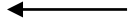


Adınızı soyadınızı giriniz

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**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**LEVAMİZOL HCL VE TRİKLABENDAZOLÜN YÜKSEK
PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİ
İLE YAN YANA ANALİZİ**

ÖZGE BAĞIRGAN

**DANIŞMAN
PROF. DR. SIDIKA ERTÜRK TOKER**

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI**

İSTANBUL-2020

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)



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.

ÖZGE BAĞIRGAN

(İmza)

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

“Yüksek lisans tez çalışmamın yapılmasına olanak sağlayan, çalışmamın her aşamasında bilgisi, tecrübesi ve samimiyeti ile her zaman yol gösteren Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Sıdika TOKER’e”;

“Desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen sevgili aileme ve eşime, analitik şefim Arzu OYMAK’a, Anabilim Dalımız Öğretim Üyelerine ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ederim”.



İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET.....	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Levamizol HCl.....	2
2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	2
2.1.2. Farmakolojisi.....	2
2.1.3. Analiz Yöntemleri	3
2.1.3.1. HPLC Yöntemi ile Analizleri	3
2.1.3.2. Diğer Yöntemler ile Analizleri	5
2.2. Triklabendazol	6
2.2.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	6
2.2.2. Farmakolojisi.....	7
2.2.3. Analiz Yöntemleri	7
2.2.3.1. HPLC Yöntemi ile Analizleri	7
2.2.3.2. Diğer Yöntemler ile Analizleri	10
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	16
3.1. “Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler”	16
3.2. Aletler ve Diğer Gereçler	16
3.3. Levamizol HCl ve Triklabendazolün “Yan Yana Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Analizi”.....	17
3.3.1. Kromatografik Koşulların Belirlenmesi	17

3.3.2.	Kromatografik Koşullar	18
3.3.3.	“Mobil Faz ve Çözücü Hazırlanması”	18
3.3.4.	Validasyonda kullanılacak Çözeltilerin Hazırlanması.....	18
3.4.	HPLC Yönteminin Validasyonu	19
3.4.1.	Seçicilik.....	19
3.4.1.1.	İşlem	19
3.4.2.	Doğrusallık.....	20
3.4.3.	Kantitasyon Tayin sınırı (LOQ) ve Dedeksiyon sınırı (LOD)	22
3.4.4.	Doğruluk	23
3.4.5.	Kesinlik	23
3.4.5.1.	Sistem Kesinliği	23
3.4.5.2.	Tekrarlanabilirlik	24
3.4.5.2.1.	İşlem	24
3.4.6.	Laboratuvar içi Kesinlik	24
3.4.6.1.	İşlem.....	24
3.4.7.	Sağlamlık	24
3.4.7.1.	İşlem.....	24
3.4.8.	Çözelti Stabilesi.....	25
3.4.8.1.	İşlem.....	25
4.	BULGULAR.....	26
4.1.	Levamisol HCl ve Triklabendazolün Yan Yana Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Analiz Sonuçları.....	26
4.1.1.	Kromatografik Koşulların Belirlenmesi	26
4.2.	Yöntem Validasyonu	27
4.2.1.	Seçicilik.....	27
4.2.2.	Doğrusallık	30
4.2.3.	“Tayin sınırı (LOQ) ve Gözlenebilme Sınırı (LOD)”	34
4.2.5.	Kesinlik	36
5.	TARTIŞMA	44
	KAYNAKLAR	47
	ÖZGEÇMİŞ	51

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: “FDA kılavuzunda belirtilen sistem uygunluk parametreleri ”[28].....	13
Tablo 3-1: Doğrusallık Çözeltileri Hazırlığı Tablosu	21
Tablo 4-1: Levamizol HCl için 60–90 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisine ait pik alanı değerleri ve istatistik verileri	32
Tablo 4-2: Triklabendazol için 96–144 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisine ait pik alanı değerleri ve istatistik veriler	32
Tablo 4-3: Levamizol HCl için doğruluk (geri kazanım) sonuçları.....	34
Tablo 4-4: Triklabendazol için doğruluk (geri kazanım) sonuçları	35
Tablo 4-5: Sistem Kesinliği Sonuçları	36
Tablo 4-6: Levamizol HCl ve Triklabendazol oral süspansiyon numunesi için tekrarlanabilirlik sonuçları.....	37
Tablo 4-7: Levamizol HCl miktar tayini Laboratuvar içi kesinlik sonuçları	37
Tablo 4-8: Triklabendazol miktar tayini Laboratuvar içi kesinlik sonuçları.....	38
Tablo 4-9: Mobil fazın akış hızı değişimi sonuçları	39
Tablo 4-10: Kolon sıcaklığı değişimi sonuçları.....	39
Tablo 4-11: Kolon lot numarası değişimi sonuçları.....	40
Tablo 4-12: Mobil faz oranı değişimi sonuçları	40
Tablo 4-13: Levamizol HCl için 5 °C çözelti stabilitesi sonuçları.....	41
Tablo 4-14: Triklabendazol için 5 °C çözelti stabilitesi sonuçları.....	42
Tablo 4-15: 75 mg/mL Levamizol HCl ve 120 mg/mL Triklabendazol içeren oral süspansiyonun geliştirilen yöntemle elde edilen analiz sonuçları	43

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Levamizol HCl'in moleküler şekli.....	2
Şekil 2-2: Tiklabendazolün moleküler şekli	6
Şekil 2-3: A ve B adında iki bileşenin kolonun içerisinde geçiş ve ayrılması.....	12
Şekil 2-4: A ve B moleküllerinin kolon içerisindeki ayrılımının mikroskopik gösterimi	12
Şekil 2-5 :A ve B maddelerinin UV dedektörden gelen sinyallerinin zamana karşı değişimini gösteren kromatogramı.....	12
Şekil 4-1: 75 µg/mL levamizol HCl ve 120 µg/mL triklabendazole ait örnek kromatogram	26
Şekil 4-2: Çözücü enjeksiyonuna ait kromatogram	27
Şekil 4-3: Oral süspansiyon yardımcı maddeleri karışımının (plasebo) enjeksiyonuna ait kromatogram	28
Şekil 4-4: Levamizol HCl standardı enjeksiyonuna ait kromatogram	28
Şekil 4-5: Triklabendazol standardı enjeksiyonuna ait kromatogram.....	28
Şekil 4-6: Standart çözeltisine ait örnek kromatogram	29
Şekil 4-7: Numune çözeltisine ait örnek kromatogram.....	29
Şekil 4-8: Levamizol HCl'e ait pik saflığı spektrumu	30
Şekil 4-9: Triklabendazol'e ait pik saflığı spektrumu	30
Şekil 4-10: Levamizol HCl'in 60–90 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi	31
Şekil 4-11: Triklabendazolün 96–144 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi	31
Şekil 4-12: %80 seviyesindeki 60 µg/mL Levamizol HCl ile 96 µg/mL Triklabendazol standartlarına ait kromatogram	33
Şekil 4-13: %120 seviyesindeki 90 µg/mL Levamizol HCl ile 144 µg/mL Triklabendazol standartlarına ait kromatogram	33

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

k' : Kapasite faktörü

N : Teorik plaka sayısı

RSD: Bağlı standart sapma

SD : Standart sapma

t_R : Alıkonma zamanı

ACN: Asetonitril

Ar-Ge: Araştırma Geliştirme

DMF: (Drug Master File) İlaç Ana Dosyası

EP: (European Pharmacopoeia) Avrupa Farmakopesi

FDA : (Food and Drug Administration) Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

ICH: (International Committee of Harmonization) Uluslararası Harmonizasyon Komitesi

HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

HPTLC: Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi

LC-MS : Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi

LOD : Gözlenebilme sınırı

LOQ : Tayin sınırı

T : Kuyruklanma faktörü

USP: (United States Pharmacopeia) Birleşik Devletler Farmakopesi

UV : Ultraviyole

LC–MS/MS Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrofotometresi

DAD: Diyod Sıralı Dedektör (Çoklu Dalga boylu dedektör)

GC : Gaz Kromatografisi

UV-VIS Spektrofotometri : Ultraviyole ve görünür absorpsiyon spektroskopisi

LVMZ : Levamizol

TRBZL : Triklabendazol

STD: Standart



ÖZET

Özge Bağırhan (2020). Levamizol HCl ve Triklabendazolün Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi İle Yanyana Analizi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Bu çalışmada, Levamizol HCl ve Triklabendazol aktif ilaç bileşenlerini içeren oral süspansiyon formundaki veteriner ilacı için, bu “iki ana etkenin yan yana tayin metodunun geliştirilmesi” amaçlanmıştır. “Yapılan literatür taraması çalışmalarında bu iki ilaç maddesinin yanyana tayini” için Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemi ile analizine rastlanmamıştır. Bu nedenle kombinasyon olarak hayvanlarda tedaviye sunulmuş olan bu iki maddenin preparatlardan “HPLC ile analiz yöntemine ihtiyaç olduğu” düşünülmüştür.

“Geliştirilen HPLC yönteminde mobil faz olarak” pH 8.0 potasyum dihidrojen fosfat - asetonitril 52:48 (h/h) karışımı, kolon olarak ise Phenomenex Gemini C18 (150x4,6 mm 5 µm), kolonu kullanılmıştır. Maddeler UV-Vis dedektör ile 247 nm dalga boyunda izlenmiştir. 1,5 mL/dk akış hızı ile 15 dakikalık bir analiz süresinde bu “iki etken maddenin yanyana miktar tayini gerçekleştirilmiştir.”

Geliştirilen yöntemin validasyonu yapılmış, doğruluk aralığı Levamizol HCl için 60-90 µg/mL ve Triklabendazol için 96-144 µg/mL olarak tayin edilmiştir. Teşhis sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) değerleri sırası ile; Levamizol HCl için 1,6 ng/mL ve 4,7 ng/mL, Triklabendazol için ise 17 ng/mL ve 53 ng/mL’dir. Geri kazanım değerleri Levamizol HCl için %98,6-99,2 aralığında, Triklabendazol için %98,7-99,3 aralığında bulunmuştur. Sistem kesinliği standart enjeksiyonlarının %RSD değerleri Levamizol HCl ve Triklabendazol için sırası ile %0,13 ve %0,16’dır. Bu sonuçlar <%2,0 değerleri ile kabul kriterlerine uygun bulunmuştur. Yöntem ile oral süspansiyon formundaki veteriner ilacının analizleri başarıyla gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Levamizol HCl, Triklabendazol, HPLC, Yanyana Tayin, Validasyon

ABSTRACT

Özge Bağırhan (2020). Simultaneous Determination of Levamisole HCl and Triclabendazole in Oral Suspension by using High-Performance Liquid Chromatographic Methods, Istanbul University, Institute of Health Sciences, Department of Analytical Chemistry. Master Thesis. Istanbul.

In this study, it was aimed to develop simultane determination method for veterinary medicine in the form of oral suspension containing Levamisole HCl and Triclabendazole active drug components. In the literature review studies, it was found that there was no analysis by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method for the simultane determination of these two drug substances. Therefore, it was thought that these two substances, which are offered for treatment in combination, are required to be analyzed by HPLC.

In the developed HPLC method, pH 8.0 potassium dihydrogen phosphate - acetonitrile 52:48 (v / v) mixture was used as the mobile phase, and Phenomenex Gemini C18 (150x4.6 mm 5 μ m) column was used as the column. The substances were monitored with a UV-Vis detector at a wavelength of 247 nm. The two active ingredients were determined simultaneously in a 15-minute analysis period with a flow rate of 1.5 mL / min.

The developed method was validated and the linearity range was determined as 60-90 μ g / mL for Levamisole HCl and 96-144 μ g / mL for Triclabendazole. Detection (LOD) and quantitation limits (LOQ) are 1,6 ng / mL and 4,7 ng / mL for Levamisole HCl, and 17 ng / mL and 53 ng / mL for Triclabendazole, respectively. Recovery values were in the range of 98.6-99.2% for Levamisole HCl and 98.7-99.3% for Triclabendazole. RSD values of system precision standard injections are 0.13% and 0.16% for Levamisole HCl and Triclabendazole, respectively. These results were found to meet the acceptance criteria with values of <2.0%. The veterinary medicine in the form of oral suspension were successfully analysed by the developed method.

Key Words: Levamisole HCl, Triclabendazole, HPLC, Simultaneous Determination, Validation

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Levamisol, imidazotiyazol grubu, Triklabendazol ise benzimidazol grubu antihelmintik ilaçlardandır. “Bu iki aktif maddenin kombine kullanımı”, koyun ve sığırlardaki akciğer, mide ve bağırsaktaki nematod türlerine, karaciğer kelebeklerine, *Fasciola Hepatica*’ya, *Fasciola gigantica*’ya, mide bağırsak ve akciğer kıl kurtlarına karşı başarılı bir tedaviyi mümkün kılmaktadır [1].

Levamisol, akciğer, mide ve bağırsaklarda oluşan nematodlara karşı inhibe edici bir antihelmintiktir. Pirantelinkine benzer bir etki gösterip, helmintlerin kaslarının ve gangliyonlarının sürekli uyarılması sonucu felç oluşturur. Bu sayede parazitlerdeki fumarat redüktaz enzimlerinin işlevini engeller [2]. Levamisol, parazitin karbonhidrat metabolizmasını da bozar. Levamisola karşı direnç oluşumu, asetikolin reseptörlerinin genel özelliklerinin değişimi sonucunda olur. Vücuttan atılımı çoğunlukla dışkı ve idrar ile olur [3].

Triklabendazol, benzimidazol grubundan halojenli *fasciolasit*lerden biridir. Karaciğer trematodlarında genç ve ergin dönemlerinde etki gösterir. Tubulin yapısına bağlandıktan sonra, trematodların hücre içerisindeki taşıma sistemini bozar ve enerji metabolizmasını birçok yönden inhibe eder. Bunun yanında protein sentezi inhibasyonunu da sağlar. Oral yolla alınımı sonrası, hızla 2-4 saat içerisinde kanda emilir ve kısa sürede antiparazit etkinliğini gösterir. Büyük çoğunluğu, vücuttan idrar ve dışkı ile atılır [3].

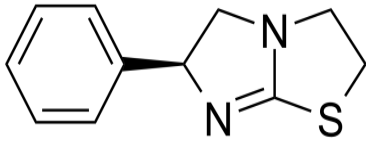
Levamisol HCl ve Triklabendazolün yukarıda bahsedilen helmintlere karşı yanyana kullanımı ile daha etkili sonuçlar alınmakta ve bu amaçla geliştirilmiş süspansiyon şeklinde preparatları bulunmaktadır. Bu “iki etkin maddenin farmasötik preparatlardaki analizleri incelendiğinde yanyana tayinleri için” sadece bir spektrofotometrik yöntemle rastalanmış [4] fakat “Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemi ile analizlerine” rastlanmamıştır.

“Bu özgün yüksek lisans tezi kapsamında” Levamisol HCl ve Triklabendazolün yanyana oral süspansiyonlardaki “analizi için yeni bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir”. Geliştirilen yöntemin validasyonu yapılmış ve veteriner ilaç maddelerinin oral süspansiyon numunelerindeki analizlerine uygulanabilirliği test edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Levamizol HCl

2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



H-Cl

Şekil 2-1: Levamizol HCl'in moleküler şekli

Levamizol HCl tetrahydroimidazo[2,1b][1,3]thiazole; hydrochloride olarak adlandırılır ve kapalı formülü ise $C_{11}H_{13}ClN_2S$ ' dir. Molekül ağırlığı 240.75 g/mol'dür. CAS numarası 16595-80-5 olan Levamizol HCl beyaz veya beyazımsı renkte kristalize bir tozudur. Suda serbestçe çözünür, alkolde (%96) çözünür , metilen klorürde az çözünür [5].

2.1.2. Farmakolojisi

Parazitik solucanların enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan, antihelmintik ilaç sınıfına ait olan Levamizol ilk olarak insanlar ve hayvanlardaki solucan enfestasyonlarının tedavisinde kullanılmıştır. Levamizol, parazitik solucan kaslarının sürekli uyarılıp, felç olmasına neden olan, nikotinik bir asetilkolin reseptör agonisti olarak işlev görür. Levamizol 1966'da keşfedilmiş ve Dünya Sağlık Örgütü'nün bir sağlık sisteminde ihtiyaç duyulan en güvenli ve en etkili ilaçlar olan 'temel ilaçlar' listesinde yer almıştır. Amerika Birleşik Devletlerinde Ticari olarak mevcut değildir. Levamizol kullanımına izin verilen ülkelerde, tedavi için tek bir doz önerilir ve ciddi bir kancalı kurt enfeksiyonu tedavisinde gerekirse 7 gün sonra doz tekrar edilir. Günümüzde sığırlarda, domuzlarda ve koyunlarda anthelmintik tedavilerinde kullanılmak üzere veterinerlikte birçok ticari preparatı vardır. Buna ilave olarak, son zamanlarda tatlı su tropik balıklarındaki *Camallanus* yuvarlak solucan istilasına etkili bir tedavi yöntemi olduğu da görülmüştür [6].

