yöntem geliştirilmişlerdir. Yöntem doymuş ve doymamış (konjuge ve konjuge olmayan) yağ asitlerinin 9-antrilmetil esterlerinin ayrılması esasına

dayanır. Diğer yağ asitleri gibi konjuge linoleik asit de ADAM ile oda sıcaklığında izomerizasyon ve konjuge bağların dekompozisyonu olmaksızın 9-antrilmetil esterine dönüşür. Ayrılma C₁₈ kolonda, metanol-su mobil faz karışımının gradient uygulanması ile sağlanmıştır. Geliştirilen yöntem süt ve günlük ürünlerdeki yağ asidi kompozisyonlarının tayinine de uygulanmıştır.

Bazı kamçılı tek hücrelilerin neden olduğu kızıl gelgitlerdeki yağ asitleri kompozisyonunun tayini için Terasaki ve arkadaşları tarafından geliştirilen [60] yöntemde *Heterosigma akashiwo*, *Chattonella antiqua*, ve *C. marina* ADAM belirteci ile reaksiyona sokulmuş ve oluşan yağ asitlerinin 9-antrilmetil esterleri C₁₈ kolonda asetronitril-su-2-propanolün gradient uygulanması ile herhangi bir ön işleme tabi tutulmadan analiz edilmişlerdir.

Serumda N-karbamoil aspartat ve L-dihidrorotat'ın HPLC ile tayini Hayek-Oussini ve arkadaşları [61] tarafından gerçekleştirilmiştir. 1 mL serum örneği sıvı-sıvı ekstraksiyona tabi tutulduktan sonra türevlendirilmiş, C₁₈ kolonda asetronitril-10 mM sodyum asetat tamponu (pH: 6,0) çözücü sisteminin gradient uygulanması ile ayrılmışlardır. Eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 365 nm ve 412 nm, doğrusallık aralığı L-dihidrorotat için 0,8-60 µg/mL, N-karbamoil aspartat için 0,9-90 µg/mL dir.

İdrarda açilkarnitin tayini Toshihiro ve arkadaşları [62] tarafından geliştirilen yöntemle yapılmıştır. Aminopropil kolonda asetronitril-fosfat tamponunun gradient uygulanması ile ayrılan maddeler hızlı atom bombardımanı kütle spektrometrisi ile tayin edilmiştir. Çalışmada tayin sınırı 10 nmol/ml olarak saptanmış, matriks etkisi, kesinlik ve yöntemin yapısal seçiciliği incelenmiştir.

Kargas ve arkadaşları [63] insan serumunda uzun zincirli yağ asitlerinin tayini için yeni bir sıvı kromatografik yöntem geliştirmişlerdir. ADAM belirteci ile esterleştirilen yağ asitlerinin reaksiyonu oda sıcaklığında ısıtma ve katalizör olmadan gerçekleşmiştir. Seçilen 19 yağ asidi karışımı C₁₈ kolonda asetronitril-su-metanol mobil faz karışımının gradient uygulanması ile 365 nm eksitasyon ve 412 nm emisyon dalga boylarında tayin edilmişlerdir. Geliştirilen yöntem C₈ den C₂₂ ye kadar olan yağ asitlerinin serumdan ekstraksiyonuyla elde edilen örneklerle de uygulanmıştır. Serumdan tayinde tayin sınırı 10 pmol/µl den daha az ve geri kazanım % 92 den fazla olarak saptanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında 2007-2010 yılları arasında yapılmıştır.

3.1. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler

3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler aşağıda verilmiştir:

Rosuvastatin kalsiyum ¹,
 Crestor[®] 20 mg tablet ¹,
 Lovastatin²,
 ADAM²,
 Sodyum asetat (analitik saflıkta)³,
 Susuz sodyum sülfat (analitik saflıkta)³,
 Asetonitril (HPLC saflığında) ³,
 Etil asetat (EA) (analitik saflıkta)³,
 Metil tersiyer butil eter (MTBE) (analitik saflıkta)³
 Kloroform (analitik saflıkta)³
 Ultra saf su (HPLC saflığında),
 Glasiyel asetik asit (analitik saflıkta)³

3.1.2. Çözeltiler

1. Rosuvastatin Çözeltileri

Stok çözelti:

10,4 mg rosuvastatin kalsiyum tam olarak tartıldı, 5 mL lik balonjojede asetonitril ile çözündürüldü ve hacmine tamamlandı (1 mg/mL). Rosuvastatin çözeltileri +4°C de yaklaşık 1 ay süre ile dayanıklıdır.

Stok çözeltinin seyreltilmesi ile hazırlanan standart çözeltiler:

Standart Çözelti 1. Stok çözeltinin uygun miktarının asetonitril ile seyreltilmesiyle 1 µg/mL konsantrasyonda hazırlandı.

¹ Astra Zeneca İlaç Tic. Ltd. Şti.

² Sigma, St. Louis, MO, USA

³ Merck, E. Merck A.G. Darmstadt, Almanya

Standart Çözelti 2. Standart çözelti 1'in uygun miktarının asetonitril-su (1:3) karışımı ile seyreltilmesiyle 25 ng/mL konsantrasyonda hazırlandı.

Standart Çözelti 3. Standart çözelti 1'in uygun miktarının asetonitril-su (1:3) karışımı ile seyreltilmesiyle 1 ng/mL konsantrasyonda hazırlandı.

2. ADAM Çözeltisi

Türevlendirme reaksiyonunun ve HPLC koşullarının belirlenmesinde, sulu çözeltideki ve serumdaki ölçü eğrilerinin oluşturulmasında, tablet çözeltisi ve serum örnekleriyle yapılan analizlerde asetonitril ile hazırlanmış 100 µg/mL konsantrasyonda ADAM çözeltileri kullanıldı, çözeltiler her gün taze olarak hazırlandı.

3. Lovastatin Çözeltisi

Ölçü eğrilerinin oluşturulmasında, tablet çözeltisi ve serum örnekleriyle yapılan analizlerde lovastatinin kloroformda çözündürülmesi ile hazırlanmış 100 µg/mL konsantrasyondaki çözeltileri kullanıldı.

4. Asetat Tamponu Çözeltisi

pH sı 4,0 olan tampon çözelti (0,1 M) hazırlamak için 1,35 g sodyum asetat 50 mL suda çözündürüldü, gerekli miktarda glasiyel asetik asit ilavesi ile çözeltinin pH sı istenen değere getirildi ve hacmi 100 mL ye tamamlandı [64]. Bu çözelti reaksiyon koşullarının belirlenmesi, ölçü eğrilerinin hazırlanması, tablette ve serum örneklerinde yapılan analizler için kullanıldı.

3.2. Aletler ve Diğer Gereçler

1. HPLC Cihazı (Shimadzu LC 20A, LC Solution yazılımlı)

DGU-20A5 Vakumlu gaz giderici

LC 20 AT Pompa

SIL-20AC Otomatik numune örnekleyici

Analitik kolon: Phenomenex, Synergi C₁₈, (4µm, 250 x 4,6 mm I.D.)

Koruyucu kolon: Phenomenex, C₁₈, (4x 3 mm I.D.)

CTO-10A Kolon fırını

RF-10AXL Floresans dedektör

2. Spektrofotometre (Shimadzu UV-160A)
3. FT-IR (Perkin-Elmer, Spektrum 100)
4. Ultra saf su cihazı (aquaMAX™–ultra, Young Lin Instrument, Kore)
5. pH metre (WTW pH 526)
6. Girdap karıştırıcı (Velp Scientifica vortex)
7. Santrifüj (Janetzki T5 ve Hettich EBA 8S)
8. Isıtıcı blok (Lab-line Multi Blok Heater)
9. Terazî (Denver, TB 215D)
10. C₁₈ plak (Merck, RP-18, 0,25 mm, 5x10 cm)
11. Ultrasonik banyo (Ultrasonic LC 30H)
12. UV Lamba (Desaga UVIS, 254 ve 366 nm)
13. Otomatik pipetler (Eppendorf 0,5-10 µL, 10-100 µL ve 100-1000µL)
14. Vida kapaklı, yuvarlak tabanlı cam tüpler (12 cm)
15. Balonjojeler (İsolab 5, 10, 25 ve 50 mL)
16. Dereceli ve transfer pipetler (İsolab)
17. Cam vial, septum, kapak

3.3. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi İle İlgili Çalışmalar

3.3.1. Rosuvastatinin kalsiyum tuzunu baz hale dönüştürmek için uygun koşulların saptanması

Rosuvastatinin kalsiyum tuzunu baz hale dönüştürmek ve bir organik çözücüye ekstre edebilmek için bazik ve asidik ortamda sıvı-sıvı ekstraksiyon denemeleri yapıldı. Bu amaçla 1N NaOH, 0.1 M pH: 5 ve 7 fosfat tamponu, 0.1 M pH: 4 asetat tamponu çözeltileri ve EA, butil asetat, eter, diklormetan, kloroform, MTBE, EA-MTBE (1:1), hekzan-EA (1:1), hekzan-izoamil alkol (95:5) çözücüleri ve çözücü karışımları kullanılmıştır. En uygun koşulun saptanması için literatürdeki HPLC-UV metodu [66] kullanılarak diyod serili dedektörle çalışılmış, elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.1 de bildirilmiştir.

Tablo 3-1 Rosuvastatin kalsiyum tuzunun baz hale dönüştürülmesi için denenen sıvı-sıvı ekstraksiyon çeşitleri

<i>Ortam</i>	<i>Çözücü Sistemleri</i>
1 N NaOH 0,1 M pH 5 ve 7 Fosfat Tamponu 0,1 M pH 4 Asetat Tamponu	CHCl ₃
	CH ₂ Cl ₂
	Eter
	MTBE
	EA-MTBE (1:1)
	Butil Asetat
	EA
	n-Hekzan-EA (1:1)
	n-Hekzan-İzoamil Alkol (95:5)

3.3.2. Türevlendirme için Reaksiyon Koşullarının İncelenmesi

Karboksilik asit gruplarıyla reaksiyon veren ADAM belirteci ile ilgili yayınlar incelendiğinde reaksiyonun oda sıcaklığında, karanlıkta, herhangi bir ekstraksiyon, katalizör ve ısı gerektirmeden bir süre bekledikten sonra gerçekleştiği ve elde edilen fluorimetrik türevin herhangi bir ön işleme gerek duyulmadan HPLC sistemine enjekte edildiği görülmüştür. Rosuvastatin tuzu halinde bulunan bir etken madde olduğu için önce maddenin baz hale dönüştürülmesi ve sonra türevlendirilmesi gerekmiştir. Bu bilgilerden hareketle rosuvastatin ile ADAM arasındaki reaksiyonun kantitatif olarak hangi koşullarda yürüdüğünü tayin etmek için aşağıda belirtilen denemeler yapılmış, elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.2 de bildirilmiştir.

3.3.2.1. Reaksiyon süresi ve sıcaklık

Standart çözelti 3'ten 100'er µL kapaklı cam tüplere alındı. Üzerlerine 1 mL 0,1 M pH 4 asetat tamponu ilave edildi girdap karıştırıcı ile 1 dakika karıştırıldı, 5 mL EA-MTBE (1:1) çözücü karışımı eklendi, 5 dakika girdap karıştırıcıda karıştırıldı ve

santrifüj edildi. Ayrılan organik fazlara susuz sodyum sülfat ilave edildi, santrifüj edilen çözeltilerdeki organik fazın 4 mL si 40°C de azot akımında kuruluğa kadar uçuruldu. Kalıntılara 125 er µL 100 µg/mL konsantrasyondaki ADAM çözeltisi ve 875 µL asetonitril ilave edilerek oda sıcaklığında karanlıkta 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 dakika süreyle bekletildi. Sürenin sonunda karışımın 20 µL si HPLC sistemine enjekte edilerek analiz edildi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.2.1. de verilmiştir.

Reaksiyon sıcaklığının saptanması için de süre denemelerinde olduğu gibi hazırlanan örnekler oda sıcaklığı, 30, 40, 50, 60°C lere ısıtıldı, bir saat süreyle bekletilen örnekler HPLC sisteminde analiz edildi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.2.1. de verilmiştir.

3.3.2.2. Belirteç miktarı

Standart çözelti 3'ten 100 er µL kapaklı cam tüplere alındı. Üzerlerine 1 mL 0,1 M pH 4 asetat tamponu ilave edilerek girdap karıştırıcı ile 1 dakika karıştırıldı, 5 mL EA-MTBE (1:1) çözücü karışımı eklendi, 5 dakika girdap karıştırıcıda karıştırıldı ve santrifüj edildi. Ayrılan organik fazlara susuz sodyum sülfat ilave edildi, santrifüj edilen çözeltilerdeki organik fazın 4 mL si 40°C de azot akımında kuruluğa kadar uçuruldu. Kalıntılara 10- 200 µL (40-800 kat) arasında değişen hacimlerde ADAM (mg/mL) çözeltisi ilave edildi, çözeltilerin hacimleri asetonitril ile 1 mL ye tamamlandıktan sonra oda sıcaklığında karanlıkta bir saat süreyle bekletildi. Karışımın 20 µL si HPLC sistemine enjekte edilerek analiz edildi. Bulunan sonuçlar Bölüm 4.1.2.2. de verilmiştir.

3.3.3. Rosuvastatinin HPLC ile Analizi

3.3.3.1. Kolon, Mobil Faz ve Dedektör Dalga Boyları Seçimi

Literatür çalışmaları göz önüne alınarak HPLC çalışmaları, CN, C₈, 5 ve 4 µm partikül çaplı C₁₈ kolonlarda, çeşitli oranlarda asetonitril-su, asetonitril-10 mM fosfat tamponu (pH 5, 6 ve 7), asetonitril-10 mM orto fosforik asit (pH 2,4), asetonitril-trifluoroasetik asit (pH 5) mobil faz sistemleri izokratik ve gradient programlar uygulanarak, değişik akış hızlarında denendi. Analiz edilen türevin retansiyon zamanı ve çalışılacak eksitasyon, emisyon dalga boyları belirlendi. Elde edilen veriler Bölüm 4.1.3 de yer almaktadır.

3.3.3.2. İç Standart (IS) Seçimi

Ekstraksiyon, türevlendirme gibi ön işlemlerden ve enjeksiyonlardan kaynaklanabilecek hataların minimuma indirilmesi amacı ile stearik asit, glukuronik

asit, sodyum asetat, eprosartan, lisinopril, lovastatin, fluvastatin gibi karboksilik asit grubu içeren maddelerin IS olarak kullanılıp kullanılamayacağı incelendi. Tüm maddeler rosuvastatin için belirlenmiş reaksiyon koşullarında ayrı ayrı ADAM ile türevlendirildi ve rosuvastatin-ADAM türevine ait Bölüm 3.3.3.1.de belirlenen kromatografi koşullarında HPLC ile analiz edildi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.3.2. da verilmiştir.