Bir antiparazit ajanı olarak etki mekanizması, nematod kaslarındaki L-alt tip nikotinik asetilkolin reseptörlerine karşı agnozitif etkinliğine bağlı görünmektedir. Bu agnostik eylem, erkeklerdeki üreme kaslarını kontrol etme yeteneklerini azaltır ve eşleşebilme potansiyellerini kısıtlar. Levamizol'ün bağışıklık sistemi üzerine olan etkileri ise karmaşıktır. İlaç, normal-üstü seviyelerdeki tedavilerde tepki uyandırmak yerine, çökmüş durumda olan bağışıklık sistemini onardığı görülmüştür. Levamizol, birçok çeşitli antijenlere karşı antikor oluşumunu sağlayabilir, T hücresi aktivasyonunu ve hücre proliferasyonunu (çoğalmasını) uyararak T-hücresi yanıtlarını yükseltebilir, fagositoz ve kemotaksiyi içeren monosit ve makrofaj fonksiyonlarında güçlendirme sağlar ve nötrofil hareketliliğini, kemotaksiyi ve aderansı artırabilir [7].

Levamizol, GI (Gastrointestinal sistem) kanalından hızla emilerek çoğunlukla karaciğerde metabolize edilir ve böbrekler tarafından atılır (3 gün boyunca %70'in üzerinde). Plazma eliminasyon yarılanma ömrü 3-4 saattir. Kısa süren eliminasyon yarılanma ömrü sebebiyle, levamizolün kan seviyeleri daha hızlı düşer ve toksikolojik muayenede farkedilmez. Yapılan bazı klinik çalışma verilerine göre, 50-200 mg/gün Levamizol tüketimi kişilerin %0,08- %5,0'inde agranülositoza sebep olabilmektedir. (WHO,FAS 33) Agranülositoz, azalan nötrofil sayısından kaynaklanan ve enfeksiyonlarla mücadelede olumsuz etkileri olan akut bir kan durumudur. Bu durum Levamizol ile kokaini karıştırıp suistimal eden hastalar (CAL)'da görülmüş ve hastalık geçmişlerinde raporlandırılmıştır. Tavsiye edilenden daha yüksek dozda Levamizol kullanımı ile otoantikor aracılı agranülositoz oranında artış görülür. Agranülositoz semptomları boğaz ağrısı, kalıcı veya tekrarlayan ateş, şişmiş lenf bezleri ve cilt enfeksiyonlarıdır. Levamizol genellikle alkol ve varfarin ile etkileşime girer. Disülfiram (antabuse) gibi alkol tüketiminin önüne geçer [8].

2.1.3. Analiz Yöntemleri

2.1.3.1. HPLC Yöntemi ile Analizleri

Koyun plazmasındaki Levamizol ve Abamektin'i tayin etmek için HPLC analiz yöntemi geliştirilmiştir. Levamizol UV dedektör ile 225 nm'de, Abamektin ise floresans dedektör ile 365 nm'de uyarma, 470 nm'de emisyon dalga boylarında çalışılmıştır. Prodigy ODS C18 kolon ile Levamizol için 0.01 M pH 7.5 fosfat tamponu (NaH_2PO_4 ve Na_2HPO_4):Asetonitril (60:40,h/h), Abamektin için Metanol:Asetonitril:Su (95:3:2,

h/h/h) mobil faz sistemleri ile ayırım sağlanmıştır. Abamektinin alıkonma zamanı 4,9 dk, Levamizol Fosfatın alıkonma zamanı 5,7 dk, iç standart olarak kullanılan İvermektinin alıkonma zamanı ise 7,4 dakikada gözlenmiştir. Çalışma aralığı Levamizol Fosfat için 0,05-10 µg/mL, Abamektin için 9,25-20 ng/mL'dir. Kalibrasyon eğrisi her ikisi içinde lineer ve korelasyon katsayıları 0,999'dan büyüktür. LOQ konsantrasyonu ve bu konsantrasyondaki RSD değerleri Levamizol ve Abamektin için sırasıyla 0,05 µg/mL, %18,2 RSD ve 0,25 ng/mL %19,6 RSD dir. Dondurulmuş ve çözölmüş plazma örneklerinden yapılan geri kazanım sonucu 0,1 µg/mL konsantrasyondaki Levamizol için %86,3, 2 ng/mL konsantrasyondaki Abamektin için %105,8'dir. Her iki yöntem de koyunlara uygulanan subkutan ilaç enjeksiyonundan sonra alınan plazma örneklerine başarı ile uygulanmıştır [9].

Levamizol ve Albendazolün "kombinasyon halindeki ilaç formunda eş zamanlı tayini" için "ters fazlı bir HPLC yöntemi valide edilmiştir". Analiz, İnertsil ODS C18 (150mm x 4.6 mm,5µm) kolon ile pH 3.5 fosfat tamponu:Asetonitril (70:30, h/h) mobil fazında, akış hızı 1,0 ml'dk , kolon sıcaklığı oda sıcaklığı 20-25 °C'de, 224 nm dalga boyunda, 20 µl enjeksiyon hacmi verilerek, 10 dakika analiz süresi ile tayin edilmiştir. "İki etken için iyi bir ayırım sağlanmış" ve retensiyon zamanı Levamizol ve Albendazol için sırasıyla 2,35 dk ve 4,06 dakika olarak elde edilmiştir. Metodun doğrusal olduğu konsantrasyonlar Levamizol ve Albendazol için sırasıyla 15-45 µg/mL ve 40-120 µg/mL konsantrasyon aralığında bulunmuştur. LOD ve LOQ değerleri Levamizol için 2,08 µg/mL ve 6,03 µg/mL, Albendazol için 3,40 µg/mL ve 10,40 µg/mL'dir. Ortalama geri kazanım, %100 konsantrasyondaki numune çözeltisine %75, %100 ve %125'lik standart çözeltileri ilave edilerek çalışılmış ve Levamizol ve Albendazol için sırası ile geri kazanım %99,66 ve %98,73 bulunmuştur [10].

Bulk ve tablet formunda bulunan Levamizolün tayini için "ters fazlı HPLC yöntemi geliştirilmiştir". Welchrom C18 (250mm x 4.6 mm,5µm) kolon ile ortam sıcaklığında Metanol:Asetonitril:Su (50:30:20, h/h/h) karışımı 0,1 N fosforik asit ile pH 4,6'ya ayarlanmıştır, kolonun etkinliğini artırmak için üzerine 0,5 mL Trietilamin ilave edilen mobil faz ile, akış hızı 1.0 mL/dk olacak şekilde, 225 nm UV dalga boyunda çalışma yapılmıştır. "ICH (Q2R1) yönergesine göre validasyon parametreleri" değerlendirilmiştir. Doğrusallık çalışmasında 2-10 µg/mL konsantrasyon aralığında, korelasyon katsayısı 0,9999 , regresyon katsayısı 0,9998 elde edilmiştir. LOD değeri 0,1219 µg/mL, LOQ değeri ise 0,3695 µg/mL'dir. İstatiksel analizler bu yöntemin

doğru, güvenilir, basit ve tekrarlanabilir olduğunu göstermiştir. Ara kesinlik ve bağıl standart sapmaları %2 yi aşmamıştır. Yöntemin doğruluğu kanıtlanmış ve geri kazanımı %99,36-%100,56 arasında bulunmuştur. Etkenin alıkonma zamanı 2,79 dakikadır ve ortalama içerik analizi sonucu $102,135 \pm \% 0,933$ dur. Önerilen yöntem bulk ve dozaj formundaki Levamizolün kantitatif tayini için doğru ve kesin olarak uygulanabilir [11].

Veteriner toz formunda bulunan ürün içindeki susuz Niklozomit ve Levamizol “etkenlerinin eş zamanlı tayini için” basit, hızlı ve valide edilmiş bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Analizde Asetonitril:pH 3.0 tampon çözeltisi (2:8, h/h) kullanılmıştır. pH 3.0 tampon çözeltisi iki eşit hacimde pH 3.0 karışımından oluşmuştur. Birinci karışım 0,005 M Sodyum Hekzansülfonik asit ile 8 mL Glasial asetik asit karışımının fosforik asit ile pH 3.0’e ayarlanması ile, ikinci karışım ise 0,01 M Dibütüilaminin fosforik asit ile pH 3.0’e ayarlanması ile oluşmuştur. Phenomenex Luna C18 (250 mm, x 4.6 mm, 5 µm) kolonu ile 0.8 mL/dk akış hızında 240 nm dalga boyunda analiz yapılmış ve metodun seçici, kesin, doğru ve rutin analizlerde ilaç endüstrisinde kalite kontrol analizlerinde kullanılabilirliği ispatlanmıştır [12].

Başka bir çalışmada saf ve tablet formunda bulunan Levamizolün tayini için “HPLC metodu geliştirilmiş ve valide edilmiştir”. Asetonitril:su (80:20, h/h) mobil fazı ile 0,7 mL/dk akış hızında YMC C18 (250mm x 4.6 mm, 5µm) kolonu ile 217 nm dalga boyunda çalışılmış ve “metodun ICH yönergelerine göre doğru, basit,tekrarlanabilir olduğu” ispat edilmiştir. Levamizolün geri kazanımı % 98,8 -101,1 aralığındadır. Doğrusallık 10-50 µg/mL konsantrasyon aralığında, korelasyon katsayısı 0,9999, regresyon katsayısı 0,999 ‘dur. LOD değeri 0,204 µg/mL, LOQ değeri ise 0,673 µg/mL’dir. Bu yöntemin Levamizolün “kantitatif tayini için başarı ile uygulanabilir olduğu” istatistiksel verilerle kanıtlanmıştır [13].

2.1.3.2. Diğer Yöntemler ile Analizleri

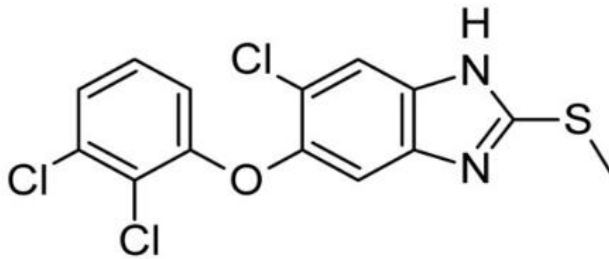
Levamizol Hidroklorürün tanınması ve tayini için moleküler olarak baskılı bir polimere dayanan potansiyometrik bir sensör üretilmiştir. Sunulan bu sensörün özellikleri; 2,5 µmol L⁻¹ to 100 mmol L⁻¹ Levamizol Hidroklorür aktivite çalışma aralığı ve yaklaşık 57.0 mV / on Nernstian yanıtı ve 1.0 µmol L⁻¹ tespit sınırında ölçülmesi suretiyle değerlendirilmiştir. Sensörün cevap verme süresi oldukça

kısadır.(<15 s) ve bu membran 4 ay boyunca yanıtta bir sapma yapmadan kullanılabilir. Önerilen bu sensörün Levamizole karşı oldukça hassas ve seçici olduğu görülmüştür fakat benzer yapıda olan (2-metiltio) benzotiazol veya (2-amino) benzotiazole karşı duyarlı değildir. Sensörün analizlerde uygulanabilirliği, saf ilaç ve tablet formundaki farmasötik preparatlarda Levamizol Hidroklorürün potansiyometrik titrasyonu ile test edilmiş ve yöntem başarı ile uygulanabilmiştir [14].

İnsan plazmasındaki Levamizolün tayini için LC-MS/MS ile hassas ve hızlı bir metot geliştirilmiştir. İnsan plazmasındaki analitlerin etil eter ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile alınmasını takiben Asetonitril:10 mM Amonyum Asetat (70:30, h/h) mobil fazı ile Agilent HC-C₈ (150 mm x 4.6 mm, 5µm) kolonda ayrılma sağlanmıştır. Kolon sıcaklığı 40 °C, akış hızı 0,5 mL/dk, toplam analiz süresi ise 6 dakikadır. Dedeksiyon ve miktar ölçümü kütle spektroskopisinde pozitif elektrosprey iyonizasyonu ile çoklu reaksiyon izleme modunda Levamizol için m/z 205.1 → 178.2'de, iç standart olan mebendazol için m/z 296.1 → 264.1 değerlerinde gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem, 0,1-30 ng/mL'lik bir konsantrasyon aralığında doğrusaldır ve LOQ değeri 0,1 ng/mL'dir. Varyasyon katsayısı %8,5'un altındadır. Bu analiz, Levamizolün merhem olarak uygulandığı farmakokinetik bir çalışmada, insan plazmasından alınan numune üzerinde başarı ile uygulanmıştır [15].

2.2. Triklabendazol

2.2.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



Şekil 2-2: Tiklabendazolün moleküler şekli

Triklabendazol,6-chloro-5-(2,3-dichlorophenoxy)-2-(methylsulfanyl)-1H-1,3-benzodiazole olarak adlandırılır ve kapalı formülü ise C₁₄H₉Cl₃N₂OS'dir.Molekül

ağırlığı 359,65 g/mol'dür. CAS numarası 68786-66-3 olan Triklabendazol beyaz veya açık bej renkte toz formdadır [16].

2.2.2. Farmakolojisi

Triklabendazol, hayvanlar, atlar ve evcil hayvanlarda görülen her türlü parazit solucanını kontrol etmek için geniş çapta kullanılan antihelminetik aktiviteye sahip bir benzimidazoldür. Benzimidazoller ortak bir molekül yapısına sahip olmakla beraber istisnai olarak Triklabendazol bu sınıfın klorlu benzen halkasına sahip olan ve karbamat grubu içermeyen bir üyesidir. Tüm benzimidazollerin moleküler hareket tarzı, mikrotübüllerin yapısal proteini olan tübüline bağlanarak gerçekleşir. Triklabendazol de bu şekilde hareket eder [17].

Trematod paraziti olan *Fasciola hepatica* halen tüm dünyada hayvancılıkta kayda değer bir kayba neden olmaktadır. Mevcut farmakolojik aktiviteler incelendiğinde, flukisidal ilaçların bu paraziti kontrol etmek için kullanımı önemlidir. Triklabendazol de, güçlü flukisidal aktiviteye sahip olan benzimidazol sınıfı halojenli bir antelmintiktir [18]. Triklabendazol ve metabolitleri, *Fasciola hepatica* ve *Fasciola gigantica* helmintlerinin hem olgunlaşmamış hem de olgun solucanlarına karşı aktiftir [16].

Triklabendazol 1983'den beri veterinerlikte *fascioliasis* tedavisinde kullanılmaktadır. Triklabendazolün yan etkileri genelde az olmakla birlikte karın ağrısı ve baş ağrısı yapabilir. Triklabendazol 2019'da tıbbi kullanım için onaylanmıştır. World Health Organization (WHO)'nun temel ilaçlar listesinde en etkili ve güvenilir ilaçlar listesinde yer almaktadır.

2.2.3. Analiz Yöntemleri

2.2.3.1. HPLC Yöntemi ile Analizleri

Karaciğer parazitlerinde Triklabendazol ve metabolitlerinin “tayini için ters fazlı bir yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi” geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Bu yöntem ile Triklabendazol ve sülf hidroksi metabolitlerinin kantitatif olarak tayini yapılmıştır. Bu yöntemde triklabendazol, triklabendazol sülfoksit, triklabendazol sülfon, hidroksi-triklabendazol, hidroksi-triklabendazol sülfoksit ve hidroksi-triklabendazol sülfon aynı anda ölçülmüştür. “Yöntemin doğrusalılığı, seçiciliği, kesinliği, doğruluğu, geri kazanımı, tayin ve gözlenebilme sınırları belirlenmiştir”. Parazitin doku homojenatından ilacın ekstraksiyonu, sıvı-sıvı ekstraksiyonu (asetonitril) kullanılarak

etkili bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde yukarıda bahsedilen tüm benzimidazol moleküllerinin ayrılması Phenomenex C18 (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) özelliklerindeki kolonda asetonitril ve amonyum asetat karışımlı bir mobil faz ile 300 nm dalga boyunda gradient yöntem ile çalışılarak sağlanmıştır. Doğrusallık analizleri 0,272 -16,331 nmol/100 mg trematod proteini aralığında çalışılmış ve lineer olduğu görülmüştür. Kalibrasyon eğrisindeki korelasyon katsayısı 0,996 ile 1,000 arasındadır. Ana ilaç ve metabolitleri için “bu yöntemin saptanan tayin sınırı” sırası ile 0,007 nmol/100 mg ve 0,079 nmol/100 mg trematod poretinidir. Analitler için ekstraksiyon verimliliği %71’den fazladır. Elde edilen bu sonuçlar bu yöntemin doğruluğunun ve seçiciliğinin yüksek olduğunu ve başarı ile Triklabendazol ve metabolitlerinin “kantitatif analizi için kullanılabileceğini göstermiştir” [18].

Başka bir çalışmada sığır sütündeki Triklabendazol ve sülfoksit ve sülfon metabolitlerinin eş zamanlı tayini için ters fazlı HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Süt numunesi, susuz sodyum sülfat ve asetonitril ile homojenize edilip, ardından santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra üst tabaka ayrılıp asetonitril ile doyurulmuş hekzan ile durulanmış ve buharlaştırılmıştır. Kalan kalıntı 0.1 M potasyum dihidrojen fosfat ve 0.1 M sodyum hidrojen karbonat karışımı ile çözülerek bir Bond Elut C18 kartuş ile temizlenmiştir. Bu üç bileşik Capcell Pak C18 UG 120 (150 x 4.6 mm, 5 µm) kolon ile asetonitril: 0.05 M amonyum asetat (50:50, h/h) mobil fazında, akış hızı 0,8 ml/dk, kolon sıcaklığı 40 °C olarak 295 nm dalga boyunda analiz edilmiştir. Bu yöntemin geri kazanımı (n=4) %89,1-95,0 aralığında, RSD değerleri ise %1,1-2,6 aralığında bulunmuştur. Dedeksiyon limiti sütte triklabendazol için 0,006 µg/g, triklabendazol sülfoksit için 0,005 µg/g, triklabendazol sülfon için 0,004 µg/g’dır. Bu yöntem hem pazardaki çiğ süt örneklerini analiz etmek için hem de karaciğer parazitlerinin tedavisi için Triklabendazol kullanılan 10 inekten alınan süt numuneleri üzerinde kullanılmıştır [19].

Bir diğer çalışmada Triklabendazol ve Fenbendazol ile “eş zamanlı tayini için bir ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirilmiş” ve yöntem koyun ve sığırlara oral doz ilaç uygulandıktan sonra kandaki Triklabendazol, Fenbendazol ve bunların sülfoksit ve sülfon metabolitlerinin eş zamanlı takibi yapılmış

ve bu çalışma farmakokinetik çalışmalarda kullanılmıştır. Bu yöntemde ekstraksiyon ve temizleme prosedürü C18 Sep Pak kartuş ile sağlanmıştır. Triklabendazol, Fenbendazol ve ilgili oksidasyon ürünlerinin koyun ve sığır plazmasından analizini kolaylıkla sağlayan yöntemde C18-microBondapak (300mmx 3.9 mm,10 µm) kolon ile, Asetonitril:0.04 M Diamonyumhidrojen ortofosfat (41:59) (h/h) karışımının %20 fosforik asit ile pH değeri 7.5-7.6'ya ayarlanmıştır. 300 nm dalga boyunda, 1.5 mL/dk akış hızı ile analizi yapılmıştır.Yapılan çalışmalar sonunda Fenbendazol için LOD değeri 10 ng/mL, Triklabendazol için LOD değeri 100 ng/mL olarak tespit edilmiştir [20].

Birbirine bağlı iki şırıngadan oluşan bir sistemde, şırıngalardan birinde sıvı faz mikroekstraksiyon sistemi, diğerinde katı organik damla mikroekstraksiyonu bulunan floresans dedektörlü bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntem ile farklı matrislerden eser miktardaki Albendazol ve Triklabendazolün eş zamanlı tayini yapılmıştır. Kullanılan uyarma dalga boyu 290 nm, emisyon dalga boyu 330 nm dir. Kromatografik ayırım Nucleosil-C18 (250 mmx 4.6 mm,5 µm) kolonda Metanol:Su (80:20,h/h) karışımında sağlanmıştır. Albendazol ve Triklabendazol için tayin katsayıları sırası ile 0,9999 ve 0,9998, doğrusalılık aralıkları 0,1-30,0 µg/L ve 0,2-30,0 µg/L konsantrasyon aralığında bulunmuştur. Her iki analit için üç farklı konsantrasyonda günler arası ara kesinlik yapılmış ve sonuçlar Albendazol için % 6,3-10,1, Triklabendazol için %5,0-7,5 aralığında bulunmuştur. Bu metot su, bal, idrar ve inek sütündeki albendazol ve triklabendazolün belirlenmesi için başarıyla uygulanmıştır [21].

Triklabendazol ve İvermektinin 50:1 dozaj oranında bulunduğu farmasötik süspansiyonlar için de bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde Asetonitril-Metanol-su mobil fazı (60:30:10) ve Vydac C-18, (250 X 4.6 mm, 5 µ) kolon ile 1,5 mL/dk akış hızında, 254 nm dalga boyunda çalışılmıştır. Analiz süresi 15 dakikadır. Korelasyon katsayısı $r=0,998$ olan Triklabendazol için kalibrasyon eğrileri 0,06-0,14 mg/mL konsantrasyon aralığında, korelasyon katsayısı $r=0,999$ olan ivermektin için ise kalibrasyon eğrileri 0,03-0,05 mg/mL konsantrasyon aralığında lineer bulunmuştur. “Her iki etken madde için geri kazanım” %98,0-%102,0 aralığındadır [22].

Başka bir yöntemde de bir veteriner ilaç içerisindeki Triklabendazol, ilgili bileşikleri, Metil Paraben ve Propil Paraben koruyucularının aynı anda “miktar tayini

için bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir”. Yöntemde maddeler 30 mM Amonyum Asetat:Asetonitril (40:60, h/h) mobil fazında, 250 x 4.6 mm, 5 µm silika jel kolonu ile 1.0 ml/dk akış hızında ayrılmışlardır. Triklabendazol ve safsızlıklarının miktar tayini Agilent 1200 cihazındaki DAD dedektör ile 305 nm’de, metil paraben ve propil parabenin miktar tayini ise 254 nm de gerçekleştirilmiş ve analiz 25 dakikada tamamlanmıştır. LOQ ve LOD değerleri sırasıyla Triklabendazol için 0,2900 ppm ve 0,087 ppm, Metilparaben için 0,2138 ppm ve 0,0641 ppm, Propilparaben için 0,0386 ppm ve 0,0116 ppm olarak bulunmuştur [23].

2.2.3.2. Diğer Yöntemler ile Analizleri

Triklabendazolün bulk ve ilaç analizlerindeki tayini için UV spektrofotometrik metot geliştirilmiştir. Bu yöntemde standart ve numune çözeltileri 0,1 M Metanolik Hidroklorür çözeltisinde çözülüş ve Shimadzu UV-1800 cihazında 10 mm kuartz hücrelerde 305 nm’de okutulmuştur. Yöntem 1–10 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusaldır ve LOD seviyesi 0,068434, LOQ seviyesi ise $2,73 \times 10^{-4}$ µg/mL’dir. Yöntemin uygulanabilirliği ticari tabletler ile test edilmiş ve bu yöntemin seçici, tekrarlanabilir, stabil ve doğru sonuçlar ile ilacın rutin analizinde kullanılabileceği ispatlanmıştır [24].

Triklabendazolün saf toz halindeki veya %10’luk oral süspansiyon formundaki analizleri için asit boya kompleksi oluşumuna dayanan spektrofotometrik bir metot geliştirilmiştir. Shimadzu UV-2400 PC Series Spektrofotometresi ile 1 cm kuartz hücrelerde analiz yapılmıştır. Bu yöntem protonlanmış ilacın bromoskol moru (BCP) ve bromofenol mavisi (BPB) belirteçleri ile oluşturduğu iyon çifti kompleksinin kloroform ile ekstre edildikten sonra 300 nm-600 nm arasında ölçülmesi ile gerçekleştirilmiştir. Oluşan komplekslerin maksimum absorbans değerleri 420 nm’de ölçülmüştür. Doğrusallık aralıkları BCP için 20-100 µg/mL ve BPB için 10-100 µg/mL konsantrasyon aralığında bulunmuştur. Ortalama geri kazanım BCP için %99,61 $\pm$ 1,152, BPB için %99,60 $\pm$ 0,986 ‘dır. Bu yöntem ile imalatçının yöntemi kıyaslanmış ve anlamlı bir fark görülmemiştir [25].

Başka bir çalışmada Triklabendazol ve ivermektinin “yan yana tayini için iki farklı yöntem” geliştirilmiştir. Birinci yöntem iki etken için C18 kolonda Asetonitril-Metanol-

0,005 M KH_2PO_4 (60:30:10,h/h/h) pH 6.0 mobil fazı ile “etkili bir ayrılma sağlanan izokritik bir HPLC yöntemidir”. Bu yöntemde Triklabendazol için doğrusallık aralığı 2,5-50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ortalama geri kazanım % 100,11 $\pm$ 0,99, ivermektin için doğrusallık aralığı 1-20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ortalama geri kazanım % 100,08 $\pm$ 0,53 olarak elde edilmiştir. İkinci yöntem ise kloroform:aseton (8:2,h/h) mobil fazı ile ince tabaka kromatografisi çalışmasının ardından plakların çift dalga boylu dansitometrede değerlendirilmesi ile uygulanmıştır. Bu yöntemde plaklar 306 ve 254 nm UV lamba altında incelenmiş ve Triklabendazol için R_f 0.79, İvermektin için R_f 0.33 olarak gözlemlenmiştir. Doğrusallık aralıkları Triklabendazol için 306 nm’de 2,5-25,0 $\mu\text{g/spot}$ olarak % 100,38 $\pm$ 0,52 ortalama geri kazanım ile İvermektin için 245 nm’de 0,5-5,0 $\mu\text{g/spot}$ olarak %100,05 $\pm$ 0,41 “ortalama geri kazanım ile elde edilmiştir”. Her iki yöntem de farmasötik formülasyonlarda “iki etkenin aynı anda rutin analizleri için” hız, yüksek hassasiyet ve seçicilik yönlerinden avantajlı görülmüştür [26].

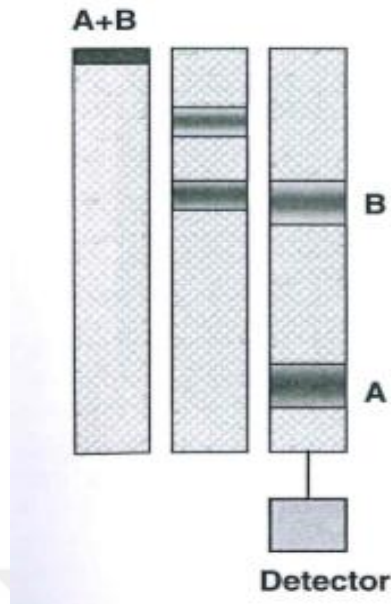
2.3. Sıvı Kromatografisi Sistemleri

Günümüzde pek çok laboratuvarında, farklı model ve markalarda Sıvı kromatografisi sistemleri bulunmaktadır. Bu bölümde “yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile ilgili genel bilgiler” anlatılacaktır.

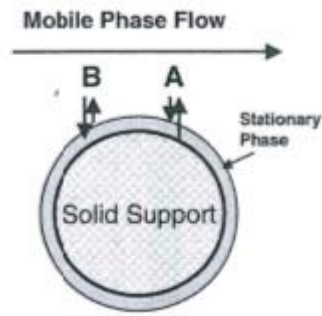
2.3.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Sıvı kromatografisi (LC) hareketli fazın sıvı olduğu iki fazlı bir ayırma tekniğidir. Burada karışımlar hareketli faz ile sabit faz arasında bu fazlarla olan etkileşimleri sayesinde bileşenlerine ayrılırlar. HPLC hareketli fazın kolon içerisinde yüksek basınç ile pompalandığı enstrümental bir sıvı kromatografisi (LC) formudur [27].

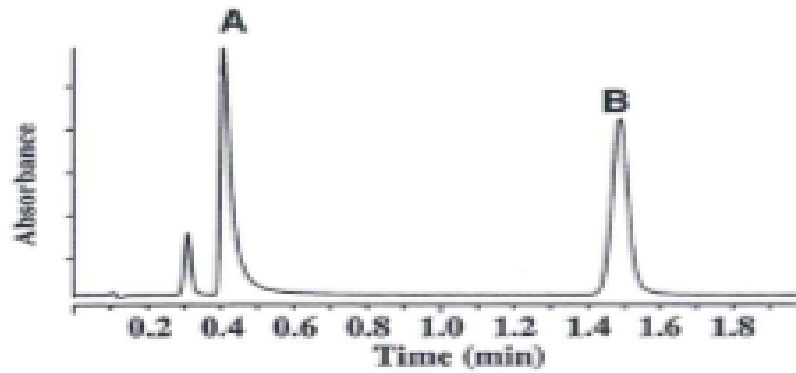
Şekil 2-3, A ve B analitlerinin bir karışımının sabit faz içerisine (kolon) aşağı doğru göç ettikçe iki ayrı banda ayrıldığını gösteren kromatografik işlemin bir şemasıdır. Şekil 2-4’de ise mobil faz ile analitlerin kolon içerisinde ayrılma süreçleri görülmektedir. B analitinin sabit faza olan afinitesi A molekülünden daha güçlü olduğu için kolondan daha geç ayrıldığı görülmektedir. Bu sisteme bağlı bir dedektör yardımıyla çıkıştaki her bir ayrı bileşen bandının konsantrasyonunu izlenir ve Şekil 2-5 ‘te gösterilen kromatogram adı verilen bir çizim elde edilir [27].



Şekil 2-3: A ve B adında iki bileşenin kolonun içerisinde geçiş ve ayrılması



Şekil 2-4: A ve B moleküllerinin kolon içerisindeki ayrılışının mikroskobik gösterimi



Şekil 2-5 :A ve B maddelerinin UV dedektörden gelen sinyallerinin zamana karşı değişimini gösteren kromatogramı

Günümüzde HPLC, gelişmiş otomatik örnekleyici ve veri sistemleri ile son derece hızlı ve etkili bir şekilde çok bileşenli karışımların analizlerini yüksek hassasiyetle yapabilen birinci sınıf bir ayırma tekniğidir. HPLC yöntemlerinde çok sayıda hassas ve spesifik dedektörler ile nanogram, pikogram ve femtogram seviyelerinde çalışılabilir. En önemlisi, moleküllerin yaklaşık %15'ine cevap verebilen GC (Gaz kromatografisi) ile karşılaştırılığında moleküllerin %60-%80 'ine cevap verebilme yeteneğine sahip olmasıdır.

2.4. Sistem Uygunluk Testi

“Amerikan farmakopesi (USP)’ye göre geliştirilen bir sıvı kromatografi yönteminde” kesinlikle “sağlaması gereken parametrelere sistem uygunluk parametreleri” denir. Sistem uygunluk parametresi limitleri Tablo 2-1’de FDA kılavuzunda belirtildiği gibi verilmiştir [28].

Tablo 2-1: “FDA kılavuzunda belirtilen sistem uygunluk parametreleri ”[28]

Parametre	Limit
Kapasite Faktörü	$K' > 2$
Enjeksiyon Tekrarlanabilirliği (Kesinlik)	$RSD < \%1, n \geq 5$
Ayrım Faktörü	$R_s > 2$
Kuyruklanma Faktörü	$T \leq 2$
Pik Etkinliği (Teorik Plaka Sayısı)	$N > 2000$

2.5. Validasyon Parametreleri

“ICH kılavuzu doğrultusunda miktar tayini yöntemlerinin validasyonu için” gerekli “parametreler seçicilik, kesinlik (tekrarlanabilirlik), doğruluk, doğrusallık, dedeksiyon ve tayin limiti, çözelti stabilitesi ve sağlamlık parametreleridir” [29].

2.5.1. Seçicilik (Spesifiklik)

Seçicilik bir yöntemde tayini amaçlanan analit veya analitleri numunedeki diğer bileşenler içerisinde seçerek ayırabilme yeteneğidir. Yöntemin seçiciliğinin tayini, etkin maddelerin safsızlıklar, degradasyon ürünleri, ekspiyanlar gibi diğer potansiyel bileşenlerden ayrılması için gereklidir [27].

2.5.2. Doğrusallık

Bir metodun doğrusallığı, belirli bir aralıktaki numune konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak sonuçlar elde edebilme yeteneğidir. HPLC yönteminde bu ilişki, dedektör cevabı (pik alanı veya yükseklik) ile numune konsantrasyonu (miktarı) arasındaki ilişkidir [27].