3.3.3.3. Sulu Çözeltide Ölçü Eğrilerinin Hazırlanması

Standart çözelti 2 den sırasıyla 0,4, 40, 200, 400, 600, 800 µL lik hacimler ve 10 µg/mL konsantrasyondaki lovastatin çözeltisinden 50 şer µL kapaklı cam tüplere alındı. Çözeltilerin hacimleri su ile 1 mL ye tamamlandı. Üzerlerine 1 mL 0,1 M pH 4 asetat tamponu ilave edildi girdap karıştırıcı ile 1 dakika karıştırıldı, 5 mL EA-MTBE (1:1) çözücü karışımı eklendi, 5 dakika girdap karıştırıcıda karıştırıldı ve santrifüj edildi. Ayrılan organik fazlara susuz sodyum sülfat ilave edildi, santrifüj edilen çözeltilerdeki organik fazın 4 mL si 40°C de azot akımında kuruluğa kadar uçuruldu ve kalıntılara 100 µg/mL konsantrasyondaki ADAM çözeltisinden 125 er µL ve 875 µL asetonitril ilave edilerek oda sıcaklığında karanlıkta bir saat bekletildi. Karışımların 20 şer µL si HPLC sistemine enjekte edilerek 366 nm emisyon, 410 nm eksitasyon dalga boylarında saptanan piklerin alanları ölçüldü.

Her konsantrasyon için 6 kez çalışılarak bulunan rosuvastatin-ADAM pik alanları, lovastatin-ADAM pik alanlarına oranlandı. Konsantrasyon değerlerine karşı elde edilen ortalama pik alan oranı değerleri arasında ölçü eğrileri hazırlandı. Ölçü eğrisinin regresyon analizlerine ait sonuçlar Bölüm 4.1.3.3.de bildirilmiştir.

3.3.3.4. Rosuvastatinin Serumdan Ekstraksiyonu

Rosuvastatinin karboksilik asit grubunun türevlendirilmesine dayanan analizinin biyolojik sıvılara uygulanmasında plazmanın elde edilmesinde kullanılan sodyum sitrat, EDTA vb. gibi maddelerin de belirteç ile reaksiyona girme ihtimali düşünülerek serumda çalışma tercih edildi.

Serum proteinlerinin olası girişimlerini engellemek ve rosuvastatinin serumdan ekstraksiyonunu gerçekleştirmek için bazı ön işlemler yapıldı. Çeşitli çözücülerle protein çöktürme denemeleri, asidik, bazik ve nötr pH lara getirilen serum örneklerinden çeşitli çözücüler ve bunların belli oranlardaki karışımları ile yapılan sıvı-

sıvı ekstraksiyon denemeleri, çöktürme ve sıvı-sıvı ekstraksiyonun ardarda uygulanması ve son olarak literatürde [65] bulunan SPE metodu kullanılarak denemeler yapıldı.

Sıvı-sıvı ekstraksiyon metodu için her bir serum örneğinin 100 µL sine standart çözelti 3'den 10 µL eklendi, girdap karıştırıcıda 10 saniye karıştırıldıktan sonra örnekler ayrı ayrı 1'er mL 1N NaOH, 1 N H₂SO₄, 0,1 M pH 3,5 ve 6 fosfat tamponu, 0,1 M pH 4 asetat tamponu çözeltilerinden ilave edildi ve bir dakika boyunca girdap karıştırıcıda karıştırıldı. Tablo 3-2 de belirtilen çözücüler ve karışımlarından 5 mL eklendikten sonra 5'er dakika daha girdap karıştırıcıda karıştırılan örnekler 4500 rpm de santrifüj edildi. Ayrılan organik fazlara susuz sodyum sülfat ilave edildi, santrifüj edilen çözeltilerdeki organik fazın 4 mL si 40°C de azot akımında kuruluğa kadar uçuruldu ve kalıntılara 100 µg/mL konsantrasyondaki ADAM çözeltisinden 125 er µL ve 875 µL asetonitril ilave edilerek oda sıcaklığında karanlıkta bir saat bekletildi. Karışımların 20 şer µL si HPLC sistemine enjekte edildi.

Serum proteinlerini uzaklaştırmak için kullanılan protein çöktürme metodunda 100 µL serum örneğine standart çözelti 3'den 10 µL eklendi, girdap karıştırıcıda 10 saniye karıştırıldıktan sonra örnekler ayrı ayrı 400 er µL Tablo 3-2 de belirtilen çöktürme ajanlarından katıldı, 5'er dakika girdap karıştırıcıda karıştırılan örnekler 4500 rpm de santrifüj edildi. Katı kısımdan ayrılan çözeltilerdeki organik fazın 400 µL si 40°C de azot akımında kuruluğa kadar uçuruldu ve kalıntılara 100 µg/mL konsantrasyondaki ADAM çözeltisinden 125 er µL ve 875 µL asetonitril ilave edilerek oda sıcaklığında karanlıkta bir saat bekletildi. Türevlerin 20 şer µL si HPLC sistemine enjekte edildi.

Literatürdeki SPE metoduna göre yapılan çalışmada C₁₈ ekstraksiyon kartuşları 1 mL metanol ve 1 mL % 0,5 asetik asit ile kondüsyone edildi. Diğer yandan 500 µL serumu 500 µL 100 mM pH 4 asetat tamponu, 50 µL madde çözeltisi (metanol-1 M asetik asit 1:1 karışımında), 750 µL 1M asetik asit eklendi, 2 sn girdap karıştırıcıda karıştırıldı, 7 dakika santrifüj edildi, üstte kalan sıvının 1,7 mL si daha önce kondüsyone edilen SPE kartuştan geçirildi, 1 mL metanol-% 0,5 asetik asit (30:70) karışımıyla yıkandı, 1 mL % 0,5 asetik asitin metanoldeki çözeltisiyle elüe edildi. Elüat 40°C de azot akımı altında kuruluğa kadar uçuruldu, kalıntı 130 µL % 0,5 asetik asitte çözüldü, santrifüj edildi ve 20 µL si HPLC sistemine enjekte edildi.

Uygun ekstraksiyon sistemi belirlendikten sonra, bu yöntemin IS maddenin verimini nasıl etkilediğinin araştırılması için 100 µL seruma standart çözelti 3'den 10 µL, 100 µg/mL konsantrasyondaki lovastatin çözeltisinden 5 µL eklendi girdap karıştırıcıda 10 saniye karıştırıldıktan sonra Bölüm 3.3.3.3 de anlatıldığı gibi çalışıldı. Serumdan ekstraksiyon ile ilgili yapılan tüm çalışmalara ait sonuçlar Bölüm 4.1.3.4. de yer almaktadır.

Tablo 3-2 Serumdan ekstraksiyon çalışmalarında denenen yöntemler ve kullanılan çözücü sistemleri

<i>Yöntem</i>	<i>Ortam</i>	<i>Çözücü</i>
Sıvı-sıvı ekstraksiyon	1 N H ₂ SO ₄ 1 N NaOH 0,1 M pH 3,5,6 Fosfat Tamponu 0,1 M pH 4 Asetat Tamponu Nötr	EA Eter MTBE EA-MTBE(1:1) Eter İzopropanol-MTBE (1:9)
Çöktürme	Nötr	Asetonitril Metanol Aseton Trifluoroasetik Asit Perklorik Asit

3.3.3.5. Serumda Ölçü Eğrilerinin Hazırlanması

Kapaklı cam tüplere alınan 100 er μL serum örneklerine standart çözelti 2 den sırasıyla 0,4, 40, 200, 400, 600, 800 μL lik hacimler ve 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyondaki lovastatin çözeltisinden 5 er μL eklenip girdap karıştırıcıda 10 saniye karıştırıldıktan sonra üzerlerine 1 mL 0,1 M pH 4 asetat tampon çözeltisi ilave edildi, girdap karıştırıcıda 1 dakika karıştırıldı, 5 mL EA-MTBE (1:1) çözücü karışımı eklendi, 5 dakika girdap karıştırıcıda karıştırıldı ve santrifüj edildi. Ayrılan organik fazlara susuz sodyum sülfat ilave edildi, 4500 rpm de santrifüj edilen çözeltilerdeki organik fazın 4 mL si 40°C de azot akımında kuruluğa kadar uçuruldu ve kalıntılara 125 er μL 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyondaki ADAM çözeltisinden ve 875 μL asetonitril ilave edilerek oda sıcaklığında karanlıkta bir saat bekletildi. Karışımların 20 şer μL si 1,0 mL/dak akış hızında belirlenen gradient programlama ile 30°C deki C_{18} kolona uygulandı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.3.5. de bildirilmiştir.

3.3.3.6. Serumdan Geri Kazanım Oranının Hesaplanması

Rosuvastatinin serumdan geri kazanım oranını saptamak amacıyla 3 ayrı konsantrasyonda (1, 5, 15 ng/ml) rosuvastatin içeren serum örnekleri çalışıldı (n=6). Elde edilen alan oranı değerlerine karşılık gelen konsantrasyonlar sulu ölçü eğrisi kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar Bölüm 4.1.3.6. da bildirilmiştir.

3.4. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

Yöntem geliştirme işlemi tamamlandıktan sonra analitik yöntem validasyonu ICH kılavuzu Q2 ye göre yapıldı [67].

3.4.1. Seçicilik

Bir analitik yöntemin seçiciliği; tayin edilecek maddeyi, diğer başka maddelerin varlığında da (plazma, serum, idrar gibi biyolojik matrisler, tablet yardımcı maddeleri, enantiomerler, impuriter ve bilinen veya bilinmeyen bozunma ürünleri vb.) doğru ve güvenilir bir şekilde tayin edebilme yeteneğidir.

Yöntemin seçiciliğinin tayini amacıyla, sulu çözeltilerdeki ve serumdaki çalışmalar için ayrı ayrı türevlendirme reaksiyonları madde eklenmeksizin (boş deneme) yapıldı. Böylece belirteçten ve reaksiyon ortamındaki kirliliklerden gelebilecek girişimler araştırıldı. Ayrıca mobil fazdan gelebilecek bir girişim olup olmadığı da incelendi.

Sulu çözelti ve serum örneklerine ait kromatogramlar Bölüm 4.2.1. de gösterilmiştir.

Kabul kriteri: Boş denemelerden gelebilecek pikler rosuvastatin/ADAM ve IS/ADAM türevlerinin geldiği alıkonma zamanlarında pik vermemelidir.

3.4.2. Aralık ve Doğrusallık

Doğrusallık aralığı; yöntemin kabul edilebilir duyarlılık, tekrarlanabilirlik ve doğrusallıkla sonuçlar verdiği konsantrasyon aralığıdır. Rosuvastatin için doğrusallık aralığı 0,01-20 ng/mL olarak çalışıldı.

Bir analitik metodun doğrusallığı, numune çözeltisindeki analiz edilen maddenin konsantrasyon değerlerine karşılık elde edilen analiz sonuçlarının belirli bir aralık dahilinde doğrusal olması olarak açıklanır.

Bu doğrusal ilişkinin gösterilebilmesi için sulu çözelti için Bölüm 3.3.3.3 de ve serum için Bölüm 3.3.3.5 de anlatıldığı şekilde rosuvastatini 6 farklı konsantrasyonda içeren karışımlarla reaksiyonlar yapıldı. Kromatogramlardan elde edilen rosuvastatin/ADAM ve IS/ADAM türevlerinin pik alanları birbirine bölünerek pik alan oranları elde edildi ve konsantrasyona karşılık bu alan oranlarının kullanıldığı doğrusallık grafikleri çizildi. Sulu çözelti ve serum örnekleri için sonuçlar sırasıyla, 4.1.3.3 ve 4.1.3.5. de gösterilmiştir.

Kabul kriteri: Doğrusallık grafiğinin korelasyon katsayısı (r) 0,99 dan az olmamalıdır.

3.4.3. Doğruluk

Bir analitik yöntemin doğruluğu bu yöntem ile elde edilen analiz sonuçlarının gerçek (teorik) değerlere olan yakınlığıdır. Bir başka deyişle doğruluk, eklenen ve bilinen madde miktarının geri kazanım yüzdesi yada verimi olarak açıklanabilir.

Rosuvastatin için doğruluk çalışması; sulu çözeltide ve serumda 1, 5, 15 ng/mL lik konsantrasyonlarda madde ve sabit konsantrasyonda IS katılmasıyla yapılan reaksiyonların analiz edilmesiyle gerçekleştirildi. Elde edilen analiz sonuçları kullanılarak sulu çözelti ve serum kalibrasyon grafikleri yardımıyla konsantrasyon değerleri bulundu. Bu konsantrasyonların teorik konsantrasyonlara bölümü sonucu ortaya çıkan yüzde geri kazanımlar aşağıdaki denkleme göre hesaplandı ve sonuçlar Bölüm 4.2.3. de bildirildi.

$$\% \text{ Geri kazanım (verim)} = \frac{\text{Bulunan konsantrasyon}}{\text{Eklenen konsantrasyon}} \times 100$$

Geri kazanım sonuçlarının ortalaması, SD, % RSD, % bağıl ortalama hata değerleri hesaplandı.

3.4.4. Tekrarlanabilirlik (Kesinlik)

Bir analitik yöntemin tekrarlanabilirliği aynı örnekten tekrar tekrar hazırlanan çözeltilerin ve tekrar tekrar yapılan analizlerin sonuçlarının birbiriyle olan uyum ve yakınlığı olarak ifade edilir. Tekrarlanabilirlik üç kategoride açıklanabilir. Tekrarlanabilirlik, ara tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik.

A. Tekrarlanabilirlik: Aynı çözelti, aynı analizci, aynı cihaz, aynı laboratuvar ve kısa zaman diliminde elde edilen veriler arasındaki uyum ve uygunluğu tanımlar.

B. Ara Tekrarlanabilirlik: Yöntemin tek bir laboratuvarında, fakat farklı günlerde uygulanması ile tespit edilen ve analiz işleminin uzun zaman dilimindeki değişkenliğini ifade eden tanımdır.

C. Tekrar üretilebilirlik: Bu parametreye laboratuvarlar arası denemeler ile karar verilir. Tekrar elde edilebilirlik bir analitik yöntemin standardizasyonu durumlarında dikkate alınmalıdır (örneğin; yöntemin farmakopelere dâhil edilmesi vb).

Rosuvastatin için tekrarlanabilirlik çalışması; sulu çözeltide ve serumda aynı günde ve farklı günlerde, 1, 5, 15 ng/mL lik konsantrasyonlarda madde ve sabit konsantrasyonda IS katılmasıyla yapılan reaksiyonların analizleriyle gerçekleştirildi. Kalibrasyon grafiği kullanılarak elde edilen analiz sonuçlarından konsantrasyonlar hesaplandı. Hesaplanan sonuçların ortalama, SD, % RSD değerleri bulundu. Sonuçlar Bölüm 4.2.4. de bildirildi.

3.4.5. Tayin sınırı (LOQ) ve Gözlenebilme Sınırı (LOD)

Bir analitik yöntemin tayin sınırı maddenin kabul edilebilir doğruluk ve tekrarlanabilirlik ile tayin edilebileceği en düşük konsantrasyondur.

Bir yönteme ait gözlenebilme sınırı ise, yöntem ile gözlemlenebilen ancak kantitatif olarak tayin edilmesi şart olmayan en düşük konsantrasyondur.

Rosuvastatin için LOQ ve LOD değerleri kalibrasyon doğrusunun eğimi ve y eksenini kestiği nokta üzerinden aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplandı.

$$LOQ = \frac{10 \sigma}{m} \qquad LOD = \frac{3 \sigma}{m}$$

σ : Kalibrasyon doğrusunun y kesişiminin standart sapması

m : Kalibrasyon doğrusunun eğimi

Sonuçlar Bölüm 4.2.5 de verilmiştir.

3.4.6. Türev Stabilitesi

Hazırlanan türev çözeltilerinin oda sıcaklığında, karanlıkta ve +4°C de zaman içinde kararlı olduğu sürenin tespit edilebilmesi analiz sonucunun doğruluğuna etki eden bir durum olduğundan incelenmelidir.

Türevin stabilitesinin tayini standart çözelti 3'ün 100 µl si ile Bölüm 3.3.3.5 de anlatıldığı şekilde 6 paralel çalışma yapılarak çalışıldı. Elde edilen türevler oda sıcaklığında karanlıkta, +4°C karanlıkta 12, 24, 48, 72, 96 saat bekletildikten sonra HPLC aletine enjekte edilerek analiz edildi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.6. da verilmiştir.

3.5. Tabletlerde Rosuvastatin Miktar Tayini

3.5.1. Geliştirilen HPLC Yöntemi ile Miktar Tayini

10 adet Crestor® 20 mg tablet tek tek tartılıp, ortalama bir tablet ağırlığı bulundu ve tabletler porselen bir havanda ince toz haline getirildi. 20 mg rosuvastatin baza eşdeğer miktarda tablet tozu tartılarak, 100 mL lik balonjojeye aktarıldı. 50 mL mobil faz [asetonitril-su (40: 60)] ilave edildi. 30 dakika ultrasonik banyoda tutuldu ve mobil faz ile hacmine tamamlandı, mavi bantlı süzgeç kağıdından süzüldü. Süzüntünün ilk 30 mL si atıldı. Geri kalan süzüntüden 0,5 mL alındı ve mobil faz ile 10 mL ye seyreltildi. Bu çözeltilerden 0,1 mL alınarak suyla hacim 10 mL ye tamamlandı ve bu çözeltinin 10 µL si ile Bölüm 3.3.3.3. de anlatıldığı gibi çalışıldı. Analiz işlemi 6 kez tekrarlandı. Tabletlerdeki rosuvastatin miktarı daha önceden hazırlanan ölçü eğrisine ait doğru denkleminde hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.3. de verilmiştir.

3.5.2. Kıyas Yöntemi ile Miktar Tayini

Kıyas yöntemi olarak literatürdeki HPLC-UV yöntemi [66] kullanıldı.

Standart Çözelti: 0,05 mg/mL konsantrasyondaki rosuvastatin çözeltisi, seyreltme çözeltisinde [su-asetonitril-metanol (40:50:10) çözücü karışımı] hazırlandı.

Örnek Çözeltisi: 50 mg rosuvastatin baza eşdeğer tablet tozu 200 mL lik balonjojeye aktarıldı, 150 mL seyreltme çözeltisi eklendi, karışım 60 dakika ultrasonik banyoda tutuldu, seyreltme çözeltisiyle hacmine tamamlandı. Bu çözeltinin 10 mL si 3500 rpm de santrifüj edildi. Üstte kalan sıvının uygun miktarı 0,05 mg/mL konsantrasyonu verecek şekilde seyreltildi.

Kromatografik Sistem:

Kolon: C₁₈, 250 x 4,6 mm, 5 µm iç çap

Mobil Faz: NaH₂PO₄ tampon çözeltisi (50mM, pH:2)-asetonitril-metanol (40: 20: 40)

Dedektör dalgaboyu: 242 nm

Akış Hızı: 1,0 mL/dak

Enjeksiyon Hacmi: 20 µl

Yöntem: Örnek ve standart çözelti HPLC cihazında (n=6) olacak şekilde analiz edildi ve alıkonma zamanı 10,04 dakika olan piklerin alanlarından örnekteki rosuvastatin miktarı hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.3. de bildirilmiştir.

3.6. Serumda Rosuvastatin Miktar Tayini ve Farmakokinetik Uygulaması

Yöntemin klinik uygulanabilirliğini test etmek amacıyla, sağlıklı bir gönüllünün 20 mg ilaç almasının ardından rosuvastatinin farmakokinetiği incelendi ve konsantrasyon-zaman eğrisi altında kalan alan (AUC), ilacın maksimum plazma konsantrasyonu (C_{maks}), bu konsantrasyona ulaşma süresi (t_{maks}) ve eliminasyon yarılanma ömrü (t_{1/2,el}) hesaplandı.

Serumda rosuvastatin miktar tayini için 29 yaşında sağlıklı bir gönüllü tarafından tek doz 20 mg rosuvastatin (20 mg rosuvastatin kalsiyum içeren Crestor® 20 mg tabletten bir adet) alınmasından 0, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 72 saat sonra tüplere 5-6 mL venöz kan örnekleri toplandı ve 4500 rpm de 30 dakika santrifüjlendi. Bu işlem sonunda elde edilen serum örnekleri -20°C de saklandı. Bu örnekler Bölüm 3.3.3.5. de anlatıldığı gibi analiz edildi. Zamana karşılık bulunan konsantrasyon değerlerinin gösterildiği konsantrasyon-zaman eğrisi çizilerek farmakokinetik parametreler hesaplandı.

Bulunan sonuçlar Bölüm 4.4. de bildirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi İle İlgili Çalışmalar

4.1.1. Rosuvastatinin kalsiyum tuzunu baz hale dönüştürmek için uygun koşulların saptanması

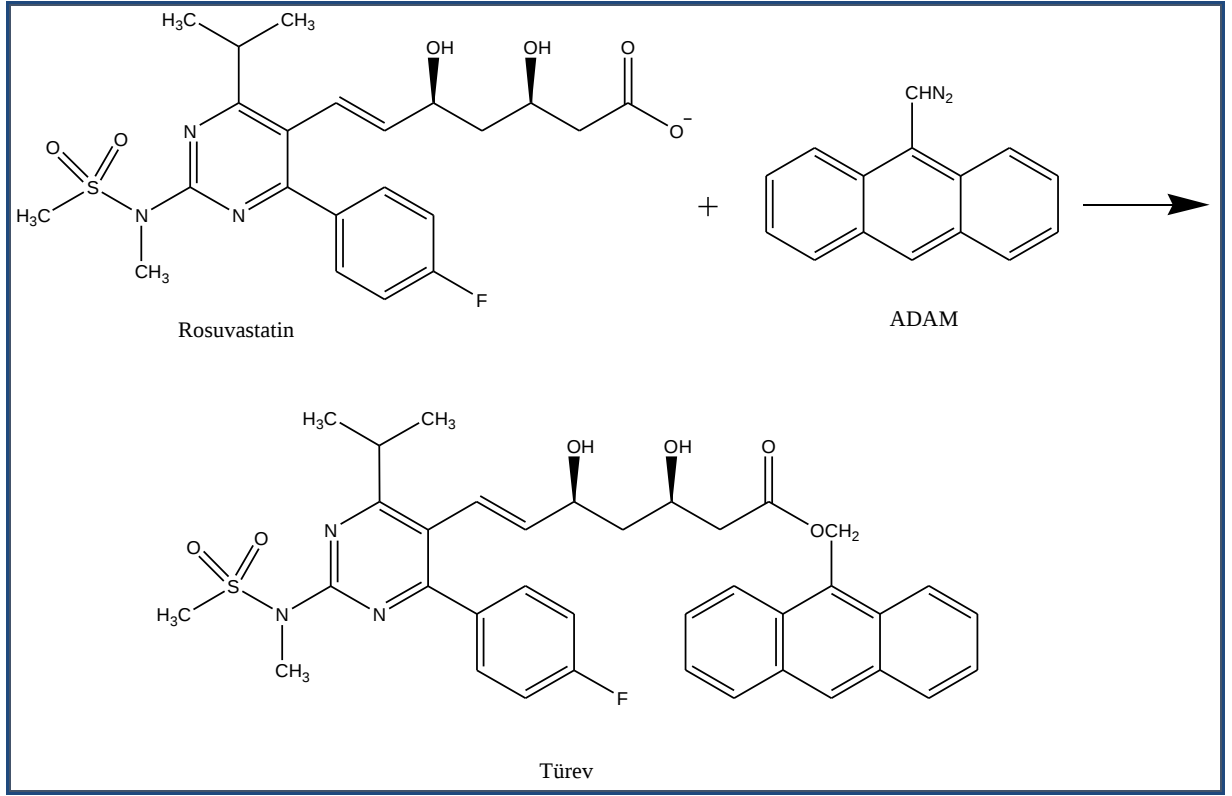
Rosuvastatin kalsiyum tuzunu baz hale dönüştürerek ekstre edebilmek için en uygun ortam, çözücü veya çözücü karışımının saptanması literatürdeki HPLC-UV metodu kullanılarak yapılmıştır. Bölüm 3.1 deki Tablo 3-1 de belirtilen çözücüler ve çözücü karışımları ile yapılan denemelerde EA ve MTBE dışındaki çözücülerle maddenin ekstraksiyonu gerçekleşmemiştir. Rosuvastatin 0,1 M pH 4 asetat tamponlu ortamda MTBE ve EA çözücülerine ekstre olmuş bu çözücülerle yapılan analizlerde en iyi sonuçların EA-MTBE (1:1) çözücü karışımı ile alındığı görülmüştür, elde edilen sonuçlar aşağıdadır.

Tablo 4-1 Rosuvastatin kalsiyum tuzundan baza ekstraksiyon çalışmalarında elde edilen sonuçlar

<i>Ortam</i>	<i>Çözücü Sistemleri</i>	<i>Pik alanı</i>
0,1 M pH 4 Asetat Tamponu	EA	29065
	EA-MTBE (1:1)	27108
	MTBE	25567

4.1.2. Rosuvastatin ile ADAM Arasındaki Reaksiyon Koşullarının İncelenmesi

Rosuvastatin–ADAM türevinin oluşumu üzerine reaksiyon süresi, sıcaklık, belirteç miktarı gibi parametrelerin etkisi incelendi. Rosuvastatin ile ADAM arasındaki reaksiyon aşağıda Şekil 4.1 de görülmektedir.



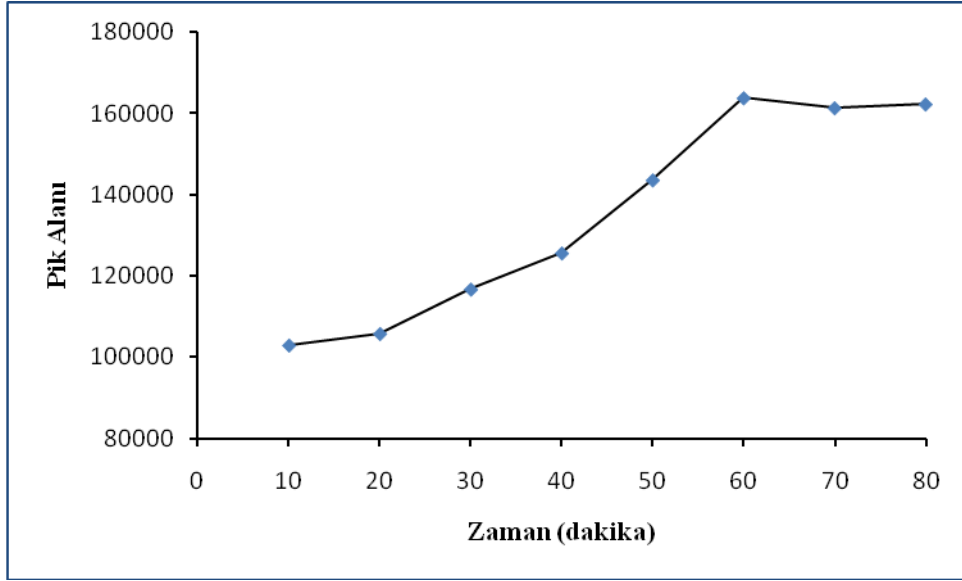
Şekil 4:1 Rosuvastatin ile ADAM arasında gerçekleşen türevlendirme reaksiyonu

4.1.2.1. Reaksiyon süresi ve sıcaklık

Rosuvastatin-ADAM türevinin kantitatif olarak oluşması için oda sıcaklığında 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 dakika bekleme süreleri ile gerçekleştirilen reaksiyonlar için Bölüm 3.3.2.1. de anlatıldığı gibi çalışıldı. Oluşan türevlere ait pik alanlarının zamana karşı gösterdiği değişim Tablo 4-2 de ve Şekil 4-2 de görülmektedir. Elde edilen sonuçlardan türevin oluşumu için oda sıcaklığında 60 dakika beklemenin yeterli olduğu görülmüştür. Reaksiyon sıcaklığına karar vermek için oda sıcaklığında, 30, 40, 50, 60°C de yapılan denemeler sonucunda türevin sadece oda sıcaklığında oluştuğu diğer sıcaklıklarda reaksiyonun gerçekleşmediği saptanmıştır.

Tablo 4-2 Rosuvastatin-ADAM türevlerinin belirli bekleme süreleri sonrasındaki pik alanları

<i>Süre</i>	10	20	30	40	50	60	70	80
<i>Pik alanı</i>	103005	105840	116787	125676	143654	163856	161416	162343



Şekil 4:2 Reaksiyon süresi grafiği

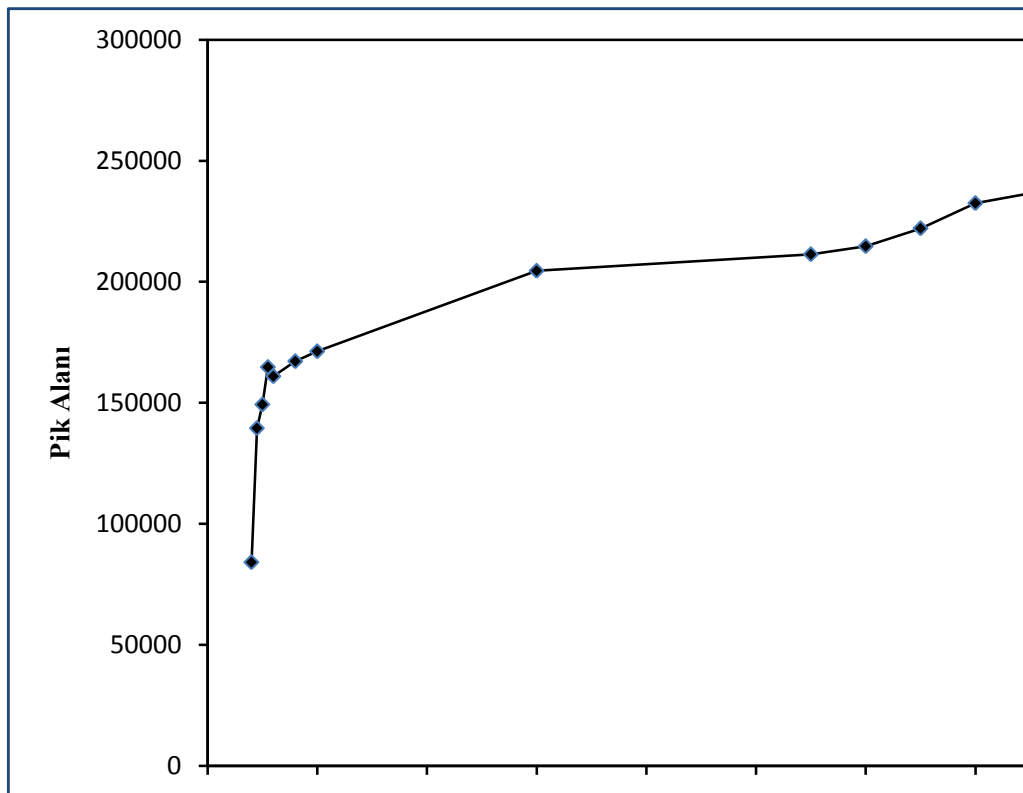
4.1.2.2. Belirteç miktarı

Türevlendirme reaksiyonunun optimum koşullarda yürümesi için gerekli belirteç miktarının belirlenmesinde 3.3.2.2. de belirtildiği gibi çalışıldı. Belirtecın madde miktarına oranı 40-800 mol katı olacak şekilde artan miktarları ile yapılan reaksiyonlar sonucunda yüksek belirteç mol katlarında da artan pik alan değerleri elde edilmesine rağmen, yüksek belirteç miktarlarında boş denemede belirteç piklerinin de büyümesi ve pahalı bir belirteç olan ADAM'ın sarfiyatını minimumda tutulması gerekliliği nedeniyle 55 kat belirteç ile çalışılmasının uygun olduğuna karar verildi.