2.5.3. Dedeksiyon Limiti (LOD) ve Tayin Limiti (LOQ)

LOD: “Analitin gözlenebilen en düşük konsantrasyonudur”. LOD’yi hesaplayabilmek için ICH method validasyonu kılavuzunda birkaç yöntem vardır. Bunlar içerisindeki en basit yöntem, LOD değerinin bir analitin sinyal/gürültü oranının 3 veya 3 ten büyük olması sonucuna dayanarak belirlenmesidir [27].

LOQ: Bir analitin belirli bir doğruluk ve kesinlik derecesi ($\pm\%5.0$) ile miktarının hesaplanabildiği en düşük seviyedir. LOQ hesaplamasının en basit yöntemi de, sinyal/gürültü oranının 10 veya 10 dan büyük olması sonucuna dayanarak belirlenmesidir [27].

2.5.4. Kesinlik

“Sistemin kesinliği bir metodun ardarda enjeksiyonlarda tekrarlanabilir sonuçlar” verebilmesidir. Bir “yöntemin kesinliği tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik parametreleri ” ile değerlendirilir [27].

2.5.5. Doğruluk (Geri Kazanım)

Doğruluk, elde edilen gerçek sonucun kabul edilen doğru değere veya bir referans değere yakınlığıdır. Doğruluk çalışması genellikle analitin plasebo üzerine spike olarak eklenmesi ile yapılır. Plasebo olmadığı durumlarda standart ekleme yöntemi ile de çalışılabilir [27].

2.5.6. Sağlamlık

Sağlamlık, yöntemin performansının, yöntem parametrelerinde küçük, bilinçli değişiklikler yapılarak ölçülmesidir. Sağlamlık doğrulamasının amacı,

“yöntemin başarılı bir şekilde uygulanabilmesi için” kritik parametreleri belirlemektir. Validasyon aşamasında sağlamlık parametresi yapılırken, bazı parametreler belirli makul oranlarda değiştirilerek değerlendirme yapılır.

HPLC yöntemleri için bu parametre mobil fazdaki pH değişimlerinin etkisi, mobil faz bileşimindeki değişikliklerin etkisi, farklı kolonlar, kolon sıcaklığındaki küçük değişiklikler veya akış hızı değişiklikleri olabilir. Çözelti stabilitesi de sağlamlık parametresi adı altında değerlendirilebilir. Numuneler, belirlenen sıcaklıkta, belirli aralıklarla enjekte edilerek alan değişimi kontrolü ile değişimler kontrol edilir. Miktar tayini için bu değişim limiti en fazla %2.0'dir [29].



3. GEREÇ VE YÖNTEM

“Bu tez çalışması İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Ana Bilim Dalı ve Deva Holding A.Ş. Ar-Ge Bölümü Analitik Kimya Laboratuvarında 2019-2020 yılları arasında gerçekleştirilmiştir.”

3.1. “Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler”

Levamisol HCl çalışma standardı

Triklabendazol çalışma standardı

Levamisol HCL ve Triklabendazol içeren oral süspansiyon

Potasyum Dihidrojen Fosfat (J.T Baker, analitik kalitede)

Sodyum Hidroksit (J.T.Baker, analitik kalitede)

Metanol (J.T.Baker, analitik kalitede)

Asetonitril (J.T.Baker, analitik kalitede)

Saf su (HPLC saflığında)

3.2. Aletler ve Diğer Gereçler

- HPLC cihazı (Shimadzu Corporations- Japan)
 - Shimadzu LC-20AT pompa sistemi
 - Shimadzu SIL-20AC HT Otomatik numune örnekleyici
 - Shimadzu SPD-M20A DAD Dedektör
 - DGU-20A5 Gaz giderme ünitesi
 - Shimadzu CTO-10ASvp Kolon fırını
 - Shimadzu LC-Solution yazılımı
- Phenomenex Gemini C18 (150x4.6mm, 5µm) analitik kolon
- Mobil Faz Süzme Ünitesi (Sartorius, 0,5 µ)
- Mettler Toledo Seven Excellence pH metre

- Heidolph MR 3001K Manyetik Karıştırıcı
- Teraziler (Mettler Toledo XP205,Sartorius MSA2255-00DA)
- VWR ultrasonic Cleaner Ultrasonik Banyo
- Millipore Milli-Q-RG Ultra Saf Su Cihazı
- Isolab Balonjojeler (10, 20, 50, 100, mL lik)
- Isolab dereceli pipetler
- Damlalıklı Pastör pipeti
- Sartorius 0.45 µm RC filtre
- Hesap makinesi (Casio Scientific Calculator fx-82 MS)
- MS Office Word Programı
- MS Office Excel Programı

3.3. Levamizol HCl ve Triklabendazolün “Yan Yana Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Analizi”

Levamizol HCl ve Triklabendazolün “yan yana HPLC ile tayininin” yapılabilmesi için kolon, mobil faz akış hızı, mobil faz oranı, dedektör dalga boyu, kolon sıcaklığı gibi kromatografik koşullar belirlendi. Belirlenen şartlar altında geliştirilen bu yöntem oral süspansiyonda bulunan veteriner ilaç etken maddelerinin analizine uygulandı.

3.3.1. Kromatografik Koşulların Belirlenmesi

“Literatür çalışmaları göz önüne alınarak” HPLC çalışmaları, kromasil C18, ACE C18, Simetry C18, İntersil ODS kolonlarda, çeşitli pH’larda ve çeşitli oranlardaki potasyum dihidrojen fosfat tamponu:asetonitril mobil faz sistemleri denenerek gerçekleştirilmiş ve çalışılacak dalga boyu belirlenmiştir. “Elde edilen verilere dayanarak en iyi kromatografik ayrımın” sağlandığı koşullar belirlenmiştir. Elde edilen veriler Bölüm 6.1.1’de yer almaktadır.

3.3.2. Kromatografik Koşullar

Kolon	: Phenomenex Gemini C18 150 x 4.6 mm, 5µm
Mobil faz	: pH 8.0 fosfat tamponu : Asetonitril (52:48) (h/h)
Kolon sıcaklığı	: 25 °C
Numune Bölmesi Sıcaklığı	: 5 °C
Akış Hızı	: 1,5 mL/dk
Dedektör Tipi	: UV /DAD
Enjeksiyon Hacmi	: 20 µL
Dalga Boyu	: 247 nm
Analiz Süresi	: 15 dk

3.3.3. “Mobil Faz ve Çözücü Hazırlanması”

Mobil faz çözeltisi olarak pH 8.0 fosfat tamponu ve Asetonitril çözücülerini hacimsel olarak 52:48 (h/h) oranında karıştırılarak hazırlanmış ve 0,45 µm filtreden vakum altında süzölmüştür.

Tampon Çözeltisi Hazırlanması: 6,8 g Potasyum dihidrojen fosfat 1000,0 mL saf suda çözüldü. pH değeri 5N NaOH kullanılarak 8,0 olacak şekilde ayarlandı.

5N NaOH Hazırlanması :20,0 g sodyum hidroksit 100,0 mL’ lik balon jode su ile çözüldürüldü ve hacmine tamamlandı.

Çözücü: Çözücü olarak Metanol kullanılmıştır.

3.3.4. Validasyonda kullanılacak Çözeltilerin Hazırlanması

Standart Çözeltisi Hazırlanması

15,0 mg Levamizol HCl ve 24,0 mg Triklabendazol çalışma standardı 50,0 mL’lik balon jodeye tartılarak aktarıldı. Hacmine metanol ile tamamlandı ve 5 dakika “ultrasonik banyoda bekletilerek çözünmesi sağlandı”. “Balonjode soğuk su içerisinde bekletilerek hacmine gelmesi beklendi”. Bu çözeltiden 5,0 mL alınıp 20,0 mL lik balonjodeye aktarıldı ve hacmine çözücü ile tamamlandı. “0,45 µm RC filtreden süzöldü”. ($C_{\text{Levamizol HCl}}:75 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Triklabendazol}}:120 \mu\text{g/mL}$)

Numune Çözeltisi Hazırlanması

2,0 ml numune (150,0 mg Levamizol Hidroklorür ve 240,0 mg Triklabendazol'e eşdeğer) 100,0 ml'lik balonjojeye tartılarak aktarıldı. Hacmine çözücü ile tamamlandı ve 5 dakika "ultrasonik banyoda bekletilerek çözünmesi sağlandı". "Balonjoje soğuk su içerisinde bekletilerek hacmine gelmesi beklendi". Bu çözeltiden 2,5 mL alınıp 50,0 mL lik balonjojeye aktarıldı ve hacmine çözücü ile tamamlandı. "0,45 µm RC filtreden süzüldü". ($C_{\text{Levamizol HCl}}:75 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Triklabendazol}}:120 \mu\text{g/mL}$)

3.4. HPLC Yönteminin Validasyonu

3.4.1. Seçicilik

Yöntemin seçiciliğinin tayini için, etken madde piklerine mobil fazdan ve oral süspansiyon numunesinin yardımcı maddelerinden gelebilecek bir girişim olup olmadığı incelendi. Bunlara ait kromatogramlar Bölüm 4.2.1.'de verilmiştir.

3.4.1.1. İşlem

Levamizol HCl standart çözeltisi hazırlanması

15,0 mg Levamizol HCl çalışma standardı 50,0 mL'lik balon jojeye tartılarak aktarıldı. Hacmine metanol ile tamamlandı ve 5 dakika "ultrasonik banyoda bekletilerek çözünmesi sağlandı". "Balonjoje soğuk su içerisinde bekletilerek hacmine gelmesi beklendi". Bu çözeltiden 5,0 mL alınıp 20,0 mL lik balonjojeye aktarıldı ve hacmine çözücü ile tamamlandı. "0,45 µm RC filtreden süzüldü". ($C_{\text{Levamizol HCl}}:75 \mu\text{g/mL}$)

Triklabendazol standart çözeltisi hazırlanması

24,0 mg Triklabendazol çalışma standardı 50,0 mL'lik balon jojeye tartılarak aktarıldı. Hacmine metanol ile tamamlandı ve 5 dakika "ultrasonik banyoda bekletilerek çözünmesi sağlandı". "Balonjoje soğuk su içerisinde bekletilerek hacmine gelmesi beklendi". Bu çözeltiden 5,0 mL alınıp 20,0 mL lik balonjojeye aktarıldı ve hacmine çözücü ile tamamlandı. "0,45 µm RC filtreden süzüldü". ($C_{\text{Triklabendazol}}:120 \mu\text{g/mL}$)

Standart Çözeltisi Hazırlanması

15,0 mg Levamizol HCl ve 24,0 mg Triklabendazol çalışma standardı 50,0 mL'lik balon jojeye tartılarak aktarıldı. Hacmine metanol ile tamamlandı ve 5 dakika

“ultrasonik banyoda bekletilerek çözünmesi sağlandı”. “Balonjoje soğuk su içerisinde bekletilerek hacmine gelmesi beklendi”. Bu çözeltiden 5,0 mL alınıp 20,0 mL lik balonjojeye aktarıldı ve hacmine çözücü ile tamamlandı. “0,45 μ m RC filtreden süzüldü”. ($C_{\text{Levamisol HCl}}:75 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Triklabendazol}}:120 \mu\text{g/mL}$)

Numune Çözeltisi Hazırlanması

2,0 ml numune (150,0 mg Levamisol Hidroklorür ve 240,0 mg Triklabendazol’e eşdeğer) 100,0 ml’lik balonjojeye tartılarak konuldu. Hacmine çözücü ile tamamlandı ve 5 dakika “ultrasonik banyoda bekletilerek çözünmesi sağlandı”. “Balonjoje soğuk su içerisinde bekletilerek hacmine gelmesi beklendi”. Bu çözeltiden 2,5 mL alınıp 50,0 mL lik balonjojeye aktarıldı ve hacmine çözücü ile tamamlandı. “0,45 μ m RC filtreden süzüldü”. ($C_{\text{Levamisol HCl}}:75 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Triklabendazol}}:120 \mu\text{g/mL}$)

Plasebo Çözeltisi Hazırlanması

2,0 mL Levamisol Hidroklorür ve Triklabendazol içermeyen plasebo numunesi 100,0 ml’lik balonjojeye konuldu. Hacmine çözücü ile tamamlandı ve 5 dakika “ultrasonik banyoda bekletilerek çözünmesi sağlandı”. “Balonjoje soğuk su içerisinde bekletilerek hacmine gelmesi beklendi”. Bu çözeltiden 2,5 mL alınıp 50,0 mL lik balonjojeye aktarıldı ve hacmine çözücü ile tamamlandı. “0,45 μ m RC filtreden süzüldü”.

3.4.2. Doğrusallık

Doğrusal çalışma aralığı, geliştirilen yöntemde analitin konsantrasyonuna karşı dedektörün cevabının doğru orantılı olarak artmasıdır.

“Karelerin farkları toplamı (RSS) ve eğim raporlandırılır”.

“Korelasyon katsayısı (R^2) 0.998’den az olmamalıdır”.

“Kesim noktası %100 standart derişimine karşılık gelen” alanın %2’sinden fazla olmamalıdır.

3.4.2.1. İşlem

Numune çözeltisi konsantrasyonunun %80 konsantrasyonda 60 $\mu\text{g/mL}$ Levamisol HCl ve 96 $\mu\text{g/mL}$ Triklabendazol, %90 konsantrasyonda 68 $\mu\text{g/mL}$ Levamisol HCl ve 108 $\mu\text{g/mL}$ Triklabendazol , %100 konsantrasyonda 75 $\mu\text{g/mL}$ Levamisol HCl ve 120

$\mu\text{g/mL}$ Triklabendazol , %110 konsantrasyonda 83 $\mu\text{g/mL}$ Levamizol HCl ve 132 $\mu\text{g/mL}$ Triklabendazol ,%120 konsantrasyonda 90 $\mu\text{g/mL}$ Levamizol HCl ve 144 $\mu\text{g/mL}$ Triklabendazol'e karşılık gelecek şekilde Levamizol HCl ve Triklabendazol çalışma standartları kullanılarak 5 farklı konsantrasyonda çözeltiler hazırlandı. %80, %100 ve %120'lik standart çözeltisinden 6 enjeksiyon, %90 ve %110'luk standart çözeltisinden iki enjeksiyon verildi. Elde edilen kromatogramlardan pik alanı ve konsantrasyon ilişkisinin grafiği çizildi. Elde edilen sonuçlar bölüm 4.2.2'de verilmiştir.

Doğrusallık Stok Çözeltisi Hazırlanması

30,0 mg Levamizol HCl ve 48,0 mg Triklabendazol çalışma standardı 50,0 mL'lik balon jöjeye tartılarak aktarıldı. Hacmine metanol ile tamamlandı ve 5 dakika "ultrasonik banyoda bekletilerek çözünmesi sağlandı". "Balonjöje soğuk su içerisinde bekletilerek hacmine gelmesi beklendi". Bu çözeltiden 25,0 mL alınıp 100,0 mL lik balonjöjeye aktarıldı ve hacmine çözücü ile tamamlandı. "0,45 μm RC filtreden süzüldü". ($C_{\text{Levamizol HCl}}$:150 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Triklabendazol}}$:240 $\mu\text{g/mL}$)

Doğrusallık Çözeltilerinin Hazırlanması

Tablo 3-1: Doğrusallık Çözeltileri Hazırlığı Tablosu

Standart konsantrasyonu	Analit	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Seyreltme Hacmi(mL)	Final Hacmi (mL)
%80	Levamizol HCl	60	8	20
	Triklabendazol	96		
%90	Levamizol HCl	68	9	20
	Triklabendazol	108		
%100	Levamizol HCl	75	10	20
	Triklabendazol	120		
%110	Levamizol HCl	83	11	20
	Triklabendazol	132		
%120	Levamizol HCl	90	12	20
	Triklabendazol	144		

3.4.3. Kantitasyon Tayin sınırı (LOQ) ve Dedeksiyon sınırı (LOD)

Geliştirilen yöntemin gözlenebileceği ve analitler için kabul edilebilir düzeyde doğru ve kesin olarak tayin edebileceği minimum konsantrasyonun tayini için LOD ve LOQ değerleri aşağıdaki formüller ile hesaplandı. Sonuçlar Bölüm 4.2.3’ de verildi.

“Cihazda hesaplanan Sinyal/Gürültü (S/N) oranı yöntemi ile Gözlenebilme sınırı (LOD) 3 veya 3’den büyük olmalı , Tayin sınırı (LOQ) ise 10 veya 10’dan büyük olmalıdır.”