Tablo 4-3 Çeşitli mol oranlarında oluşturulan türevin pik alanları

ADAM/Rosuvastatin mol oranı	40	45	50	55	60	80	100
Pik alanı	84163	139516	149311	164765	160986	167179	171287

ADAM/Rosuvastatin mol oranı	300	550	600	650	700	800
Pik alanı	204543	211359	214696	222069	232487	240733



Şekil 4:3 Rosuvastatinin ADAM türevinin oluşumu üzerine belirteç miktarının etkisi

4.1.3. Rosuvastatinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Analizi

Rosuvastatinin ADAM belirteci ile oluşturduğu türevin HPLC ile analizinin yapılabilmesi için dedektör dalgaboyları, kolon, mobil faz sistemi, elüsyon tipi, mobil faz akış hızı gibi kromatografik koşullar belirlendi, iç standart madde araştırıldı. Belirlenen koşullarda tabletlerden ve serumdan rosuvastatin analizleri yapıldı. Serumdan analiz için uygun ekstraksiyon yöntemi belirlendi. Bu bölümde belirlenen koşullar ile elde edilen sonuçlara yer verilmiştir.

4.1.3.1.Kromatografik Koşulların Belirlenmesi

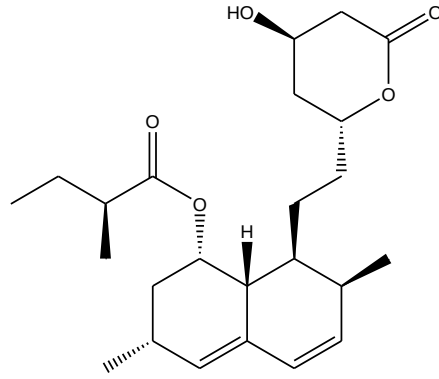
ADAM belirteci ile yapılan reaksiyon sonucu elde edilen türeve ait pik ile reaksiyon ortamındaki ve serumdaki kirliliklerin en iyi şekilde rezolüsyonu 250 mm uzunluğunda, 4,6 mm iç çapında, 4 µm partikül çaplı C₁₈ kolonda, asetonitril-su çözücü sisteminin aşağıdaki tablodaki gibi gradient uygulanması ile 30°C de, 1 mL/dak akış hızında elde edilmiştir. Fluorimetrik dedeksiyonda maksimum eksitasyon ve emisyon dalgaboyları sırasıyla 366 ve 410 nm olarak belirlenmiştir. Bu kromatografik sistemde türev pikinin alıkonma zamanı 13,6 dakika olarak bulunmuştur.

Tablo4-4 Gradient Program

<i>Gradient Program</i>		
<i>Zaman (dak)</i>	<i>Asetonitril (%)</i>	<i>Su (%)</i>
0.01	40	60
10	80	20
15	80	20
15.01	40	60
20	40	60

4.1.3.2. IS Seçimi

Bölüm 3.3.3.2 de belirtilen etken maddelerle yapılan denemelerde lovastatin dışındaki maddelerden bazıları (sodyum asetat, glukuronik asit) belirlenen koşullarda ADAM belirteci ile reaksiyon vermezken bazıları da (stearik asit, lisinopril) rosuvastatinin ekstraksiyon koşullarında biyolojik sıvıdan ekstre edilememiştir. Kalan etken maddelerin içinden serum ekstraksiyon verimi en yüksek olan ve rosuvastatin piki ile rezolüsyonu en iyi olan lovastatin (Şekil 4.4) IS olarak seçilmiştir. Alıkonma zamanı 15,6 dakikadır.



Şekil 4:4 Lovastatinin kimyasal formülü

4.1.3.3. Sulu Çözeltide Hazırlanan Ölçü Eğrilerinin Regresyon Analizi

0,01-20 ng/mL konsantrasyon aralığında 6 farklı konsantrasyondaki standart çözeltiler ile Bölüm 3.3.3.3 de anlatıldığı gibi çalışıldı. Her konsantrasyona karşı elde edilen ortalama pik alan oranı değerleri yardımı ile 0,01-20 ng/mL aralığında çizilen ölçü eğrisi Şekil 4.5 de verilmiştir.

Pik alan oranlarının ortalaması (A_{Ros}/A_{IS}), SD ve RSD değerleri Tablo 4-5 de, en küçük kareler yöntemi uygulanarak alan oranlarının ortalama değerlerinden hesaplanan doğru denkleminde ($A = mC + b$ [m = eğim, b = kesim noktası, C = konsantrasyon]) elde edilen değişkenler ve korelasyon katsayıları (r) Tablo 4-6 da verilmiştir.

10 ng/mL rosuvastatin ve 500 ng/mL iç standart katkılı sulu çözelti ve boş sulu çözelti örneklerine ait kromatogramlar Şekil 4.7 ve 4.8 de gösterilmiştir.

Tablo 4-6 Tablo 4-5 deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler

	1	2	3	4	5	6	Ortalama
<i>Eğim</i>	0,2614	0,2617	0,2617	0,2624	0,2610	0,2617	0,2617
<i>Kesim noktası</i>	0,1528	0,1584	0,1601	0,1522	0,1596	0,1579	0,1568
<i>r</i>	0,9976	0,9975	0,9977	0,9973	0,9975	0,9973	0,9975

4.1.3.4. Serumdan Ekstraksiyon İşlemi

Bölüm 3.3.3.4 de anlatıldığı üzere, çeşitli çözücülerle protein çöktürme denemeleri, asidik, bazik ve nötr pH'lara getirilen serum örneklerinden çeşitli çözücüler ve bunların belli oranlardaki karışımları ile yapılan sıvı-sıvı ekstraksiyon denemeleri, çöktürme ve sıvı-sıvı ekstraksiyonun ardarda uygulanması ve son olarak literatürde bulunan SPE metodu ile yapılan denemeler sonucunda rosuvastatin ve IS maddesi için en uygun ekstraksiyon metodu 0,1 M pH 4 asetat tamponlu ortamda, EA-MTBE (1:1) karışımı ile yapılan sıvı-sıvı ekstraksiyonu olduğuna karar verilmiştir. Ölçülen alan değerleri ve bunların elde edildiği çözücü karışımları ise Tablo 4-7 de görülmektedir. Alınan sonuçlar incelendiğinde en yüksek uygun çözücü karışımının EA-MTBE (1:1) olduğu saptanmıştır.

Tablo 4-7 Ölçülen alan değerleri ve bunların elde edildiği çözücü karışımları

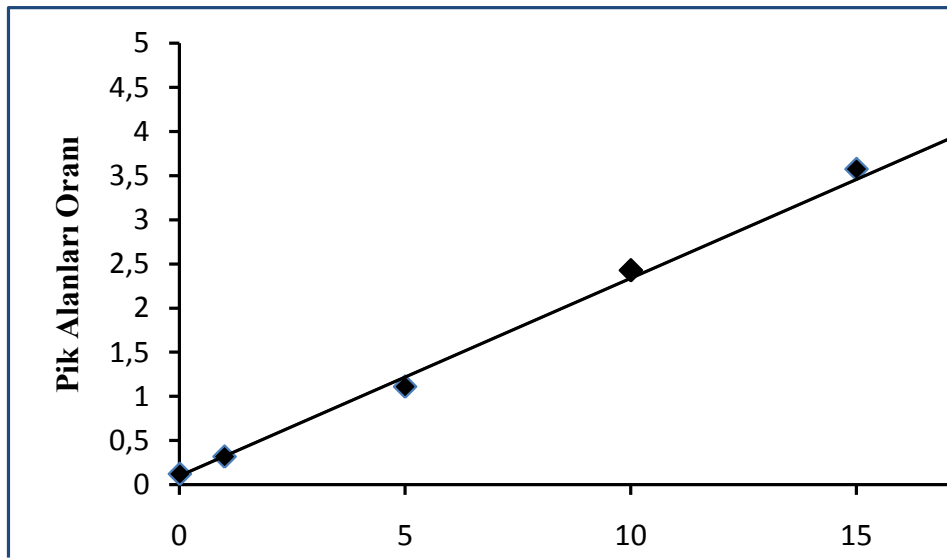
Ortam	Çözücü	Pik Alanı
0,1 M pH 4 Asetat Tamponu	EA	29735
	EA-MTBE (1:1)	27628
	MTBE	25337

4.1.3.5 Serumda Hazırlanan Ölçü Eğrilerinin Regresyon Analizi

0,01-20 ng/mL konsantrasyon aralığında 6 farklı konsantrasyondaki standart çözeltilerin 100 µl serum örneğine katılmasıyla hazırlanan çözeltiler ile Bölüm 3.3.3.5 de anlatıldığı gibi çalışıldı. Her konsantrasyona karşı elde edilen ortalama pik alan oranı

değerleri yardımı ile 0,01-20 ng/mL aralığında çizilen ölçü eğrisi Şekil 4.6 da verilmiştir.

Pik alan oranlarının ortalaması (A_{ROS}/A_{IS}), SD ve RSD değerleri Tablo 4-8 de, en küçük kareler yöntemi uygulanarak alan oranlarının ortalama değerlerinden hesaplanan doğru denkleminde ($A = mC + b$ [m = eğim, b = kesim noktası, C = konsantrasyon]) elde edilen değişkenler ve korelasyon katsayıları (r) Tablo 4-9 da verilmiştir.



Şekil 4:6 Rosuvastatinin 0,01-20 ng/mL konsantrasyon aralığında katkı serumda hazırlanan ölçü eğrisi

Tablo 4-8 Rosuvastatinin 0,01-20 ng/mL konsantrasyon aralığında katkılı serumda hazırlanan ölçü eğrilerine ait pik alan oranları değerleri ve istatistik verileri

C (ng/mL) A_{Ros}/A_{IS}	0,01	1	5	10	15	20
1	0,1062	0,3216	1,1365	2,4395	3,5752	4,3665
2	0,1225	0,3355	1,1108	2,4158	3,5758	4,5438
3	0,1304	0,3052	1,1082	2,4422	3,5662	4,5502
4	0,1225	0,3265	1,0164	2,4184	3,5735	4,3615
5	0,1246	0,3117	1,0857	2,4057	3,5814	4,4427
6	0,1185	0,3002	1,2016	2,4436	3,5802	4,5582
Ortalama	0,1208	0,3168	1,1099	2,4275	3,5754	4,4705
SD	0,0081	0,0134	0,0607	0,0162	0,0054	0,0926
RSD (%)	6,7346	4,2421	5,4729	0,6679	0,1519	2,0717
Ortalama alan oran (A_{Ros}/A_{IS}) değerlerinden hesaplanan doğru denklemi: $A = 0,2237C + 0,1017$ ($r = 0,9971$)						

Tablo 4-9 Tablo 4-8 deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler

	1	2	3	4	5	6	Ortalama
Eğim	0,22	0,2258	0,2265	0,2204	0,2231	0,2265	0,2237
Kesim noktası	0,1208	0,0984	0,0914	0,0958	0,0953	0,1082	0,1017
r	0,9955	0,9981	0,998	0,9937	0,9965	0,9988	0,9968

4.1.3.6. Serumdan Geri Kazanım Oranı

Rosuvastatinin serumdan geri kazanım oranını saptamak amacıyla üç farklı konsantrasyonda rosuvastatin içeren serum örnekleri Bölüm 3.3.3.6 da anlatıldığı gibi çalışıldı. Hesaplanan geri kazanım oranları Tablo 4-10 da verilmiştir.

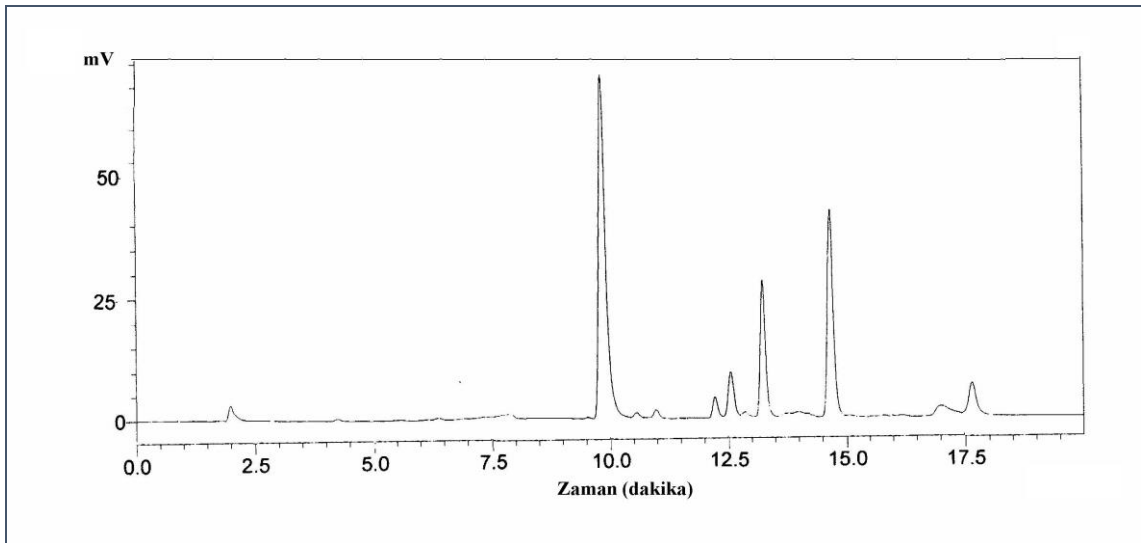
Tablo 4-10 Rosuvastatinin serumdan geri kazanımı

<i>Seruma katılan rosuvastatin miktarı (ng/mL)</i>	<i>Bulunan konsantrasyon (ng/mL) $\pm$ SD</i>	<i>% Geri kazanım</i>	<i>% RSD</i>
1	0,80 $\pm$ 0,023	81,4	4,220
5	3,98 $\pm$ 0,043	80,0	1,551
15	11,94 $\pm$ 0,101	79,8	1,061

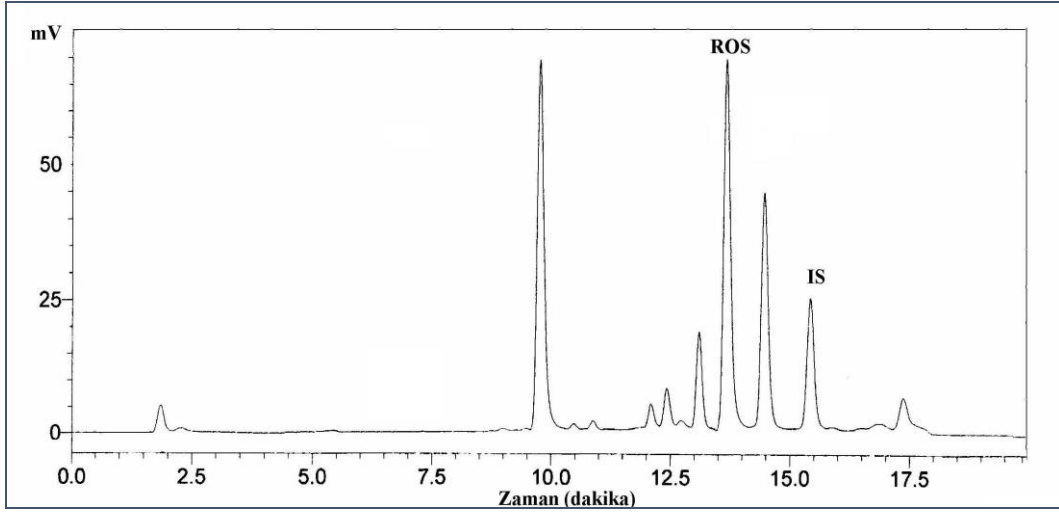
4.2. Yöntem Validasyonu

4.2.1. Seçicilik

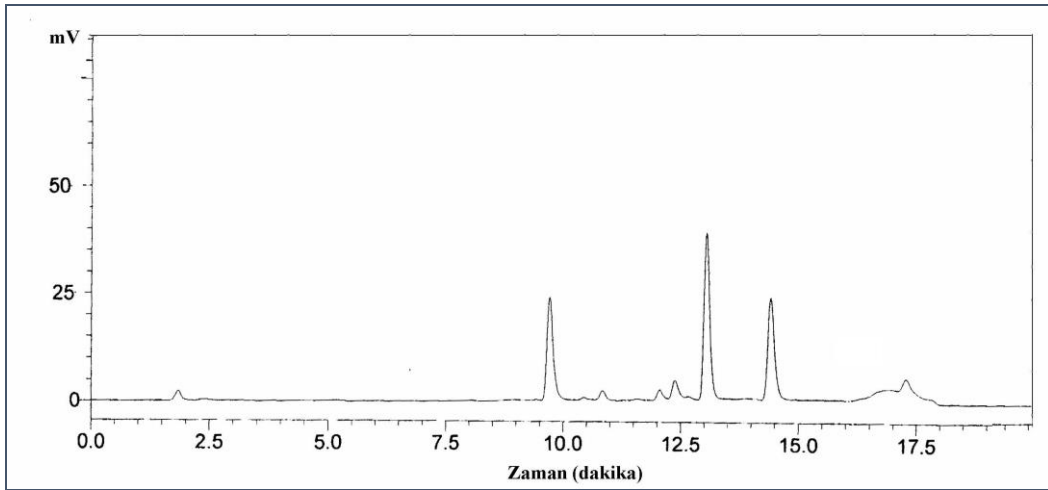
Yöntemin seçiciliğinin tayini amacıyla yapılan analizler sonucunda rosuvastatin/ADAM ve IS/ADAM piklerinin alıkonma zamanlarında belirteçten ve reaksiyon ortamındaki kirliliklerinden herhangi bir girişim olmadığı saptandı. Çözeltilere ait kromatogramlar Şekil 4.7, 4.8, 4.9, 4.10 da verilmiştir.



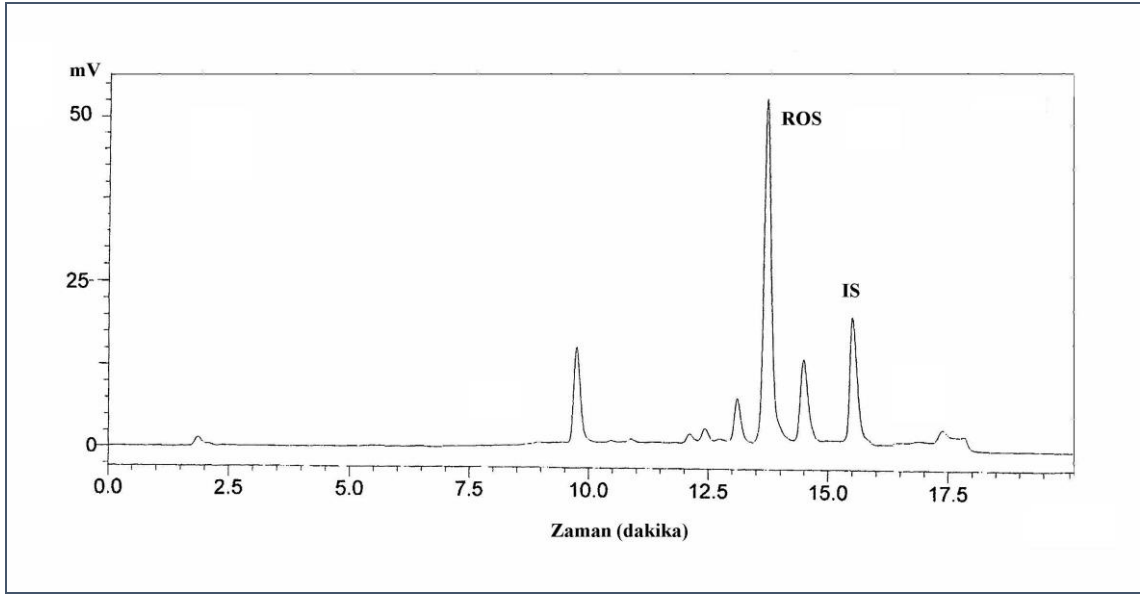
Şekil 4:7 Boş sulu çözeltiye ait kromatogram



Şekil 4:8 10 ng/mL rosuvastatin ve 500 ng/mL iç standart katkılı sulu çözelti örneğine ait kromatogram



Şekil 4:9 Boş serum örneğine ait kromatogram



Şekil 4:10 15 ng/mL rosuvastatin ve 500 ng/mL iç standart katkılı serum örneğine ait kromatogram

4.2.2. Doğrusallık Aralığı

Doğrusallık aralığı 0,01-20 ng/mL olarak saptandı. Bu aralıktaki 6 noktada yapılan çalışmalarla ilgili doğrusallık grafikleri ve parametreleri ile ilgili sonuçlar sulu çözelti ve serum için sırasıyla Bölüm 4.1.3.3. ve 4.1.3.5 de verilmiştir.

4.2.3. Doğruluk

Rosuvastatin için sulu çözeltide ve serumda 1, 5, 15 ng/mL lik konsantrasyonlarda yapılan doğruluk çalışmasına ait sonuçlar Tablo 4-10 ve 4-11 de verilmiştir. RSD ve RME değerleri sulu çözeltide % 0,18- 2,32 ile % 0,84- 2,93 ve serumda % 0,31-4,41 ile % (-0,14)- (-4,4) olarak bulundu.

Tablo 4-11 Sulu çözeltide doğruluk ve geri kazanım değerleri

	<i>Sulu çözeltiye eklenen rosuvastatin miktarı (ng/mL)</i>		
	<i>1</i>	<i>5</i>	<i>15</i>
<i>Bulunan konsantrasyon (ng/mL)</i>	1,01	4,96	14,95
	0,98	4,98	14,97
	0,97	5,02	15,02
	0,98	4,97	15,01
	0,96	4,96	14,96
	1,02	4,99	14,97
<i>Ortalama</i>	0,98	4,98	14,98
<i>SD</i>	0,022	0,023	0,027
<i>RSD (%)</i>	2,322	0,461	0,180
<i>RME (%)</i>	-1,8	-0,32	-0,09
<i>Geri kazanım (%) ort</i>	98,0	99,6	99,9
<i>Geri kazanım (%) RSD</i>	1,909	0,500	0,208

Tablo 4-12 Serumda doğruluk ve geri kazanım değerleri

	<i>Seruma eklenen rosuvastatin miktarı (ng/mL)</i>		
	<i>1</i>	<i>5</i>	<i>15</i>
Bulunan konsantrasyon (ng/mL)	0,94	4,92	14,91
	0,91	4,91	14,96
	0,97	4,96	15,03
	1,02	4,88	14,92
	0,95	4,96	15,02
	0,93	4,98	14,96
Ortalama	0,956	4,94	14,97
SD	0,042	0,041	0,046
RSD (%)	4,413	0,839	0,307
RME (%)	-4,4	-1,24	-0,14
Geri kazanım (%) ort	95,8	98,5	99,8
Geri kazanım (%) RSD	4,226	0,697	0,370

4.2.4. Tekrarlanabilirlik (Kesinlik)

Düşük, orta ve yüksek konsantrasyonda rosuvastatin içeren serum örnekleri ile (1, 5, 15 ng/mL) Bölüm 3.3.3.5. de anlatıldığı gibi çalışıldı.

Aynı gün içinde yapılan analizlerde her bir örnek 6 kez çalışıldı. RSD değerleri sulu örnekler için 3,73-0,23 ve serum örnekleri için 3,96-0,35 aralığında hesaplandı (Tablo 4-13 ve Tablo 4-14).

2 ay içerisinde 6 farklı günde yapılan analizler sonucu elde edilen RSD değerleri sulu örnekler için 3,75-0,24 ve serum örnekleri için 4,7–0,20 aralığında bulundu (Tablo 4-15 ve Tablo 4-16).

Tablo 4-13 Aynı gün içinde sulu çözeltide yapılan rosuvastatin analizlerinin tekrarlanabilirliği

	<i>Sulu çözeltiye eklenen rosuvastatin miktarı (ng/mL)</i>		
	<i>1</i>	<i>5</i>	<i>15</i>
Bulunan konsantrasyon (ng/mL)	0,99	5,02	14,98
	0,95	4,98	15,03
	0,97	4,99	14,95
	1,04	5,05	14,96
	1,02	4,95	14,98
	0,98	4,92	15,02
Ortalama	0,99	4,98	14,98
SD	0,0370	0,0486	0,0356
RSD (%)	3,7312	0,9779	0,2377
RME (%)	-0,8	-0,44	-0,08

Tablo 4-14 Aynı gün içinde serumda yapılan rosuvastatin analizlerinin tekrarlanabilirliği

	<i>Seruma eklenen rosuvastatin miktarı (ng/mL)</i>		
	<i>1</i>	<i>5</i>	<i>15</i>
Bulunan konsantrasyon (ng/mL)	0,98	4,96	14,93
	0,92	4,87	14,96
	1,02	4,92	14,89
	0,97	4,97	14,92
	0,94	4,85	14,97
	0,95	4,99	15,03
Ortalama	0,96	4,92	14,95
SD	0,0381	0,0608	0,0532
RSD (%)	3,9666	1,2363	0,3557
RME (%)	-4,01	-1,61	-0,31

Tablo 4-15 Farklı günlerde sulu çözeltide yapılan rosuvastatin analizlerinin tekrarlanabilirliği

	<i>Sulu çözeltiye eklenen rosuvastatin miktarı (ng/mL)</i>		
	<i>1</i>	<i>5</i>	<i>15</i>
Bulunan konsantrasyon (ng/mL)	0,94	4,98	14,95
	0,97	4,96	14,98
	1,03	5,04	14,97
	1,06	5,02	15,05
	0,98	4,96	14,96
	0,99	4,97	14,97
Ortalama	1,01	4,99	14,98
SD	0,0378	0,0374	0,0365
RSD (%)	3,7589	0,7498	0,2433
RME (%)	0,6	-0,2	-0,0933

Tablo 4-16 Farklı günlerde serumda yapılan rosuvastatin analizlerinin tekrarlanabilirliği

	<i>Seruma eklenen rosuvastatin miktarı (ng/mL)</i>		
	<i>1</i>	<i>5</i>	<i>15</i>
Bulunan konsantrasyon (ng/mL)	0,89	4,93	14,83
	0,91	4,91	14,92
	0,94	4,98	14,89
	1,03	4,89	14,95
	0,96	4,93	14,92
	0,94	4,89	14,97
Ortalama	0,95	4,92	14,93
SD	0,0451	0,0374	0,0308
RSD (%)	4,7129	0,7605	0,2064
RME (%)	-4,41	-1,62	-0,4667

4.2.5.Tayin sınırı (LOQ) ve Gözlenebilme Sınırı (LOD)

Bölüm 3.4.5. de verilen denklemlere göre hesaplanan LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,00068 ve 0,0023 ng/mL olarak bulunmuştur.

4.2.6.Türev Stabilitesi

Türevin stabilitesinin tayini için oda sıcaklığında karanlıkta, +4⁰C karanlıkta 12, 24, 48, 72, 96 saat bekletilerek yapılan çalışmalar sonucunda türevin +4⁰C de ve karanlıkta 96 saat kararlı kaldığı saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4-17 de verilmiştir.

Tablo 4-17 Oda sıcaklığında gün ışığında ve karanlıkta, +4°C de karanlıkta bekletilen Rosuvastatin-ADAM türevinin stabilitesi

	<i>Pik alanları</i>					
	<i>Başlangıç</i>	<i>12saat sonra</i>	<i>24saat sonra</i>	<i>48saat sonra</i>	<i>72saat sonra</i>	<i>96saat sonra</i>
<i>Oda sıcaklığı karanlıkta</i>	172826	171634	170878	170176	169978	169176
<i>+4°C de karanlıkta</i>	172856	172873	172435	172291	171792	171886

4.3. Geliştirilen Yöntemin Tabletlerde Rosuvastatin Miktar Tayinine Uygulanması ve Sonuçların Kıyas Yöntemi İle Elde Edilen Sonuçlarla Karşılaştırılması

20 mg rosuvastatin kalsiyum içeren Crestor® 20 mg tablet Bölüm 3.4.1. de anlatıldığı gibi geliştirilen HPLC yöntemiyle analiz edildi. Sonuçları kıyaslamak amacıyla tabletler bir kez de literatürdeki HPLC-UV yöntem ile analiz edildi. Her iki yöntem ile elde edilen sonuçlar ve 6 adet tayin üzerinden hesaplanan ortalama (A_{ort}), SD, RSD ve % 95 olasılık düzeyinde güven aralığı [$A_{ort} \pm (t.s/\sqrt{n})$] değerleri Tablo 4-18 de verilmiştir.