“Kalibrasyon eğrisi yöntemi ile hesaplama yöntemi; ”

$$LOD = 3 \times SD/m$$

$$LOQ = 10 \times SD/m$$

SD: Kalibrasyon doğrusu ile y kesişim noktasının standart sapması

m: Kalibrasyon doğrusunun eğimi

3.4.3.1. İşlem

LOQ için Levamizol HCl Stok Çözeltilisi Hazırlanması: 47,2 mg Levamizol HCl çalışma standardı 50,0 mL’lik balon jojeye tartılarak aktarıldı. Hacmine metanol ile tamamlandı ve 5 dakika “ultrasonik banyoda bekletilerek çözünmesi sağlandı”. “Balonjoje soğuk su içerisinde bekletilerek hacmine gelmesi beklendi”. Bu çözeltiliden 1,0 mL alınıp 20,0 mL lik balonjojeye aktarıldı ve hacmine çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiliden 1,0 mL alınıp 100,0 mL’ye aktarıldı ve hacmine çözücü ile tamamlandı.

LOQ için Triklabendazol Stok Çözeltilisi Hazırlanması: 13,4 mg Triklabendazol çalışma standardı 100,0 mL’lik balon jojeye tartılarak aktarıldı. Hacmine metanol ile tamamlandı ve 5 dakika “ultrasonik banyoda bekletilerek çözünmesi sağlandı”. “Balonjoje soğuk su içerisinde bekletilerek hacmine gelmesi beklendi”. Bu çözeltiliden 2,0 mL alınıp 100,0 mL’ye aktarıldı ve hacmine çözücü ile tamamlandı.

LOQ Çözeltilisi Hazırlanması: Levamizol HCl stok çözeltisinden 1,0 ml ,Triklabendazol stok çözeltisinden 2,0 mL alınarak 100,0 ml’lik balon jojeye tartılarak aktarıldı. Hacmine metanol ile tamamlandı. “0,45 µm RC filtreden süzüldü”. ($C_{\text{Levamizol HCl}}$: 4,7 ng/mL, $C_{\text{Triklabendazol}}$: 53 ng/mL)

LOD Çözeltisi Hazırlanması: Hazırlanan LOQ çözeltisinden 3,3 mL alınıp, 10,0 ml’lik balon jojeye aktarıldı. 0,45 µm RC filtreden süzülüp, enjekte edildi.

3.4.4. Doğruluk

Bulduğumuz değerin doğru değere yakınlığını görmek için geri kazanım çalışması yapıldı. Yöntemin doğruluğunun tayini için miktar tayini konsantrasyonu %100 kabul edilerek, Levamizol HCl ve Triklabendazol çalışma standartları ile %80, %100 ve %120 ‘lik 3 farklı konsantrasyondaki çözeltilerin üzerlerine %100 konsantrasyondaki plasebo karışımı ilave edildi. Sonuçlar Bölüm 4.2.4’ de verildi.

3.4.4.1. İşlem

Doğruluk Stok Standart Çözeltilisinin Hazırlanması

30,0 mg Levamizol HCl ve 48,0 mg Triklabendazol çalışma standardı 50,0 mL’lik balon jojeye tartılarak aktarıldı. Hacmine metanol ile tamamlandı ve 5 dakika “ultrasonik banyoda bekletilerek çözünmesi sağlandı”. “Balonjoje soğuk su içerisinde bekletilerek hacmine gelmesi beklendi”. Bu çözeltiden 25,0 mL alınıp 100,0 mL’ye aktarıldı ve hacmine çözücü ile tamamlandı. “0,45 µm RC filtreden süzüldü”. ($C_{\text{Levamizol HCl}}:150 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Triklabendazol}}:240 \mu\text{g/mL}$)

% 80, %100 ve %120 Konsantrasyonda Doğruluk Çözeltilerinin Hazırlanması

100,0 mL’lik balonjojeye 2,0 mL plasebo çözeltisi konuldu ve hacmine çözücü ile tamamlandı. 5 dakika “ultrasonik banyoda bekletilerek çözünmesi sağlandı”. “Balonjoje soğuk su içerisinde bekletilerek hacmine gelmesi beklendi”. Bu çözeltiden 1,0 mL alındı ve 20,0 mL’lik balonjojeye aktarıldı. Üzerine, %100 ve %120 lik çözeltiler için sırasıyla 8,0 mL, 10 mL ve 12 mL doğruluk stok standart çözeltisi ilave edildi ve çözücü ile hacmine tamamlandı. “0.45 µm RC filtreden süzüldü”. (% 80 için: $C_{\text{Levamizol HCl}}:60 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Triklabendazol}}:96 \mu\text{g/mL}$, % 100 için $C_{\text{Levamizol HCl}}:75 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Triklabendazol}}:120 \mu\text{g/mL}$, % 120 için: $C_{\text{Levamizol HCl}}:90 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Triklabendazol}}:144 \mu\text{g/mL}$)

3.4.5. Kesinlik

3.4.5.1. Sistem Kesinliği

“Ardışık yapılan altı standart enjeksiyonundan elde edilen” etken madde pik alanlarında her iki etken için de “rölatif standart sapma (RSD) $\leq$ %2,0 olmalıdır”.

3.4.5.2. Tekrarlanabilirlik

6 adet ardışık numune enjeksiyonlarından elde edilen “miktar tayini sonuçlarının bağıl standart sapması” (RSD) $\leq$ % 2,0 olmalıdır.

Tüm sonuçlar limit içinde olmalıdır ve “%95 güven aralığı hesaplanmalıdır”.

3.4.5.2.1. İşlem

“Sistem kesinliği için %100'lük standart çözeltisi hazırlandı” ve altı adet ardışık enjeksiyon verildi. Tekrarlanabilirlik için Levamizol HCl/Triklabendazol içeren oral süspansiyon numunesi 6 farklı numune çözeltisi şeklinde hazırlandı, her bir numune çözeltisinden ikişer enjeksiyon verildi ve ortalamaları alındı. Sonuçlar Bölüm 4.2.5’ de verildi.

3.4.6. Laboratuvar içi Kesinlik

“İki farklı çalışma sonucundaki ortalamalar arasındaki” sonuç farkı %2,0 den küçük olmalıdır.

3.4.6.1. İşlem

Aynı laboratuvar içerisinde farklı kolon, farklı cihaz ve farklı bir analist tarafından farklı bir günde miktar tayini analizi yapıldı. Sonuçlar Bölüm 4.2.6’da verildi.

3.4.7. Sağlamlık

Yöntem parametrelerinin küçük değişiklikleri sonucunda “sistem uygunluk parametlerine etkisi incelenmiştir”. Standart çözeltisi 6 kez, numune çözeltisi 2 kez enjekte edildi ve metodun değişiklikler karşısında dayanıklılığı incelendi. Sonuçlar Bölüm 4.2.7’ de verildi.

3.4.7.1. İşlem

Mobil faz akış hızı değişimi

Mobil fazın akış hızı 1,3 mL ve 1,7 ml'dk ya ayarlandı.

Kolon sıcaklığı değişimi

Kolon fırını sıcaklığı 23 °C ve 27°C'ye ayarlandı.

Kolon değişimi

Aynı marka kolonun farklı lot numarası ile çalışıldı. Sonuçlar ara kesinlik sonuçlarından alındı.

Mobil fazın tampon organik oranı değişimi

Mobil faz oranı Tampon:Asetonitril (52:48) iken (47:53) ve (57:43) yapılarak çalışıldı.

3.4.8. Çözelti Stabilitesi

Standart ve numune özeltisinin Levamizol HCl ve Triklabendazol alanlarındaki değişim başlangıç alanlarına göre %2.0 den az olmalıdır.

3.4.8.1. İşlem

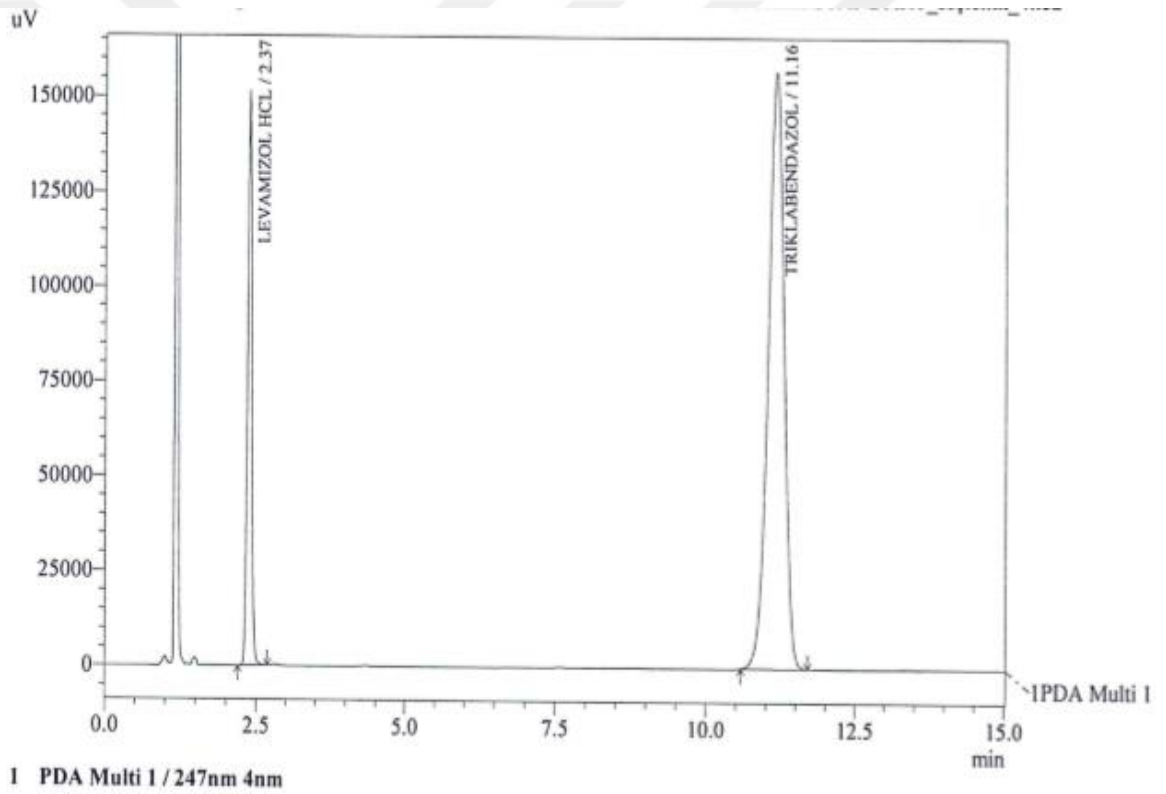
%100 konsantrasyondaki standart ve numune özeltisi 5 °C’de 48 saat boyunca aralıklarla enjekte edildi. Başlangıç alanı %100 kabul edilerek, alan değişimi % olarak hesaplandı. Sonuçlar Bölüm 4.2.8’ de verildi.

4. BULGULAR

4.1. Levamizol HCl ve Triklabendazolün Yan Yana Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Analiz Sonuçları

4.1.1. Kromatografik Koşulların Belirlenmesi

Yapılan denemeler sonucunda en iyi sonuçlar 150 mm uzunluğunda, 4,6 mm iç çapında, 5 µm partikül çaplı Phenomenex Gemini C18 kolonda, 0.05 M Fosfat Tamponu pH 8,0–asetonitril(52:48) mobil fazında, 247 nm dalga boyu kullanılarak elde edilmiştir. Bu kromatografik sistemde alıkonma zamanları Levamizol HCl için 2,4, Triklabendazol için 11,2 dakikadır (Şekil 4-1).

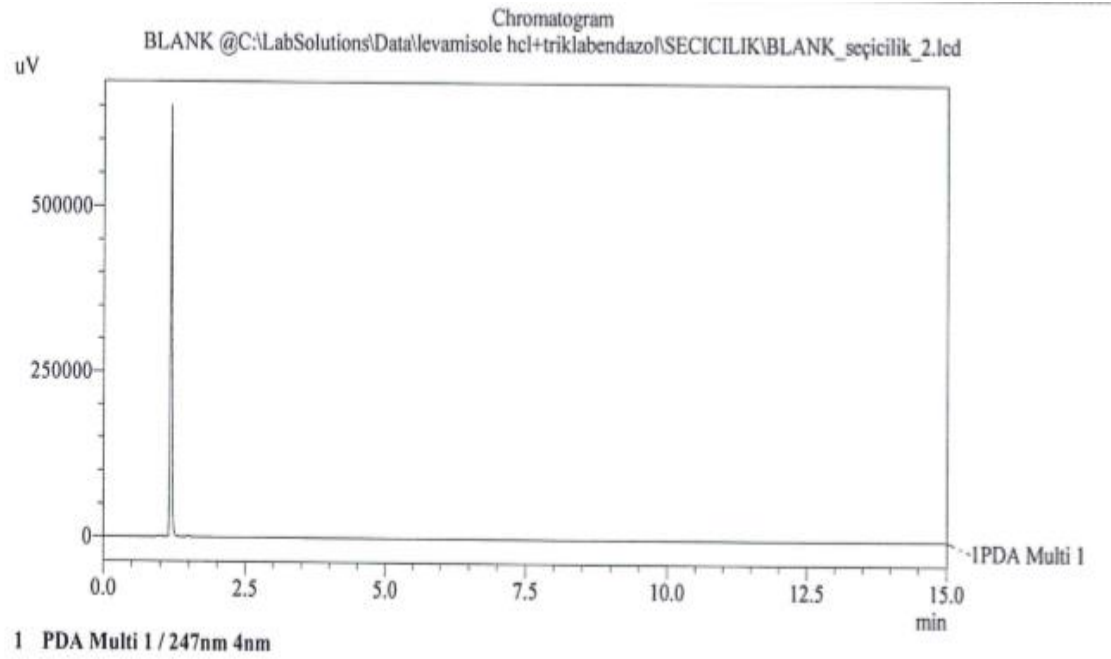


Şekil 4-1: 75 µg/mL levamizol HCl ve 120 µg/mL triklabendazole ait örnek kromatogram

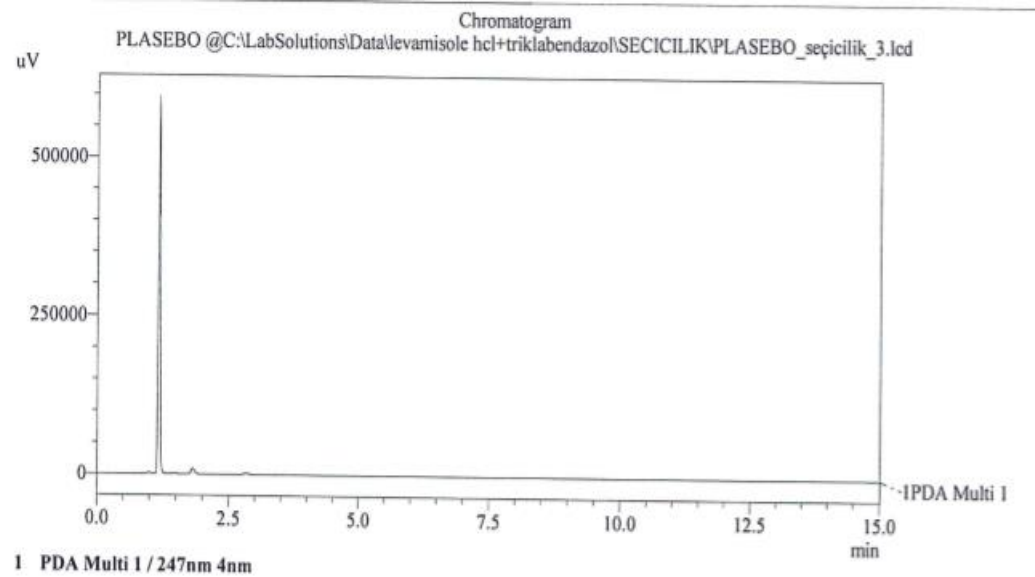
4.2. Yöntem Validasyonu

4.2.1. Seçicilik

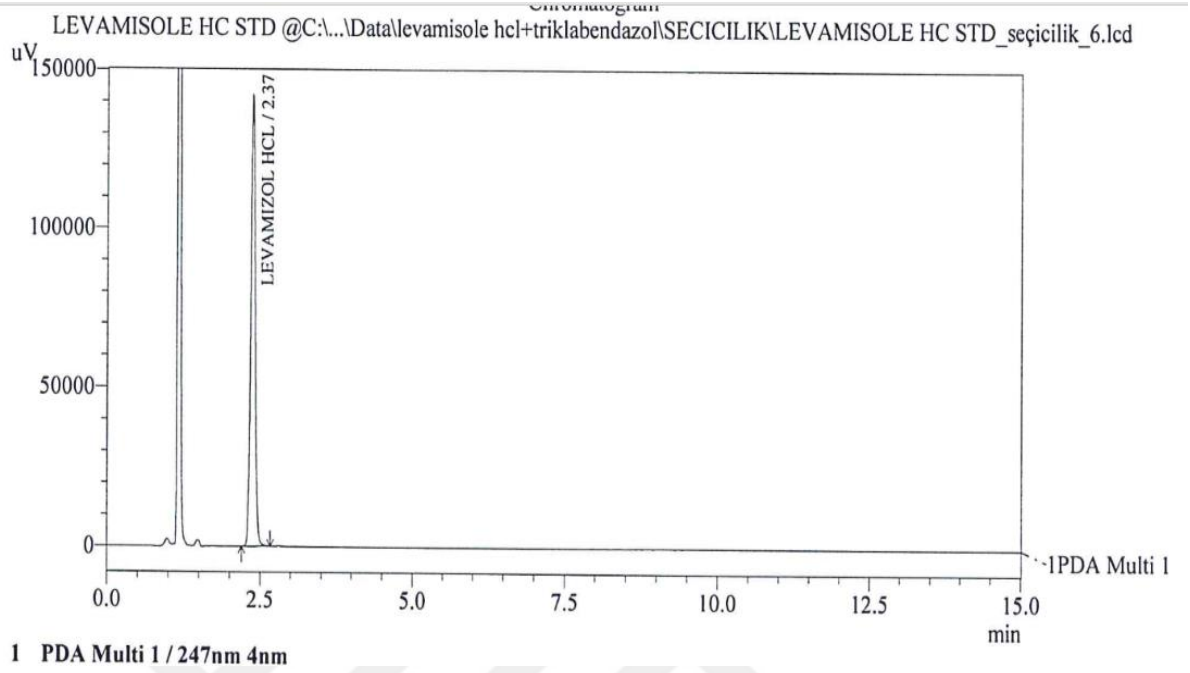
Çalışmaya ait sonuçlar şekil 4-2, şekil 4-3, şekil 4-4, şekil 4-5, şekil 4-6, şekil 4-7, şekil 4-8 ve şekil 4-9'da verilmiştir. Çözücü ve plasebo enjeksiyonlarında Levamizol HCl ve Triklabendazol piklerinin çıktığı dakikalarda herhangi bir pik olmadığı ve analize girişim yapmadığı görüldü.