Geliştirilen yöntem ve kıyas yöntemi ile elde edilen sonuçların ortalamalar yönünden karşılaştırılması student (t) testi, standart sapmalar yönünden karşılaştırılması ise Fischer (F) testi uygulanarak yapılmıştır. Tablo 4-18 deki sonuçlar incelendiğinde hesaplanan t- ve F- değerleri % 95 olasılık düzeyi ve 6 deneme için ilgili cetvellerde bildirilen değerlerden daha küçük olduğundan geliştirilen HPLC yöntemi ile kıyas yöntemi arasında gerek doğruluk gerekse kesinlik bakımından anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir.

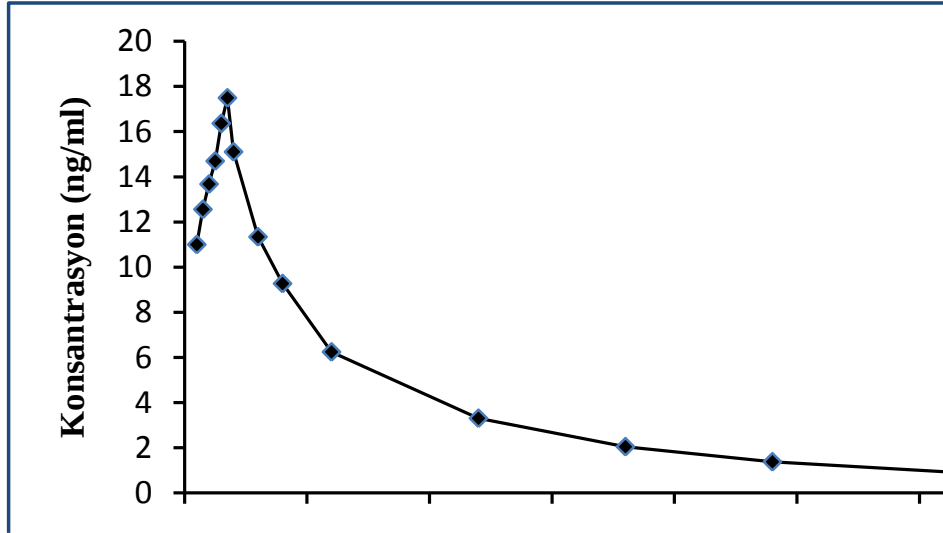
Tablo 4-18 20 mg rosuvastatin içeren tabletlerin analiz sonuçları ve sonuçların istatistiki olarak değerlendirilmesi

	<i>Geliştirilen HPLC Yöntemi</i>		<i>Kıyas Yöntemi</i>	
<i>N</i>	<i>mg/tablet</i>	<i>%</i>	<i>mg/tablet</i>	<i>%</i>
<i>1</i>	19,85	99,25	19,93	99,65
<i>2</i>	19,89	99,45	19,85	99,25
<i>3</i>	19,93	99,65	19,97	99,85
<i>4</i>	19,87	99,35	19,95	99,75
<i>5</i>	19,97	99,85	20,01	100,05
<i>6</i>	19,93	99,65	19,97	99,85
<i>Ortalama</i>	19,902		19,942	
<i>SD</i>	0,0482		0,0593	
<i>RSD</i>	0,2420		0,2975	
<i>Güven Aralığı</i>	0,0273		0,0336	
<i>Güven Sınırları</i>	19,875-19,929		19,908-19,976	
<i>t = 1,387</i>	<i>n₁ = n₂ = 6</i>		<i>t_{tablo} = 2,228</i>	
<i>F = 1,517</i>	<i>P = 0,05</i>		<i>F_{tablo} = 5,05</i>	

4.4. Geliştirilen Yöntem ile Serumda Rosuvastatin Tayini ve Farmakokinetik Parametrelerinin Hesaplanması

29 yaşında sağlıklı bir gönüllü tarafından tek doz 20 mg rosuvastatin kalsiyum alımını takiben Bölüm 3.5 de yazılan zaman aralıklarında toplanan kan örnekleri Bölüm 3.5. ve 3.3.3.5. de anlatıldığı gibi analiz edilmiştir (n=4). Bu örneklerin içerdiği rosuvastatin miktarı serum için hazırlanan ölçü eğrilerine ait ortalama doğru denkleminde bulunmuş (Tablo 4-19) ve serum rosuvastatin konsantrasyonunun zamana karşı değişimini gösteren grafik çizilmiştir (Şekil 4.11). Bu grafiğin incelenmesinden anlaşılabileceği gibi, ilacın alımından 3,5 saat (t_{maks}) sonra maksimum

plazma konsantrasyonuna ($C_{maks} = 17,5 \text{ ng/mL}$) ulaşıldığı görülmüş, eliminasyon yarı ömrü ($t_{1/2}$) 18,09 saat ve eğri altında kalan alan ($AUC_{0-\infty}$) 286,06 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4-20). Şekil 4.12 ve 4.13 de rosuvastatin içilmesinden 4 ve 72 saat sonra alınan kan örneklerinin analizi sonucu elde edilen kromatogramlar görülmektedir.



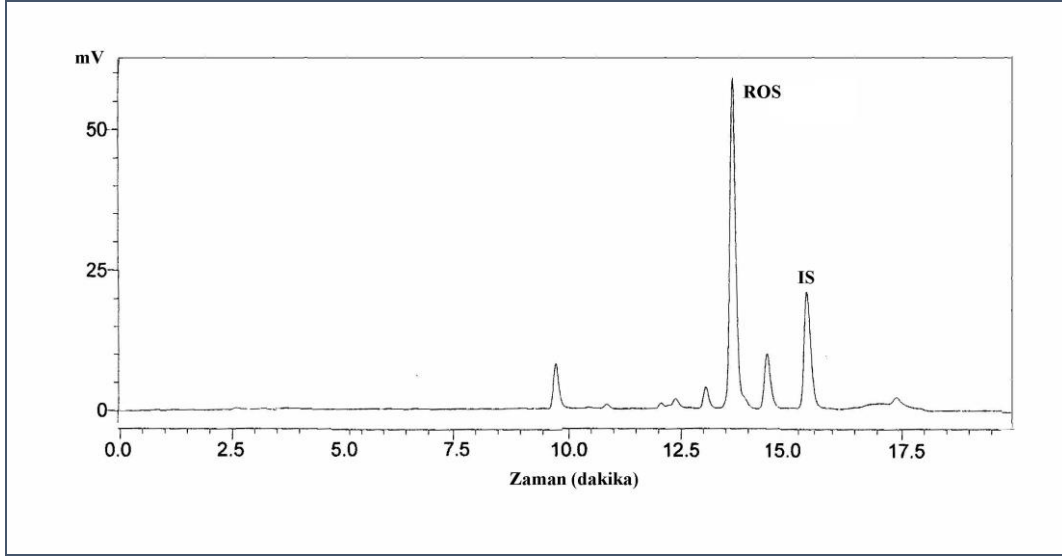
Şekil 4:11 Serumda Rosuvastatin Konsantrasyonunun Zamana Karşı Değişimi

Tablo 4-19 Serum Rosuvastatin Konsantrasyonunun Zamana Karşı Değişimi

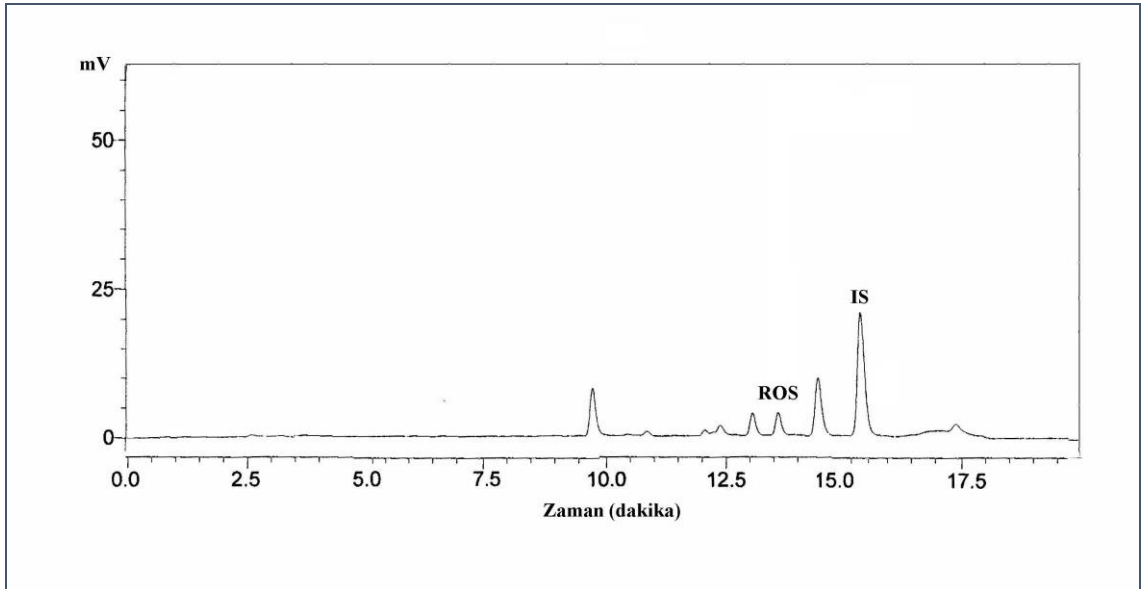
<i>Zaman (saat)</i>	<i>Serumda Rosuvastatin Konsantrasyonu (ng/mL)</i>
1	11
1,5	12,56
2	13,68
2,5	14,7
3	16,37
3,5	17,5
4	15,11
6	11,34
8	9,27
12	6,24
24	3,3
36	2,04
48	1,37
72	0,62

Tablo 4-20 1 adet Crestor® 20mg tablet alımından sonra hesaplanan farmakokinetik parametreler

<i>C_{maks} (ng/mL)</i>	17,5
<i>t_{maks} (saat)</i>	3,5
<i>t_{1/2} (saat)</i>	18,09
<i>AUC_(0-∞) (ng.saat.mL⁻¹)</i>	286,06



Şekil 4:12 20 mg tek doz rosuvastatin kalsiyum alan sağlıklı gönüllüden 4 saat sonra alınan serum örneğine ait kromatogram



Şekil 4:13 20 mg tek doz rosuvastatin kalsiyum alan sağlıklı gönüllüden 72 saat sonra alınan serum örneğine ait kromatogram

5. TARTIŞMA

Rosuvastatin statin grubu ilaçların en yeni, en etkili ve en çok kullanılan üyelerinden biridir. Etkisini, diğer statin grubu antihiperlipidemik ilaçlar gibi HMG-KoA redüktaz enzimini inhibe ederek ve karaciğerde kolesterol sentezini azaltarak gösterir [3].

Rosuvastatinin hem tabletlerdeki kullanım dozunun hem de biyoyararlanımının düşük olması nedeniyle kandaki konsantrasyonu da düşüktür. Bu nedenle biyolojik sıvılardaki analizi için hassas metotlara ihtiyaç vardır. Sıvı kromatografik yöntemlerde UV dedeksiyonla kandaki düşük değerleri tayin etmenin zorluğu bilinmektedir. Bu konuda kütle spektrometrik dedektörlerle yapılan hassas çalışmalar mevcut olmasına rağmen bu cihazlar günümüzde hala oldukça pahalı ve her laboratuvarında bulunamayacak cihazlardır. Bu çalışmada bunlar göz önüne alınarak spektrofotometrik dedektörle tayin tercih edilmiş ve belirteç olarak asit grubu taşıyan maddelerle son derece hassas floresans türevler oluşturan ADAM belirteci seçilmiştir.

ADAM belirteci ile yapılan çalışmalar incelendiğinde reaksiyonun oda sıcaklığında, karanlıkta, herhangi bir ekstraksiyon, katalizör ve ısı gerektirmeden bir süre bekledikten sonra gerçekleştiği, elde edilen fluorimetrik türevin herhangi bir ön işleme gerek duyulmadan HPLC sistemine enjekte edildiği görülmüştür. Bu bilgiler ışığında rosuvastatin ve ADAM arasındaki reaksiyonun optimum koşulları araştırılmıştır.

Rosuvastatin tuzu halinde bulunan bir etken madde olduğu için önce maddenin baz haline dönüştürülmesi ve sonra türevlendirilmesi gerekmiştir. Bu amaçla çeşitli ortamlarda, çeşitli çözücüler ve çözücü karışımları denenmiş ve en iyi sonuçların 0,1 M pH 4 asetat tamponlu ortamda EA:MTBE (1:1) çözücü karışımı ile elde edildiği görülmüştür. Ekstraksiyondan sonra çözücüler uçurulup kalıntı üzerinde ısı, reaksiyon süresi, ve belirteç miktarı denemeleri yapılmıştır. Bu reaksiyonun oda sıcaklığında, karanlıkta, 55 kat belirteç ilavesi ile 1 saat bekletilerek yapıldığında en yüksek verimle yürüdüğü görülmüştür. Ayrıca yukarıdaki koşullarda elde edilen türevin stabilitesi de incelenmiş ve +4°C de karanlıkta 4 gün dayanıklı olduğu görülmüştür.

Bu çalışmalara paralel olarak HPLC analizi için en uygun koşulları belirlemek amacıyla denemeler yapılmıştır. Bazı ters faz kolonlarda (CN, C₈ ve C₁₈ 5 ve 4 µm id.), çeşitli oranlarda asetonitril-su, asetonitril/10 mM fosfat tamponu (pH 5, 6 ve 7),

asetonitril/10 mM ortofosforik asit (pH 2,4), asetonitril- trifluoroasetik asit (pH 5) sistemleri izokratik koşullarda ve çeşitli gradient programlar uygulanarak, değişik akış hızlarında denenmiştir. ADAM belirteci ile yapılan reaksiyon sonucu elde edilen türeve ait pik ile reaksiyon ortamındaki ve serumdaki kirliliklerin en iyi şekilde rezolüsyonu 250 mm uzunluğunda, 4,6 mm iç çapında, 4 µm partikül çaplı C₁₈ kolonda, asetonitril-su çözücü sisteminin Tablo 4.4 deki gibi gradient uygulanması ile 30°C de, 1 mL/dak akış hızında elde edilmiştir. Fluorimetrik dedeksiyonda maksimum eksitasyon ve emisyon dalgaboyları sırasıyla 366 ve 410 nm olarak belirlenmiştir. Bu kromatografik sistemde türev pikinin alıkonma zamanı 13,6 dakika olarak bulunmuştur.

Çeşitli ilaç maddelerinin denenmesi sonucu hem rosuvastatin için geliştirilen optimum reaksiyon koşullarına hem de kromatografi koşullarına uyum sağlayan IS madde olarak lovastatin belirlenmiştir. Analiz sonuçları rosuvastatin/ADAM türevlerine ait pik alanlarının, lovastatin/ADAM türevlerine ait pik alanlarına oranlanması ile değerlendirilmiştir.