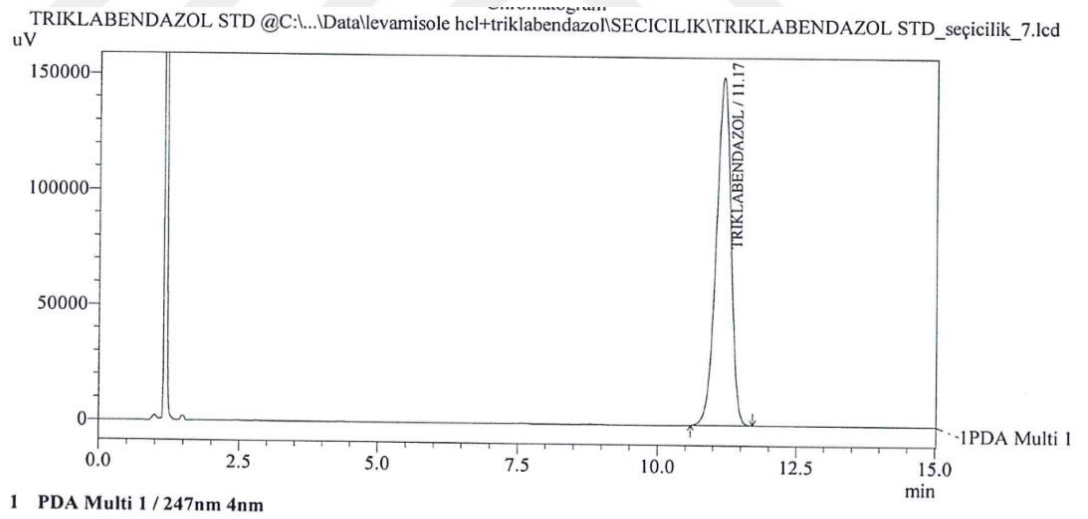
Şekil 4-2: Çözücü enjeksiyonuna ait kromatogram



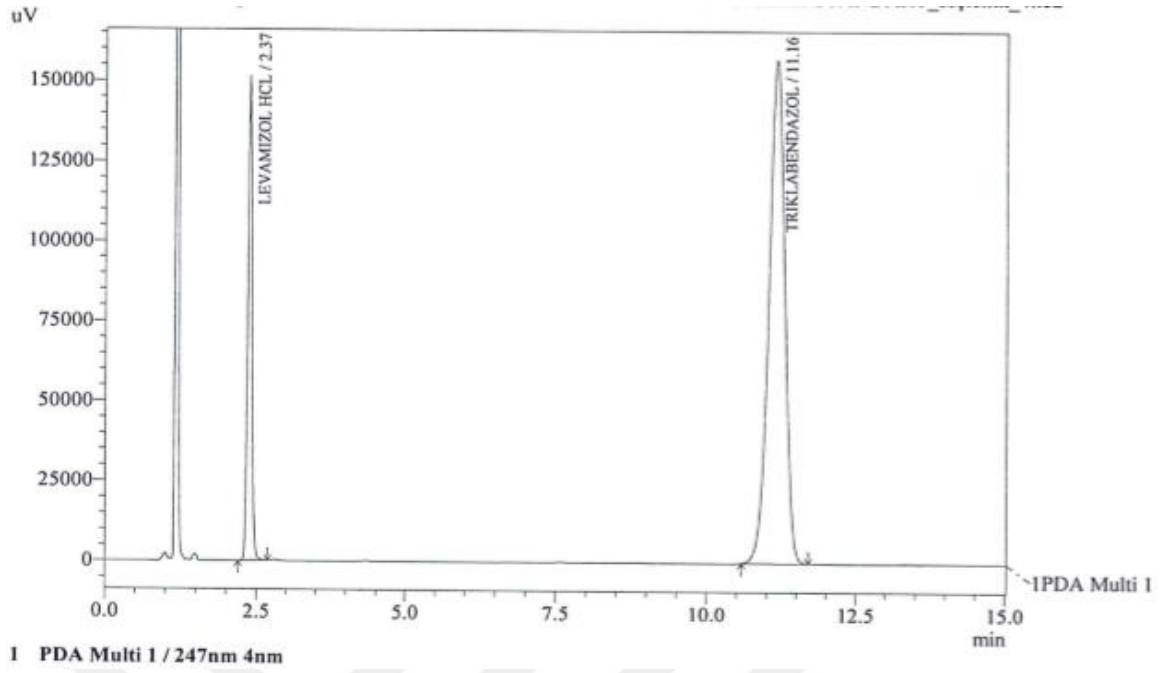
Şekil 4-3: Oral süspansiyon yardımcı maddeleri karışımının (plasebo) enjeksiyonuna ait kromatogram



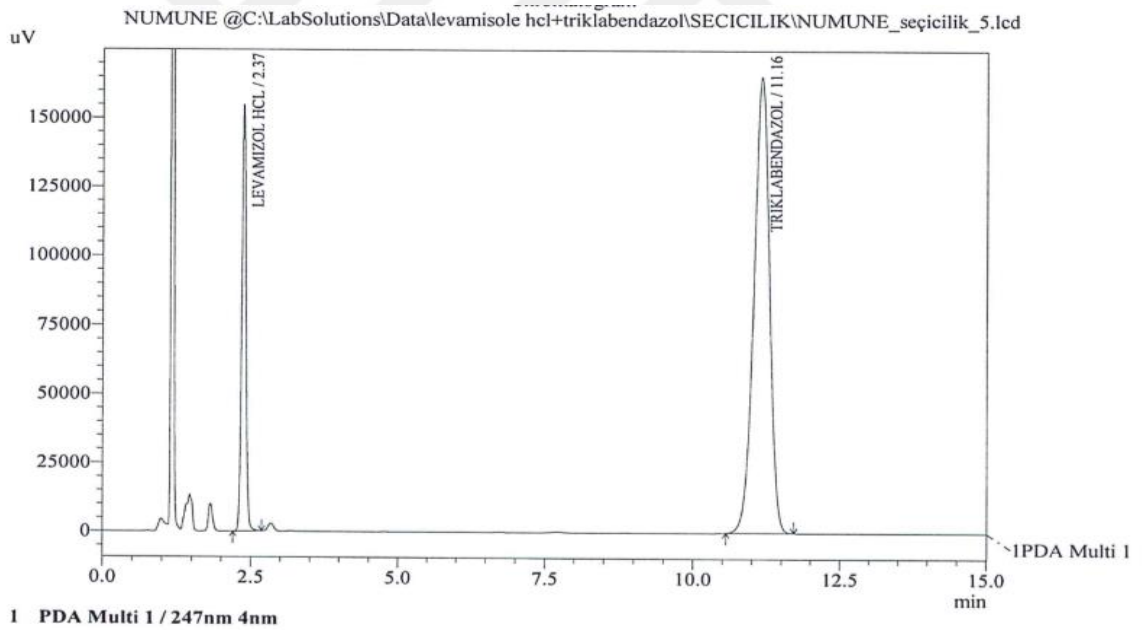
Şekil 4-4: Levamizol HCl standardı enjeksiyonuna ait kromatogram



Şekil 4-5: Triklabendazol standardı enjeksiyonuna ait kromatogram

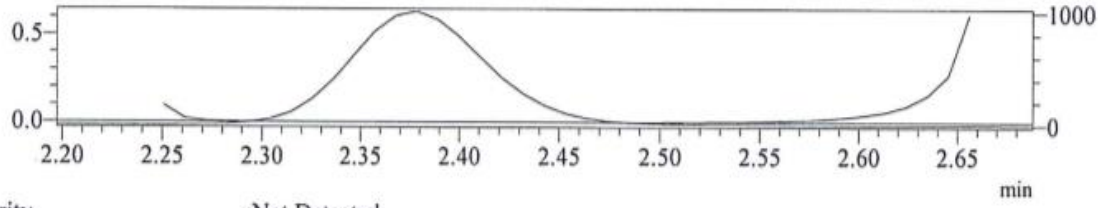


Şekil 4-6: Standart çözeltisine ait örnek kromatogram



Şekil 4-7: Numune çözeltisine ait örnek kromatogram

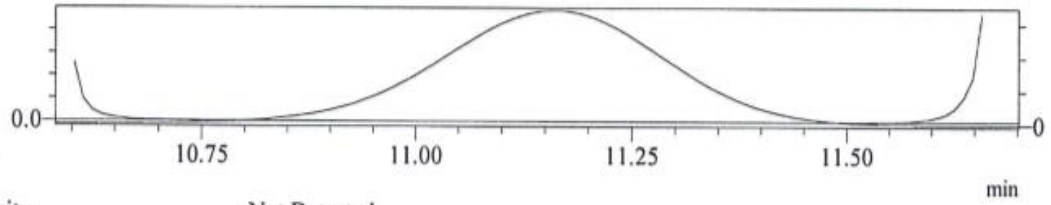
Retention Time : 2.372
Compound Name : LEVAMIZOL HCL



Impurity : Not Detected
Peak purity index : 1.000000
Single point threshold : 0.999999
Minimum peak purity index : 0

Şekil 4-8: Levamizol HCl'e ait pik saflığı spektrumu

Retention Time : 11.156
Compound Name : TRIKLABENDAZOL

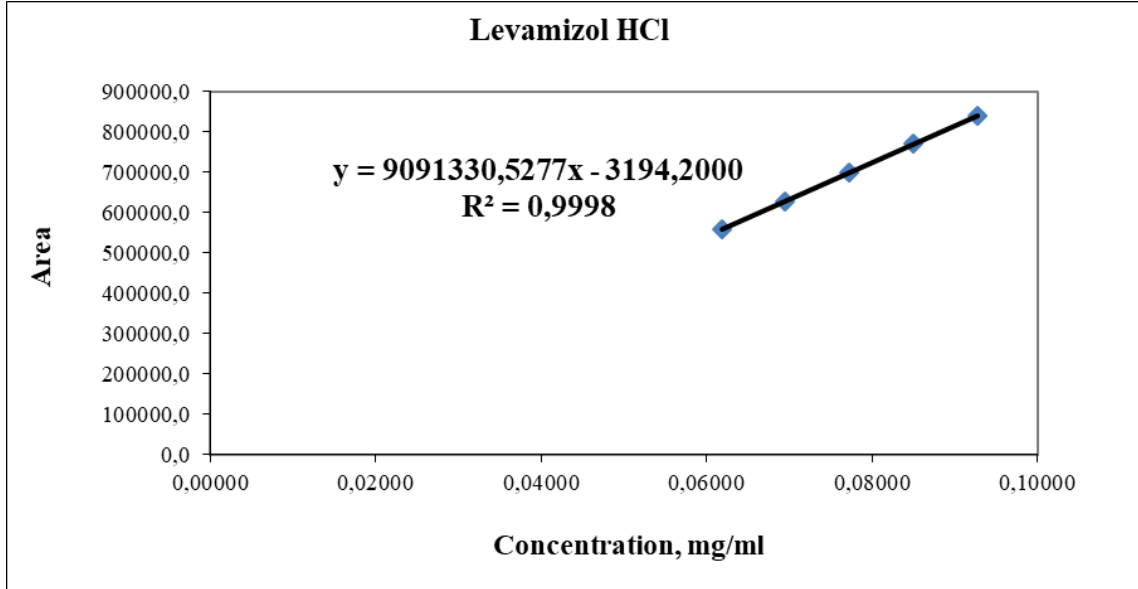


Impurity : Not Detected
Peak purity index : 1.000000
Single point threshold : 0.999999
Minimum peak purity index : 0

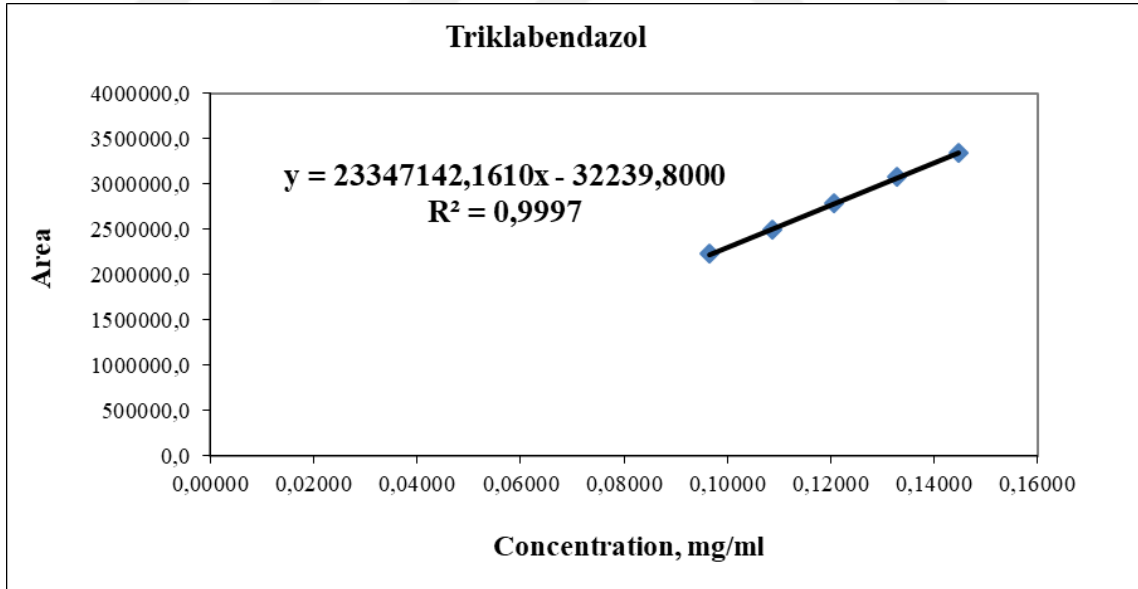
Şekil 4-9: Triklabendazol'e ait pik saflığı spektrumu

4.2.2. Doğrusallık

Levamisol HCl için 60–90 µg/mL, Triklabendazol için 96–144 µg/mL konsantrasyon aralığında 5 farklı konsantrasyondaki standart çözeltiler ile Bölüm 3.4.2.' de anlatıldığı gibi çalışıldı. Her farklı konsantrasyon enjeksiyonuna karşı elde edilen kromatogramlardaki pik alanı sonuçları ile belirtilen konsantrasyon değerleri arasında çizilen doğrusallık grafiği Levamisol HCl için Şekil 4-10'da ve Triklabendazol için Şekil 4-11'de verilmiştir.



Şekil 4-10: Levamisol HCl'in 60–90 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi



Şekil 4-11: Triklabendazolün 96–144 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi

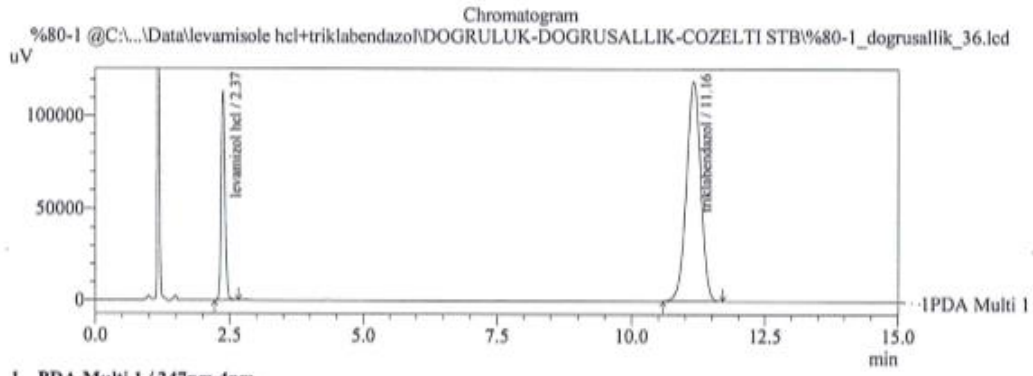
Tablo 4-1 ve Tablo 4-2’de doğrusallık çalışmasında kullanılan farklı konsantrasyondaki standartların pik alanları, korelasyon katsayısı, RSS değeri, eğim ve kesim noktası değerleri, Şekil 4-10 ve 4-11’de ise kalibrasyon grafiği ve doğru denkleminde ($y=mx\pm n$) elde edilen değişkenler ve korelasyon katsayısı karesi (R^2) verilmiştir. Doğrusallık çalışmalarından elde edilmiş %80 seviyesindeki 60 µg/mL Levamizol HCl ile 96 µg/mL Triklabendazol ve %120 seviyesindeki 90 µg/mL Levamizol HCl ile 144 µg/mL Triklabendazol standartlarına ait kromatogram örnekleri Şekil 4-12 ve 4-13’de verilmiştir.

Tablo 4-1: Levamizol HCl için 60–90 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisine ait pik alanı değerleri ve istatistik verileri

% Seviye	Konsantrasyon, µg /mL	Pik Alanı	Hesaplanan Absorbans (Y2)	Farkların Karesi (Y1-Y2) ²
80%	61,78000	559377	558468	826281
90%	69,50250	626736	628676	3763600
100%	77,22500	699106	698884	49284
110%	84,94750	770832	769092	3027600
120%	92,67000	838368	839299	866761
Corr.coefficient:	0,9999	RSS		8533526
Slope	9091330,5277			
Intercept	-3194,2000			

Tablo 4-2: Triklabendazol için 96–144 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisine ait pik alanı değerleri ve istatistik veriler

% Seviye	Konsantrasyon, µg /mL	Pik Alanı	Hesaplanan Absorbans (Y2)	Farkların Karesi (Y1-Y2) ²
80%	96,53728	2225467	2221630	14722569
90%	108,60444	2496619	2503364	45495025
100%	120,67160	2782129	2785097	8809024
110%	132,73876	3077652	3066831	117094041
120%	144,80592	3343619	3348565	24462916
Corr.coefficient:	0,9999	RSS		210583575
Slope	23347142,1610			
Intercept	-32239,8000			



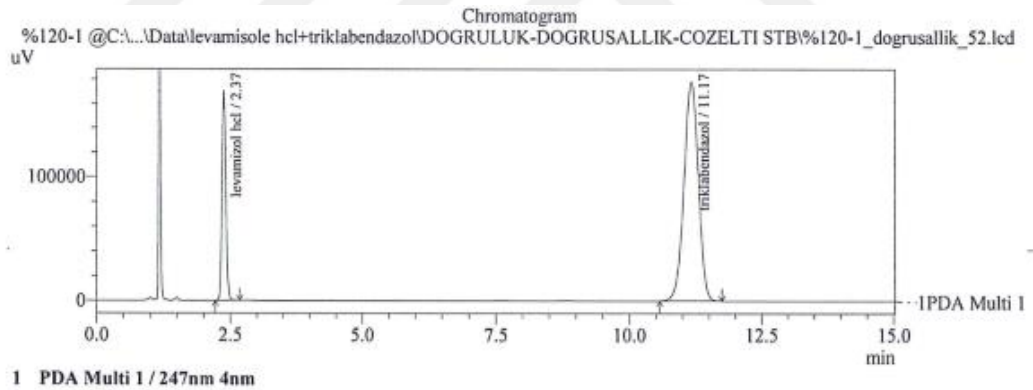
<Results>

PeakTable @C:\...Data\levamisole hcl+triklabendazol\DOGRULUK-DOGRUSALLIK-COZELTI STB\%80-1_dogrussallik_36.lcd

PDA Ch1 247nm 4nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Area %	Tailing Factor	Resolution	Theoretical Plate#	Cone.
1	levamisole hcl	2.37	559180	20.1	1.20	0.0	4222	0.00
2	triklabendazol	11.16	2226098	79.9	0.98	27.3	8005	0.00
Total			2785277	100.0				

Şekil 4-12: %80 seviyesindeki 60 µg/mL Levamizol HCl ile 96 µg/mL Triklabendazol standartlarına ait kromatogram



<Results>

PeakTable @C:\...Data\levamisole hcl+triklabendazol\DOGRULUK-DOGRUSALLIK-COZELTI STB\%120-1_dogrussallik_52.lcd

PDA Ch1 247nm 4nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Area %	Tailing Factor	Resolution	Theoretical Plate#	Cone.
1	levamisole hcl	2.37	839029	20.0	1.20	0.0	4193	0.00
2	triklabendazol	11.17	3348942	80.0	0.98	27.1	7911	0.00
Total			4187971	100.0				

Şekil 4-13: %120 seviyesindeki 90 µg/mL Levamizol HCl ile 144 µg/mL Triklabendazol standartlarına ait kromatogram

4.2.3. “Tayin sınırı (LOQ) ve Gözlenebilme Sınırı (LOD)”

Bölüm 3.4.3’de verilen denklemlere göre hesaplanan LOD değerleri Levamizol HCl için 1,6 ng/mL ve Triklabendazol için 17 ng/mL, LOQ değerleri Levamizol HCl için 4,7 ng/mL ve Triklabendazol için 53 ng/mL olarak bulunmuştur.

4.2.4. Doğruluk

Hesaplanan geri kazanım sonuçları tablo 4-3 ve tablo 4-4’ de verilmiştir.

Tablo 4-3: Levamizol HCl için doğruluk (geri kazanım) sonuçları

Seviye	Teorik Konsantrasyon $\mu\text{g/mL}$	Deneyisel Konsantrasyon $\mu\text{g/mL}$	Geri Kazanım (%)	Ortalama (%)
%80	61,800	61,306	99,2	99,1
	61,820	61,202	99,0	
	61,740	61,246	99,2	
%100	77,250	76,400	98,9	98,8
	77,275	76,193	98,6	
	77,175	76,249	98,8	
%120	92,700	91,495	98,7	98,7
	92,730	91,525	98,7	
	92,610	91,499	98,8	
Ortalama				98,9
SD				0,21
% RSD				0,21

Tablo 4-4: Triklabendazol için doğruluk (geri kazanım) sonuçları

Seviye	Teorik Konsantrasyon $\mu\text{g/mL}$	Deneyisel Konsantrasyon $\mu\text{g/mL}$	Geri Kazanım (%)	Ortalama (%)
%80	97,120	96,343	99,2	99,1
	96,960	96,184	99,2	
	97,220	96,151	98,9	
%100	121,400	120,550	99,3	99,1
	121,200	120,109	99,1	
	121,525	120,188	98,9	
%120	145,680	143,786	98,7	98,8
	145,440	143,986	99,0	
	145,830	143,934	98,7	
Ortalama				99,0
SD				0,17
% RSD				0,17

SD: Standart sapma RSD: Relatif standart sapma

4.2.5. Kesinlik

4.2.5.1. Sistem Kesinliği

“Ardışık altı standart enjeksiyonu sonuçları” Tablo 4-5’de verilmiştir.

Tablo 4-5: Sistem Kesinliği Sonuçları

Enjeksiyon Sayısı	Alan, AU	Alan, AU
	Levamisol HCl	Triklabendazol
1	737054	2896661
2	735974	2896197
3	734864	2891953
4	734958	2890757
5	736859	2900740
6	736843	2902915
Ortalama	736092	2896537
SD	988,5	4751,8
% RSD	0,13	0,16

4.2.5.2. Tekrarlanabilirlik

Levamisol HCl ve Triklabendazol içeren oral süspansiyon numunesi için tekrarlanabilirlik sonuçları Tablo 4-6’da verilmiştir.

Tablo 4-6: Levamizol HCl ve Triklabendazol oral süspansiyon numunesi için tekrarlanabilirlik sonuçları

Numune	Levamizol HCl (%)	Triklabendazol (%)
1	98,8	99,8
2	100,8	99,0
3	101,3	99,4
4	100,3	98,5
5	100,7	99,0
6	100,6	98,5
Ortalama	100,4	99,0
SD	0,86	0,51
% RSD	0,85	0,51
% 95 Güven aralığı	100,4±0,99	99,0±0,59

4.2.6. Laboratuvar İçi Kesinlik

Farklı gün, farklı cihaz, farklı kolon ve farklı kişi tarafından yapılan analizin sonuçları tablo 4-7 ve tablo 4-8’de verilmiştir.

Tablo 4-7: Levamizol HCl miktar tayini Laboratuvar içi kesinlik sonuçları

Numune	Analist I (%)	Analist II (%)
1	98,8	101,1
2	100,8	100,6
3	101,3	101,3
4	100,3	101,8
5	100,7	100,7
6	100,6	100,4
Ortalama	100,4	101,0
SD	0,86	0,50

% RSD	0,85	0,50
% 95 Güven aralığı	100,4±0,99	101,0±0.57
1.ve 2. Analistin ortalaması	100,7	
Ortalamalar arası % fark	0,60	

Tablo 4-8: Triklabendazol miktar tayini Laboratuvar içi kesinlik sonuçları

Numune	Analist I (%)	Analist II (%)
1	99,8	99,8
2	99,0	99,4
3	99,4	99,7
4	98,5	100,3
5	99,0	99,6
6	98,5	99,4
Ortalama	99,0	99,7
SD	0,51	0,30
% RSD	0,51	0,32
% 95 Güven aralığı	99,0±0,59	99,7±0,34
1.ve 2. Analistin ortalaması	99,4	
Ortalamalar arası % fark	0,7	

4.2.7. Sağlamlık

Tablo 4-9: Mobil fazın akış hızı değişimi sonuçları

Akış Hızı	Kuyruklanma faktörü				Teorik Plaka Sayısı			
	STD	NUMUNE	STD	NUMUNE	STD	NUMUNE	STD	NUMUNE
	LVMZ	LVMZ	TRBZL	TRBZL	LVMZ	LVMZ	TRBZL	TRBZL
1,3 mL/dk	1,18	1,18	0,98	0,98	4398	4461	8246	8182
1,5 mL/dk	1,21	1,21	0,96	0,97	4267	4225	8642	8504
1,7 mL/dk	1,21	1,21	0,99	0,99	3839	3737	7324	7284

Tablo 4-10: Kolon sıcaklığı değişimi sonuçları

Kolon sıcaklığı	Kuyruklanma faktörü				Teorik Plaka Sayısı			
	STD	NUMUNE	STD	NUMUNE	STD	NUMUNE	STD	NUMUNE
	LVMZ	LVMZ	TRBZL	TRBZL	LVMZ	LVMZ	TRBZL	TRBZL
22 °C	1,18	1,18	0,99	0,99	4085	4106	7315	7299
25 °C	1,21	1,21	0,96	0,97	4267	4225	8642	8504
28 °C	1,20	1,20	1,00	1,00	4079	4007	7886	7844

Tablo 4-11: Kolon lot numarası değişimi sonuçları

Kolon Lot değişimi	Kuyruklanma faktörü				Teorik Plaka Sayısı			
	STD	NUMUNE	STD	NUMUNE	STD	NUMUNE	STD	NUMUNE
	LVMZ	LVMZ	TRBZL	TRBZL	LVMZ	LVMZ	TRBZL	TRBZL
2064	1,21	1,21	0,96	0,97	4267	4225	8642	8504
1916	1,26	1,27	1,12	1,12	4314	4292	9435	9409

Tablo 4-12: Mobil faz oranı değişimi sonuçları

Mobil faz oranı	Kuyruklanma faktörü				Teorik Plaka Sayısı			
	STD	NUMUNE	STD	NUMUNE	STD	NUMUNE	STD	NUMUNE
	LVMZ	LVMZ	TRBZL	TRBZL	LVMZ	LVMZ	TRBZL	TRBZL
47:53 (tampon: ACN)	1,22	1,22	1,00	1,00	3843	3937	7192	7132
52:48 (tampon: ACN)	1,21	1,21	0,96	0,97	4267	4225	8642	8504

Akış hızı, kolon sıcaklığı, kolon lot numarası küçük değişiklikler sonrasında “sistem uygunluk parametrelerinde anlamlı bir fark görülmemiştir”. Sonuçlar kabul kriterine uygundur fakat tampon oranı 57 olarak değiştirildiğinde kromatogramda

piklerin ayrımı sağlanmamıştır. Metot tampon değişimin artırılmasına dayanıklı değildir.

4.2.8. Çözelti Stabilitesi

Standart ve numune çözeltisinin otomatik numune örnekleyicisinde 5 °C’de 48 saat boyunca aralıklarla enjeksiyonu sonucunda standart ve numune çözeltisinin bozulmadığı , 48 saat boyunca stabil olduğu görülmüştür. Başlangıç enjeksiyonu %100 kabul edilip, alan değişimleri % olarak buna göre hesaplanmıştır. Sonuçlar tablo 4-13, ve tablo 4-14’de verilmiştir.

Tablo 4-13: Levamizol HCl için 5 °C çözelti stabilitesi sonuçları

Süre Saat	STANDART		NUMUNE	
	Alan	%Değişim	Alan	%Değişim
0	715203	-	733664	-
4	708358	1.0	729375	0.6
8	708474	0.9	729576	0.6
15	707646	1.1	729363	0.6
19	705622	1.3	727854	0.8
23	706914	1.2	729394	0.6
27	704111	1.6	727775	0.8
31	703140	1.7	727983	0.8
35	705089	1.4	728490	0.7
39	702962	1.7	728853	0.7
43	703840	1.6	727816	0.8
47	703631	1.6	727163	0.9
48	702979	1.7	726345	1.0

Tablo 4-14: Triklabendazol için 5 °C çözelti stabilitesi sonuçları

Süre Saat	STANDART		NUMUNE	
	Alan	%Değişim	Alan	%Değişim
0	2943053	-	2945872	-
4	2914593	1.0	2924053	0.7
8	2913001	1.0	2923496	0.8
15	2910570	1.1	2918437	0.9
19	2901402	1.4	2915757	1.0
23	2906510	1.2	2924257	0.7
27	2894176	1.7	2917699	1.0
31	2886855	1.9	2917706	1.0
35	2894654	1.6	2922838	0.8
39	2886524	1.9	2923603	0.8
43	2888065	1.9	2919856	0.9
47	2887529	1.9	2919364	0.9
48	2887023	1.9	2910699	1.2

4.3. Oral Süspansiyon numunesinde Levamizol HCl ve Triklabendazol Tayini Sonuçları

Geliştirilen yöntem ile oral süspansiyon numunesinde miktar tayini analizi yapılmış ve aşağıda tablodaki sonuçlar elde edilmiştir.

Tablo 4-15: 75 mg/mL Levamizol HCl ve 120 mg/mL Triklabendazol içeren oral süspansiyonun geliştirilen yöntemle elde edilen analiz sonuçları

	Levamizol HCl (%)	Triklabendazol (%)
n ₁	98,8	99,8
n ₂	100,8	99,0
n ₃	101,3	99,4
n ₄	100,3	98,5
n ₅	100,7	99,0
n ₆	100,6	98,5
Ortalama	100,4	99,0
SD	0,86	0,51
RSD (%)	0,85	0,51
Güven sınırları	100,4±0,99	99,0±0,59

SD: Standart sapma RSD: Relatif standart sapma

5. TARTIŞMA

Bu Yüksek Lisans tezine konu olan iki etkin maddeden Levamizol, imidazotiyazol grubu, Triklabendazol ise benzimidazol grubu antihelmintik ilaçlardır.