Rosuvastatinin karboksilik asit grubunun türevlendirilmesi ile sulu ortamda geliştirilen yöntemin biyolojik sıvılara uygulanmasında plazmanın elde edilmesinde kullanılan sodyum sitrat, EDTA vb. gibi maddelerin de belirteç ile reaksiyona girme ihtimali düşünülerek serumda çalışma tercih edilmiştir.

Serum proteinlerinin olası girişimlerini engellemek ve rosuvastatinin serumdan ekstraksiyonunu gerçekleştirmek için çeşitli çözücülerle protein çöktürme denemeleri, asidik, bazik ve nötr pH lara getirilen serum örneklerinden çeşitli çözücüler ve bunların belli oranlardaki karışımları ile yapılan sıvı-sıvı ekstraksiyon denemeleri, çöktürme ve sıvı-sıvı ekstraksiyonun ardarda uygulanması ve literatürdeki SPE metodunun uygulamaları yapılmıştır. Yapılan denemeler sonucunda rosuvastatin ve IS maddesi için en uygun ekstraksiyon metodunun 0,1 M pH 4 asetat tamponlu ortamda, EA-MTBE (1:1) karışımı ile yapılan sıvı-sıvı ekstraksiyonu olduğuna karar verilmiştir.

Belirlenen koşullarda çalışılarak sulu çözeltide ve serumda 0,01-20 ng.mL⁻¹ konsantrasyon aralığında ölçü eğrileri hazırlanmış ve konsantrasyona karşılık pik alan oranı değerleri yardımıyla en küçük kareler yöntemi uygulanarak ortalama doğru denklemleri sulu çözeltide $A = 0,2617C + 0,1566$ ($r = 0,9975$) ve serumda $A = 0,2237C + 0,1017$ ($r = 0,9971$) olarak hesaplanmıştır.

Geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirliğini belirlemek için aynı günde ve farklı günlerde düşük (1 ng/mL), orta (5 ng/mL) ve yüksek (15 ng/mL) konsantrasyonlarda rosuvastatin içeren sulu çözelti ve serum örnekleri 6 kez analiz edilmiş ve analizlere ait RSD (sulu çözeltide % 0,23-3,75, serumda % 0,29-3,39) değerleri yöntemin kesinliğinin yeterli derecede yüksek olduğunu göstermiştir. Yöntemin doğruluğunu belirlemek amacıyla yine 1, 5, 15 ng/mL konsantrasyonlarda rosuvastatin içeren örnekler 6 kez analiz edilmiş ve analizlere ait RSD ve RME değerleri sulu çözeltide 2,32-0,18 ve (-0,09) - (-1,8) ve serumda 4,41- 0,31 ve (-4,4)-(-0,14) olarak bulunmuştur. Ayrıca ölçü eğrilerinin eğimi ve y eksenini kestiği nokta kullanılarak hesaplanan tayin ve gözlenebilirlik sınırları da sırasıyla 0,00068 ve 0,0023 ng/mL olarak bulunmuştur.

Serumdan yapılan ekstraksiyon geri kazanım oranı çalışmalarında 1, 5, 15 ng/mL konsantrasyonlarda rosuvastatin içeren çözeltilerin analiz sonuçları sulu örneklerle çalışılan ölçü eğrisi kullanılarak hesaplanmış ve serumdan ekstraksiyon geri kazanım oranı % 79,8 – 81,4 arasında bulunmuştur.

Geliştirilen yöntemin tablet analizlerine uygulanabilirliği literatürdeki HPLC-UV yöntemi ile kıyaslanmak suretiyle istatistiki olarak incelenmiştir. Hesaplanan t- ve F- değerleri % 95 olasılık düzeyi için ilgili cetvellerdeki değerlerden daha küçük olduğundan geliştirilen yöntemin tablet analizlerine başarıyla uygulanabileceği anlaşılmıştır.

Serumda geliştirilen yöntemin farmakokinetik çalışmalara uygulanabilirliği ise sağlıklı bir gönüllünün tek doz 20 mg rosuvastatin alınmasının ardından çeşitli zaman aralıklarında toplanan kan örnekleri analiz edilerek incelenmiştir. Yöntemin hassasiyetinin tek doz ilaç alınmasının ardından 72 saatten fazla süre ilacın takibine olanak sağladığı görülmüş sonuçlardan elde edilen $C_{maks.}$, $t_{maks.}$, $t_{1/2,el}$, $AUC_{0-\infty}$ gibi farmakokinetik parametreler literatür bilgileriyle uygunluk göstermiştir. Böylece bu yöntemin biyoyararlanım, biyoeşdeğerlik çalışmalarında da başarıyla kullanılabileceği belirlenmiştir.

Sulu çözeltide ve serumda geliştirilen bu yöntem rosuvastatinin tayini için literatürde bildirilen çalışmalar ile karşılaştırıldığında şu sonuçlara varılabilir. Geliştirilen yöntem maddenin türevlendirilmesine ve fluorimetrik dedeksiyonla izlenmesine dayanan tek yöntemdir. Reaksiyon oda sıcaklığında, karanlıkta, herhangi bir ekstraksiyon, katalizör ve ısı gerektirmeden bir süre bekletilerek gerçekleşir ve elde edilen fluorimetrik türevler herhangi bir ön işleme gerek duyulmadan HPLC sistemine

enjekte edilir. Genel olarak türevlendirme çalışmalarının zorluğu düşünüldüğünde bu yöntem basit olarak sınıflandırılabilir. Maddenin tabletlerden analizi için daha önce yayınlanmış yöntemlerin bir kısmı tek başına [20,23], bir kısmı safsızlıklar ve bozunma ürünleri ile [21,22,24], bir kısmı ise diğer bazı ilaçlarla yanyana [25-30] yapılmış analizlerdir ve hepsinin hassasiyetleri geliştirilen yönteme göre düşüktür. Ancak hassasiyet tablet analizleri için çok gerekli bir parametre olmadığından bu yöntemin tablet analizlerindeki üstünlüğü tartışılabilir. Fakat biyolojik sıvılardaki analizlere bakıldığında ise bu parametre vazgeçilmez bir gerekliliktir. Rosuvastatinin biyolojik sıvılarda HPLC ile yapılmış çalışmalarından altı tanesi [31-36] UV-dedeksiyona dayanmakta olup bunlar genellikle maddenin diğer statinlerle ya da başka ilaç gruplarından maddeler ile yan yana analizleri için geliştirilmiş yöntemlerdir ve hassasiyetleri farmakokinetik çalışmaların izlenmesi için yeterli değildir. Kütle dedeksiyonuna dayanan diğer dokuz yöntemin [37-46] hassasiyetleri ise elbette farmakokinetik çalışmalar için yeterlidir. Ancak bu cihazlar hala her ilaç laboratuvarında bulunamayacak kadar pahalıdır. Tarafımızdan geliştirilen yöntem hassasiyet açısından 0,00068 ng/mL LOD ve 0,0023 ng/mL LOQ değerleriyle kütle dedeksiyonuna dayanan diğer HPLC çalışmalarının tümünden daha hassastır. Ayrıca kütle dedeksiyonu kadar pahalı olmayan bir cihaza gereksinim duyması açısından kolay uygulanabilir bir yöntemdir.

Özet olarak bu çalışmada farmasötik preparatlarda ve plazmada rosuvastatin tayini için basit, duyarlı, tekrarlanabilirliği ve güvenilirliği yüksek yeni bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Rosuvastatin ve ADAM arasındaki reaksiyonun zahmetsiz ve basit olması, reaksiyon ortamından yeniden ekstraksiyon yapmaya gerek olmaması, rosuvastatinin serumdan geri kazanım oranının ve tekrarlanabilirliğin iyi olması, basit bir kromatografi sistemi ve dedektörü kullanılması yöntemin başlıca üstünlükleridir. Sonuç olarak geliştirilen bu yöntem hem rutin farmasötik analizlerde, hem de biyoyararlanım, biyoeşdeğerlik çalışmalarında ilacın düşük konsantrasyonlarının takip edilmesinde rahatlıkla kullanılabilecek niteliktedir.

KAYNAKLAR

1. Onat A, Sansoy V, Hergenç G, Soydan İ, Adalet K. *Erişkinlerimizde kalp hastalıkları prevalansı, yeni koroner olaylar ve kalpten ölüm sıklığı*, İstanbul: Yelken Basım; 2005.
2. Rağbetli C. *Van Tıp Dergisi*, 2009; 16; 43-47.
3. Rx Media Farma, *İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı*, Genel Editör: Prof. Dr. Levent Üstünes, 2010.
4. Kayaalp O. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. Ankara, Hacettepe TAŞ Kitapçılık, 2000
5. Malloy MJ, Kane JP. Özüner Z. (Çeviren). *Temel ve Klinik Farmakoloji*. İstanbul, Barış Kitabevi, 1995.
6. 3. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Final Report. National Cholesterol Education Program National Heart, Lung, and Blood Institute. National Institutes of Health, 2002, Publication No. 02-5215 September.
7. Carswell C., Plosker L., Jarvis B. Rosuvastatin. *Drugs*, 2002; 62: 2075–2085.
8. Olsson A., Pears J., Mckellar J., Effect of rosuvastatin on low density lipoprotein cholesterol in patients with hypercholesterolemia. *American J. Cardiol.*, 2001; 88: 504-508.
9. White CM. A review of the pharmacologic and pharmacokinetic aspects of rosuvastatin. *J Clin Pharmacol.*, 2002; 42:963-970.
10. Igel M, Sudhop T, Bergmann K. Pharmacology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors (statins), including rosuvastatin and pitavastatin. *J Clin Pharmacol.* 2002; 42: 835-845. Erratum in: *J Clin Pharmacol.* 2003; 43:1015.
11. Martin PD, Mitchell PD, Schneck DW. Pharmacodynamic effects and pharmacokinetics of a new HMG-CoA reductase inhibitor, rosuvastatin, after morning or evening administration in healthy volunteers. *Br J. Clin Pharmacol.* 2002; 54: 472-477.

12. Alka G., Mishra P., Shah K. Simple UV spectrophotometric determination of rosuvastatin calcium in pure form and in pharmaceutical formulations. *E-Journal of Chemistry*, 2009; 6: 89-92.
13. Prajapati P., Bodiwala B., Marolia K. B., Rathod B. P., Shah S. Development and validation of extractive spectrophotometric method for determination of rosuvastatin calcium in pharmaceutical dosage forms. *Journal of Pharmacy Research*, 2010; 3: 2036-2038.
14. Uyar B., Celebier M., Altinoz S. Spectrophotometric determination of rosuvastatin calcium in tablets. *Die Pharmazie*. 2007; 62: 411-413.
15. Tuljarani, G., Sankar, D. Kadgapathi P., Suthakaran R., Satyanarayana B. Visible spectrophotometric determination of rosuvastatin in bulk and pharmaceutical formulations. *Oriental Journal of Chemistry*, 2010; 26: 589-593.
16. Gajjar K., Shah D. Simultaneous estimation of Rosuvastatin and Ezetimibe by Ratio spectra derivative spectrophotometry method in their fixed dosage forms. *International Journal of PharmTech Research*, 2010; 2: 404-410.
17. Kumari K., Saradi S., Rao G., Mukkanti K. Novel spectrophotometric methods for the determination of rosuvastatin in pharmaceutical dosage forms. *Acta Ciencia Indica, Chemistry*, 2009; 35: 281-284.
18. Sane T., Kamat S. Menon S., Shafi R., Mote R. Determination of rosuvastatin calcium in its bulk drug and pharmaceutical preparations by high-performance thin-layer chromatography. *Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 2005; 18: 194-198.
19. Chaudhari B., Patel N., Shah P., Determination of simvastatin, pravastatin sodium and rosuvastatin calcium in tablet dosage forms by HPTLC. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2007; 69: 130-132.
20. Lakshmana R. A., Suneetha D. Development and validation of RP-HPLC method for the estimation of rosuvastatin in bulk and pharmaceutical dosage form. *International Journal of Chemical Sciences*, 2010; 8: 1308-1314.
21. Hasumati A., Sadhana J., Jayant B., Patel N. Development and validation of two chromatographic stability-indicating methods for determination of rosuvastatin in pure form and pharmaceutical preparation. *International Journal of ChemTech Research*, 2009; 1: 677-689.

22. Krishnaiah C., Vishnu M., Prasad B., Satyanarayana, B., Kumar R., Mukkanti K. A validated stability indicating LC and assay method for rosuvastatin. *Analytical Chemistry: An Indian Journal*, 2009; 8: 277-283.
23. Sankar D., B. Joy; Kumar, B. Anil; Krishna, M. Vamsi RP-HPLC method for the estimation of Rosuvastatin calcium in bulk and pharmaceutical dosage forms *Acta Ciencia Indica, Chemistry*, 2007; 33: 1-4.
24. Tushar N., Patel A. K., Kulkarni G. M., Suubbaiah G. Determination of rosuvastatin in the presence of its degradation products by a stability-indicating LC method. *Journal of AOAC International*, 2005; 88: 1142-1147.
25. Sharma S., Sharma M. C.; Kohli D. V., Chaturvedi, S. C. Micellar liquid chromatographic method development for determination of Rosuvastatin Calcium and Ezetimibe in pharmaceutical combination dosage form. *Pharma Chemica*, 2010; 2: 371-377.
26. Sharma S, Sharma M. C., Kohli D. V., Chaturvedi S. C. Simultaneous estimation of Rosuvastatin calcium and Ezetimibe in tablet dosage form by reverse phase high performance liquid chromatography. *Optoelectronics and Advanced Materials, Rapid Communications*, 2010; 4: 238-241.
27. Varghese S. J., Ravi T. K. Determination of rosuvastatin and ezetimibe in a combined tablet dosage form using high-performance column liquid chromatography and high-performance thin-layer chromatography. *Journal of AOAC International*, 2010; 93: 1222-1227.
28. Doshi N., Sheth A., Sharma A., Dave J. B., Patel C. N. Validated RP-HPLC method for simultaneous estimation of Rosuvastatin Calcium and Telmisartan in pharmaceutical dosage form. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2010; 2: 252-263.
29. Gomes F. P., Garcia P. L., Alves J. M. P., Singh A. K., Kedor Hackmann E. R. M., Santoro M. I. R. M. Development and Validation of Stability-Indicating HPLC Methods for Quantitative Determination of Pravastatin, Fluvastatin, Atorvastatin, and Rosuvastatin in Pharmaceuticals. *Analytical Letters*, 2009; 42: 1784-1804.
30. Rajkondawar V. V. Simultaneous estimation of rosuvastatin and ezetimibe by reverse phase high performance liquid chromatography. *Asian J. Chem.*, 2006; 18: 3230-3232.

31. Kumar T. R., Shitut N. R., Kumar P. K., Vinu M. C. A., Kumar V. P., Mullangi R., Srinivas N. R. Determination of rosuvastatin in rat plasma by HPLC: Validation and its application to pharmacokinetic studies. *Biomedical Chromatography*, 2006; 20: 881-887.
32. Sultana N., Arayne M. S., Shahzad W. Simultaneous determination of ceftriaxone sodium and statin drugs in pharmaceutical formulations and human serum by RP-HPLC *Journal of the Chilean Chemical Society*, 2010; 55: 193-198.
33. Ma Y.H., Peng Y.F., Xu Y.R, Yang G.Y., Hu Q.F. Determination of atenolol, rosuvastatin, spironolactone, glibenclamide and naproxen in blood by rapid analysis liquid chromatography, *Asian Journal of Chemistry*, 2010; 22: 1136-1140.
34. Sultana N., Arayne M. S., Iftikhar B. Simultaneous determination of atenolol, rosuvastatin, spironolactone, glibenclamide and naproxen sodium in pharmaceutical formulations and human plasma by RP-HPLC. *Journal of the Chinese Chemical Society* 2008; 55: 1022-1029.
35. Vittal S., Shitut N. R., Kumar T. R., Vinu M. C. A., Mullangi R., Srinivas N. R. Simultaneous quantitation of rosuvastatin and gemfibrozil in human plasma by high-performance liquid chromatography and its application to a pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*, 2006; 20: 1252-1259.
36. Pasha M. K., Muzeeb S., Basha S. J. S., Shashikumar D., Mullangi R., Srinivas N. R. Analysis of five HMG-CoA reductase inhibitors- atorvastatin, lovastatin, pravastatin, rosuvastatin and simvastatin: pharmacological, pharmacokinetic and analytical overview and development of a new method for use in pharmaceutical formulations analysis and in vitro metabolism studies. *Biomedical Chromatography*, 2006; 20: 282-293.
37. Qiu C., Wen Y., Zhang M., Ni X. Determination of concentration of rosuvastatin in human plasma by LC-MS/MS. *Jinri Yaoxue*, 2010; 20: 13-16.
38. Hussain S., Patel H., Tan A. Automated liquid-liquid extraction method for high-throughput analysis of rosuvastatin in human EDTA K(2) plasma by LC-MS/MS. *Bioanalysis*, 2009; 1: 529-535.
39. Kallem R. R., Karthik A., Chakradhar L., Mullangi R., Srinivas N. Development and validation of a highly sensitive and robust LC-MS/MS with

- electrospray ionization method for quantification of rosuvastatin in small volume human plasma samples and its application to a clinical study. *Arzneimittel Forschung*, 2007; 57: 705-711.
40. Tian L., Jiang J., Huang Y., Liu H., Han L., Xu L., Li Y. Determination of rosuvastatin in urine by HPLC-MS/MS assay and its pharmacokinetics in healthy subjects. *Zhongguo Yaoxue Zazhi*, 2007; 42: 1174-1177.
 41. Gao J., Zhong D., Duan X., Chen X. Liquid chromatography/negative ion electrospray tandem mass spectrometry method for the quantification of rosuvastatin in human plasma: Application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2007; 856: 35-40.
 42. Lan K., Jiang X., Li Y., Wang L., Zhou J., Jiang Q., Ye L. Quantitative determination of rosuvastatin in human plasma by ion pair liquid-liquid extraction using liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007; 44: 540-546.
 43. Xu D.H., Ruan Z. R., Zhou Q., Yuan H., Jiang B. Quantitative determination of rosuvastatin in human plasma by liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006; 20: 2369-2375.
 44. Oudhoff K. A., Sangster T., Thomas E., Wilson I. D. Application of microbore HPLC in combination with tandem MS for the quantification of rosuvastatin in human plasma. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2006; 832: 191-196.
 45. Singh S. S., Sharma K., Patel H., Jain M., Shah H., Gupta S., Thakkar P., Patel N., Singh S. P., Lohray B. B. Estimation of rosuvastatin in human plasma by HPLC tandem mass spectroscopic method and its application to bioequivalence study. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2005; 16: 944-950.
 46. Trivedi R. K., Kallem R. R., Mullangi R., Srinivas N. R. Simultaneous determination of Rosuvastatin and Fenofibric acid in human plasma by LC-MS/MS with electrospray ionization: Assay development, validation and application to a clinical study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2005; 39: 661-669.

47. Toyo'oka T. *Modern Derivatization Methods for Separation Sciences*, Chichester, John Wiley and Sons, 1999.
48. Kou H., Noriyuki K., Masahiko H., Kazuyuki Y., Tsutomu O., Toshiaki T., Takeaki N. Determination of biotin (vitamin H) by the high-performance affinity chromatography with a trypsin-treated avidin-bound column. *Journal of Chromatography B*, 2008; 869: 93–100.
49. Nogueiras M. J., Martinez A. G., Paniello A. I., Twohig M., James K. J., Lawrence J. F. Comparison of different fluorimetric HPLC methods for analysis of acidic polyether toxins in marine phytoplankton. *Anal. Bioanal. Chem.* 2003; 377: 1202–1206.
50. Russell A. J., Venkat K. P., David W. S. Prostaglandin Production in Response to a Bacterial Infection in True Armyworm Larvae. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 1999; 41: 225–232.
51. Dickow L. M., Gerken D. F., Sams R. A., Ashcraft S. M. Simultaneous determination of 2,4-D and MCPA in canine plasma and urine by HPLC with fluorescence detection using 9-anthryldiazomethane (ADAM). *Journal of Analytical Toxicology*, 2001; 25: 35-39.
52. Tsutsumiuchi R., Saito H., Imagawa T., Kitamori T., Sawada T. In vivo determination of ultratrace amounts of prostaglandin in plasma by high performance liquid chromatography/laser-induced fluorometry/ultrasensitive laser spectrometry under severe conditions. *Analytical Chemistry*, 1997; 69: 5006-5010.
53. Tagawa K., Hayashi K., Mizobe M., Noda K. Highly sensitive determination of imidapril, a new angiotensin I-converting enzyme inhibitor, and its active metabolite in human plasma and urine using high-performance liquid chromatography with fluorescent labelling reagent. *Journal of Chromatography Biomedical Applications*, 1993; 617: 95-103.
54. Miller S. C., Hwang B., Rhodes G. R., Boppana V. K. Column-switching high-performance liquid chromatographic method for the determination of SKF 106203 in human plasma after fluorescence derivatization with 9-anthryldiazomethane. *Journal of Chromatography*, 1993; 631: 233-240.

55. Shimizu K., Nagase H., Araki H. A highly sensitive assay method of oxalic acid in human plasma using high performance liquid chromatography with fluorescent labeling reagent. *Yakugaku Zasshi*, 1989; 109: 163-167.
56. Haeuptle M. A., Hulsmeier A. J., Hennet T. HPLC and mass spectrometry analysis of dolichol-phosphates at the cell culture scale. *Analytical Biochemistry*, 2010; 396: 133-138.
57. Hayakawa K., Katsumata N., Yoshikawa K., Hirano M., Ogata T., Tanaka T., Nagamine T. Determination of Lipoic (Thioctic) Acid by High-Performance Affinity Chromatography with a Trypsin-Treated Avidin-Bound Column. *Trends in Chromatography*, 2007; 3: 31-42.
58. Kristl J., Veber M., Krajncic B., Oresnik K., Slekovec M. Determination of jasmonic acid in *Lemna minor* (L.) by liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2005; 383: 886-893.
59. Nishimura K., Suzuki T., Momchilova S., Miyashita K., Katsura E., Itabashi Y. Analysis of conjugated linoleic acids as 9-anthrylmethyl esters by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatographic Science*, 2005; 43: 494-499.
60. Terasaki M., Itabashi Y., Suzuki T., Nishimura K. An improved method for determining the composition of FFA in red tide flagellates by RP-HPLC with fluorescence detection. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2002; 79: 1181-1186.
61. Hayek O. M., Henseling J., Loffler M. Separation of N-carbamoyl aspartate and L-dihydroorotate from serum by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Chromatographia*, 2002; 55: 411-415.
62. Shinka T., Mizuno T., Inoue Y., Matsumoto I. High-performance liquid chromatographic determination of urinary acylcarnitine. *Advances in Chemical Diagnosis and Treatment of Metabolic Disorders*, 1992; 1: 133-141.
63. Kargas G., Rudy T., Spennetta T., Takayama K., Querishi N., Shrago E. Separation and quantitation of long-chain free fatty acids in human serum by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography, Biomedical Applications*, 1990; 526: 331-340.
64. USP 26, NF21 Supplement 2, Buffer Solutions

65. Lunn G., *HPLC Methods for Recently Approved Pharmaceuticals*, New Jersey, John Wiley & Sons, 2005.
66. Mehta T., Patel K., Kulkarni G., Suubbaiah G. Determination of Rosuvastatin in Presence of Its Degredation Products by a Stability-Indicating LC Method. *Journal of AOAC International*, 2005; 88: 1142–1147.
67. ICH Q2 (R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. 2005. Erişim; <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Sena	Soyadı	Çağlar
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	10.05.1981
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	11726484586
Email	senacaglar@yahoo.com	Tel	0542 6013160

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı	2011
Yük.Lis.	İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı	2005
Lisans	İ.Ü.Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği	2003
Lise	Nişantaşı Kız Lisesi	1998

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	İ.Ü.Eczacılık Fakültesi	2003-Halen
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	İyi	Çok iyi	82,75	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	78		
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi

SCI Kapsamındaki Dergilerde Yayınlanmış Makaleler

S.Çağlar, A. Önal Two Simple and Rapid Spectrophotometric Methods for the Determination of a New Antihypertensive Drug Olmesartan in Tablets", ***Journal of Analytical Chemistry***, 2010, Vol. 65, No. 3, pp. 239–243.

Z.Aydoğmuş, S.Çağlar S.Toker, RP-HPLC Method for Determination of Oseltamivir Phosphate in Capsules and Spiked Plasma, ***Analytical Letters***, 2010, 43: 1–10.

S. Çağlar, A. Öztunç, A Sensitive Spectrophotometric Method for the Determination of Desloratadine in Tablets, ***Journal of AOAC International***, 2007, Vol.90, No.2.

A.Onal, S.Çağlar, Spectrophotometric Determination of Dopaminergic Drugs Used for Parkinson's disease, Cabergoline and Ropinirole, in Pharmaceuticals Preparations, ***Chemical Pharmaceutical Bulletin***, 2007, 55(44), 629-631.

Atıflar

A.Onal, S.Çağlar, Spectrophotometric Determination of Dopaminergic Drugs Used for Parkinson's disease, Cabergoline and Ropinirole, in Pharmaceuticals Preparations, ***Chem.Pharm.Bull.***, 2007, 55(44), 629-631.

- **El-Dien F, Frag E, Mohamed GG**, Coupling reaction and complex formation for the spectrophotometric determination of physiologically active catecholamines in bulk, pharmaceutical preparations and urine samples of schizophrenic patients, ***Drug Testing and Analysis Analysis***, 2010, 2, 234-242.
- **Onal A.** Spectrophotometric and HPLC determinations of anti-diabetic drugs, rosiglitazone maleate and metformin hydrochloride, in pure form and in pharmaceutical preparations, ***European Journal Of Medicinal Chemistry***, 2009, 44(12), 4998-5005.
- **Mohamed GG, Nour-El-Dien FA, El-Nahas RG**, Spectrophotometric and standard addition methods for quantitative determination of dopamine hydrochloride and levodopa in tablets and ampoules, ***Afinidad***, 2009, 66 (541), 243-251.
- **Jancic-Stojanovic B, Malenovic A, Ivanovic D**, Chemometrical evaluation of ropinirole and its impurity's chromatographic behavior, ***Journal Of Chromatography A***, 2009, 1216(8), 1263-1269.
- **Azeem A, Iqbal Z, Ahmad FJ**, Development and Validation of a Stability-Indicating Method for Determination of Ropinirole in the Bulk Drug and in Pharmaceutical Dosage Forms, ***Acta Chromatographica***, 2008, 20 (1), 95-107. -

- **Rahman N, Haque SM, Azmi SNH**, Kinetic spectrophotometric determination of metoprolol tartrate in commercial dosage forms, *Journal Of The Chinese Chemical Society*, **2007**, 54(6), 1511-1520.

Tebliğler (Uluslararası ve Ulusal Bildiriler)

- **8th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-8)**, 13-16 Haziran 2006, **Ankara**, Türkiye

"Spectrophotometric Method for the Determination of Ropinirole in Tablets"

Armağan Önal, Sena Çağlar

- **International Sciences On Analytical Sciences, ICAS 2006**, 25–30 Haziran 2006, **Moskova**, Rusya.

"A Sensitive Spectrophotometric Method for the Determination of Desloratadine in Tablets"

Sena Çağlar, Aysel Öztunç

- **1st European Chemistry Congress**, 27-31 Ağustos 2006, **Budapeste**, Macaristan

"Spectrophotometric Method for the Determination of Ropinirole in Tablets"

Sena Çağlar, Armağan Önal

- **3th National Symposium and Workshop on HPLC and Mass Spectrometry**, GATA, 20-23 Mayıs 2008, **Ankara**, Türkiye.

"A New HPLC Method for the Simultaneous Determination of Fat-Soluble Vitamins"

Sena Çağlar, Sıdıka Toker

- **Analytica Conference 2008**, 01-03 Nisan 2008, **Münih**, Almanya

"Simultaneous Determination of Desloratadine and Pseudoephedrine Sulphate in Tablets by Derivative Spectrophotometry and High Performance Liquid Chromatography"

Sena Çağlar, Sıdıka Toker, Aysel Öztunç

- **5th Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry**, 23-26 Eylül 2009, **Fatsa**, Türkiye

"Development and Validation of a New LC Method Using Fluorescence Detection for Determination of Oseltamivir Phosphate İn Capsules"

Zeynep Aydoğmuş, Sena Çağlar, Sıdıka Toker

- **IMPPS-3 Third International Meeting on Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 9-12 Haziran 2010, **İstanbul**, Türkiye

"Rapid Quantification of Levetiracetam in Human Plasma and Tablets by Liquid Chromatography"

Armağan Önal, Sena Çağlar

- **5.Ulusal Analitik Kimya Kongresi**, 21-25 Haziran 2010, **Erzurum**, Türkiye
"Linezolidin UV Spektrofotometrik Yöntemlerle Tabletlerde Tayini"
Armağan Önal, Sena Çağlar

Katıldığı Kurslar ve Eğitimler

- Atomik Absorbsiyon Spektrometrisi (2006), İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
- IR ve Raman Spektroskopisi (2006), İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
- ICP (İndüktif Eşleşmiş Plazma)-OES (Optik Emisyon Spektrometri) ve MS (Kütle Spektrometri) (2006), İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
- Çok Boyutlu Kişisel Liderliğin Büyüsü (The Magic of Situational Leadership) (2007), İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
- HPLC ve Kütle Spektrometri Çalıştayı (2008), GATA, Ankara
- Workshop on Antioxidant Measurement Assay Methods (2010), İstanbul Üniversitesi
- İlaç Üretim Yöntemleri (2010), İstanbul
- Sağlık Konferansı (2010), İstanbul