Levamizol rasemik bir karışım olan tetramizolün biyolojik yönden aktif l-isomeridir. Terapötik etkiye sahip l-isomerin tek başına kullanılmasıyla dekstro isomerden kaynaklanan toksik etkiler azalmış ve güven aralığı genişlemiştir. Tetramizol piyasaya çıkarıldıktan sonra, içerdiği iki izomer üzerinde çalışmalar yapılmış ve testler sonucunda antihelmintik etkinliğinin tamamen L-izomerden geldiği görülmüştür. Buna ek olarak, tetramizol dozunun yarısında, L-izomeri kullanılmış ve aynı antihelmintik etki sağlanmıştır. Bu etki sayesinde, L-izomer daha düşük dozda ilaç kullanıp, toksisiteden kaçınmak için iyi bir seçenek olmuştur. İlacın güvenlik eşiğinde yüksek olduğu görülmüştür [30,31]. Eşit miktardaki tetramizol ve levamizol yaklaşık olarak aynı toksisiteye sahiptir. Levamizol, yukarıda belirtilen avantajlar sayesinde 1970’li yıllardan itibaren antihelmintik ilaç sınıfında tüm dünyada tetramizolün yerini almaya başlamıştır [32,33]. Bugün veteriner ilaç sektöründe, birçok alanda antihelmintik tedavi spektrumuna sahip olması sayesinde, birçok hayvan türlerinde, solunum ve sindirim sistemindeki nematodlar üzerinde etki göstermesi sebebiyle ve hem oral hem paranteral yollardan uygulanabilmesi sayesinde en fazla tercih edilen antihelmentik ilaçlardan biridir [34].

Triklabendazol ise veteriner ilaçları arasında benzimidazol türevinde bir antihelmintik ilaç olarak, *fascioliasis* türlerinin tedavisi amacıyla kullanılır. Bu antihelmentik etken madde, yeni nesil bir benzimidazoldür ve koyunlardaki enfeksiyonun sebebi olan *Fasciola hepatica*’nın hem olgun evresinde hem erginleşme dönemi öncesi evresinde oldukça etkilidir [35]. Son zamanlarda *fascioliasis* tedavisinde oldukça sık kullanılmaktadır. İnsan ve hayvanlarda, trematod [35], parazitik nematodlar [36,37], cestodlar [38], *giardia* gibi ptotozoonları tedavisinde kullanılmaktadır [39].

Levamizol HCl ve Triklabendazolün yukarıda bahsedilen helmintlere karşı yanyana kullanımı ile daha etkili sonuçlar alınmakta ve bu amaçla geliştirilmiş süspansiyon şeklinde ticari preparatları bulunmaktadır. Bu iki etkin maddenin farmasötik preparatlardaki analizleri incelendiğinde yanyana tayinleri için sadece bir

spektrofotometrik yöntemle rastlanmıştır [4]. Bu çalışmada, temel bileşen regresyonu (PCR) ve kısmi küçük kareler (PLS) kemometrik yöntemleri kullanılarak, spektrumların örtüşmesi durumunda dahi, ön ayırma olmadan tabletlerde her iki etkenin kantitatif analizi yapılmıştır. Hem PCR, hem PLS için, 25 farklı lineer konsantrasyonda her iki etkenin karışımı simetrik olarak hazırlanıp, bu konsantrasyon dizisinin absorbans değerleri 225-322.3 nm dalga boyu aralığında, $\Delta\lambda = 0.1$ nm ile ayarlanan spektral bölgede ölçülmüştür. Elde edilen absorbans verileri işlenerek PCR ve PLS algoritmaları elde edilmiştir. PCR ve PLS metotlarının validasyonları, bağımsız sentetik karışımlar ve standart ekleme tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemin uygulanabilirliği, ticari tablet numunelerine uygulanarak çalışma tamamlanmıştır.

Bu yöntem diğer kemometrik yöntemlerde de olduğu gibi basit bir cihaz gereksinimi olmasına rağmen karmaşık hesaplamalar içeren ve özel uzmanlık gerektiren bir yöntemdir [4]. Buna karşılık HPLC yöntemleri rutin laboratuvarlarda en yaygın kullanılan enstrümental teknik olması ve mevcut moleküllerin yaklaşık %80 'nine cevap verebilmesi bakımından en çok tercih edilen yöntemlerdir.

Bu iki etkin maddenin farmasötik preparatlarda “HPLC yöntemi ile analizine rastlanmamış olması” nedeniyle bu yüksek lisans tezi kapsamında Levamizol HCl ve Triklabendazolün “yanyana oral süspansiyonlardaki analizi için yeni bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir”.

“Bu HPLC yönteminin geliştirilmesi aşamasında” ilk olarak optimum kromatografik koşullar belirlenmiştir. “Yapılan denemeler sonucunda kromatografik olarak” en iyi ayrılmanın 15 cm uzunluğunda, 4,6 mm iç çapında, 5 µm partikül çaplı Phenomenex Gemini C18 kolon ile hareketli faz olarak 0,05 M fosfat tamponu (pH: 8): asetonitril- (52:48, h/h) karışımı ile 25°C de, 1.5 mL/dak akış hızında elde edildiği görülmüştür. Çalışmada maddeler UV dedeksiyon ile, 247 nm dalgaboyunda çalışılarak takip edilmiştir. Alıkonma zamanları Levamizol HCl için 2,4, triklabendazol için ise 11,2 dakika olarak bulunmuştur.

“Geliştirilen yöntemin validasyonu belirtilen çalışma koşullarında ve parametrelerde yapılmış” ve doğrusal aralık, Levamizol HCl için 60–90 µg/mL, Triklabendazol için 96-144 µg /mL konsantrasyon aralığında elde edilmiştir. Levamizol HCl için R^2 :0,9998, Triklabendazol için ise R^2 :0,9997 olarak hesaplanmıştır. LOD ve LOQ değerleri Sinyal/Gürültü yöntemi ile hesaplanmış ve LOD değerleri Levamizol HCl için 1,6 ng/mL ve Triklabendazol için 17 ng/mL, LOQ değerleri Levamizol HCl için 4,7 ng/mL

ve Triklabendazol için 53 ng/mL olarak bulunmuştur. “Geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirliği için aynı konsantrasyonda altı farklı numune hazırlanmış” ve Levamizol HCl miktar tayini sonuçlarında RSD değeri %0,85, Triklabendazol sonuçlarında ise RSD değeri %0,51 olarak elde edilmiştir. Laboratuvar içi kesinlik çalışmalarında ise iki çalışma arasında ortalama sonuç farkları Levamizol HCl için % 0,60, Triklabendazol için ise %0,70 olarak bulunmuştur. Yöntemin doğruluğunun tespiti için, plasebo üzerine üç farklı konsantrasyonda etken madde ekleyerek geri kazanım çalışması yapılmış ve geri kazanım değerleri Levamizol HCl için % 98,6-99,2 ve triklabendazol için % 98,7-99,3 aralığında bulunmuştur. Stabilitate çalışmalarının sonucunda ise etken maddelerin çözeltisinin 5 °C ‘de 48 saat boyunca çözelti stabilitesini koruduğu gözlemlenmiştir.

Geliştirilen ve valide edilen yöntem veteriner ilaç maddelerinin oral süspansiyon numunelerindeki analizlerine başarıyla uygulanmış ve ardarda altı standart enjeksiyonun %RSD sonuçları Levamizol HCl için %0,13 , Triklabendazol için %0,16, aynı konsantrasyonda altı farklı numune sonuçları ortalaması ise Levamizol HCl için % 100,4 ve Triklabendazol için %99,0 olarak elde edilmiştir. Bu verilere dayanarak Levamizol HCl ve Triklabendazol için bağıl ortalama hata sırası ile %0,4 ve %1’dir.

Özet olarak yapılan bu çalışmanın oral süspansiyon numunesinde Levamizol HCl ve Triklabendazolün yan yana analizi için uygulanması kolay, UV dedeksiyona dayanan, seçici, tekrarlanabilirliği olan, kesin ve güvenilir bir yöntem olduğu görülmüştür. Ayrıca geliştirilen yöntem, hazırlık aşamasının kolaylığı ve analiz süresinin kısalığı sayesinde zamandan tasarruf gibi avantajlara da sahiptir.

Geliştirilen ve validasyonu yapılmış olan bu yöntem ile bu iki ilaç etken maddesi farmasötik preparatlardan yan yana hızlı, hassas, güvenilir ve doğru olarak rahatlıkla tayin edilebilir.

KAYNAKLAR

- [1] İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı, Rx Media Pharma- Baymizol Oral Tablet – Farmakolojik Özellikler /Bayer İlaç Sanayi İlk yayın tarihi: 02.03.2006
- [2] İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı, Rx Media Pharma- Triklacel-K Oral Süspansiyon – Farmakolojik Özellikler /Çelikler İlaç Sanayi Tic. Ltd. Şti. İlk yayın tarihi: 11.12.2009
- [3] İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı, Rx Media Pharma- Levatrizol Oral Tablet – Farmakolojik Özellikler /Deva Holding A.Ş İlk yayın tarihi: 27.07.2005
- [4] Erdal Dinç, Dumitru Baleanu, Gözde Pektaş. Spectrophotometric Simultaneous Determination of Levamisole and Triclabendazole in Tablets by Principal Component Regression and Partial Least Squares Chemometric Methods, VL-59, JO-Revista de Chimie-Bucharest-Original Edition-ER
- [5] Pubchem/Levamisole Hydrochloride
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Levamisole-hydrochloride>
- [6] Wikipedia, the free encyclopedia /Levamisole
(<https://en.wikipedia.org/wiki/Levamisole> , Erişim Tarihi: 04.01.2020)
- [7] Drugbank/Levamisole
(Drugbank, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00848>) , Erişim Tarihi: 04.01.2020)
- [8] Drug Enforcement Administration, Office of Diversion Control Drug & Chemical Evaluation Section, Levamisole (Ergamisol®) April 2013 DEA/OD/ODE
- [9] Dr. Peyami Sari , Jianguo Sun, Majid Razzak& Ian G.Tucker HPLC Assay of Levamisole and Abamectin in Sheep Plasma for Application to Pharmacokinetic Studies, *Journal of Liquid Chromatography&Related Technologies*, Volume 29, 2006-Issue 15 , Pages 2277-2290
- [10] S.Sowjanya and Ch.Devadasu, Development of RP-HPLC Method for the Simultaneous Quantitation of Levamisole and Albendazole: Application to Assay Validation, *International Journal of Analytical Chemistry* Volume 2018, Article ID 5746305, 9 pages <https://doi.org/10.1155/2018/5746305>

- [11] P. Ravisankar ,G. Devala Rao , Development and Validation of RP-HPLC Method For Determination of Levamisole in bulk and dosage form, *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* ,Vol 6, Suppl 3, 2013
- [12] Cholifah, Siti, Kartinasari, Wiwin Farina and Indrayanto, Gunawan (2008) 'Simultaneous HPLC Determination of Levamisole Hydrochloride and Anhydrous Niclosamide in Veterinary Powders, and its Validation', *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 31:2, 281 - 291
- [13] Rattaiah Gupta T, Brahmaiah Bonthagarala, P Venkateswara Rao, G Devala Rao RAO, Development and validation of RP-HPLC method for determination of Levamisole in pure and dosage form, *International Journal of Pharmaceutical Research and Bio-science*, Volume 4(2): 184-190, Accepted Date: 18/03/2015; Published Date: 27/04/2015
- [14] Susan Sadeghi ,Fateme Fathi ,Javad Abbasifar , Potentiometric sensing of levamisole hydrochloride based on molecularly imprinted polymer, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 122, Issue 1, 8 March 2007, Pages 158-164
- [15] Liping Tong, Likun Ding, Yan Li, Zhirui Wang, Jingweng Wang, Yu Liu, Lin Yang, Aidong Wen, A sensitive LC-MS/MS method for determination of levamisole in human plasma: Application to pharmacokinetic study, *Journal of Chromatography B*, Volume 879, Issues 5-6 ,15 February 2011, Pages 299-303
- [16] Drugbank/Triclabendazole
(Drugbank, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB12245>, Erişim Tarihi: 04.01.2020)
- [17] (<https://en.wikipedia.org/wiki/Triclabendazole> , Erişim Tarihi: 05.01.2020)
- [18] Lourdes Mottier, Laura Moreno, Luis Alvarez, Guillermo Virkel, Carlos Lanusse, Measurement of triclabendazole and its metabolites in liver liver flukes:method development and full validation , *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 35, Issue 5, 3 September 2004, Pages 991-999
- [19] Kazue Takeba, Kenji Fujinuma, Miho Sakamoto,Tomoyuki Miyazaki, Hisao Oka, Yuko Itoh, Hiroyuki Nakazawa, Simultaneous determination of triclabendazole and its sulphoxide and sulphone metabolites in bovine milk by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, Volume 882, Issues 1-2, 16 June 2000, Pages 99-107

- [20] M.S. Bull, G.R.E. Shume , Simultaneous determination of fenbendazole, its sulphoxide and sulphone metabolites with the corresponding metabolites of triclabendazole in the plasma of sheep and cattle by high-performance liquid chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 5, Issue 5, 1987, Pages 501-508
- [21] Mohammad Asadi, Shayessteh Dadfarnia, Ali Mohammad Haji Shabani, Simultaneous extraction and determination of albendazole and triclabendazole by a novel syringe to syringe dispersive liquid phase microextraction-solidified floating organic drop combined with high performance liquid chromatography, *Analytica Chimica Acta*, Volume 932, 17 August 2016, Pages 22-28
- [22] Nischal K, Somshekar B, Abhilekha P M, Sharadamma K C, Radhakrishna P M, *Current Pharma Research*, ISSN:2230-7842 ,CPR 1(4), 2011, 306-310
- [23] Maria Neagu, Cristina Ionela Marinescu, Roxana Maria Covaci, Catalina Sorina Macovei, *Medicamentul Veterinar/Veterinary Drug*, Vol. 6 (2) Decembrie 2012
- [24] Alankar Shrivastava, Sunarshi Mukesh Kumar, Anurekha Jain, *Chronicles of Young Scientists*, Vol.2, Issue 2, Apr-Jun 2011 <http://www.cysonline.org>
- [25] Nesrin K.Ramadan, Afaf O.Mohamed, Sara E.Shawky and Maissa Y.Salem, Spectrophotometric determination of triclabendazole by acid-dye complexation method in bulk and pharmaceutical formulation, *Journal of Applied Pharmaceutical Science* , 02 (01);2012: 128-133
- [26] Sawsan A. Abdel Razeq, Asmaa O. El Demerdash and Hoda F.El Sanabary ,HPLC, Densitometric and Visible-Spectrophotometric Determination of Triclabendazole and Ivermectin, *British Journal of Pharmaceutical Research*, ISSN:2231-2919, Vol:13, Issue:6
- [27] Michael W.Dong , *Modern HPLC for Practising Scientist* , Wiley kitabı
- [28] United States Pharmacopoeia 40th ed., 621 Chromatography, USP 40-NF 35:508
- [29] ICH Q2 (R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. 2005 Kasım.Erişim10.11.2015;
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf

- [30] Y.Şanlı, *Veteriner Klinik Toksikoloji*, (2002) Genişletilmiş 2.Baskı, Ankara, Medipres,Güngör Matbaacılık
- [31] M.Faghihi , *Fundamentals of Veterinary Pharmacology* Vol :2 ,One Edition, (2004) Tehran, 230-258
- [32] Y.Şanlı, *Veteriner Farmakoloji Kemoterapi İlaçlar* 1.Baskı (1988), Veteriner Fakültesi Yayınları No:412 Ders kitabı
- [33] Wall,R. Shearer D. *Veterinary Ectoparasites*, Second Edition (2001) 306-317
- [34] T. Bilal , (2013) *Sığır Hastalıkları*, Nobel tıp kitabevleri, İstanbul , (305-309)
- [35] Boray J.C, Crowfoot P.D, Strong M.B, Allison J.R, Schellenbaum M, Von Orelli M and Sarasin G,*Treatment of immature and mature Fasciola hepatica infections in sheep with triclabendazole*, Veterinary Record 113:315-317, (1983)
- [36] Williams J.C and Broussard S.B, *Comparative efficacy of levamisole, thiabendazole and fenbendazole against cattle gastrointestinal nematodes* .Vet.Parasitol.,58:83-90 (1995)
- [37] Calvopina M, Guiderian R.H, Paredes W and Cooper P.J, *Comparison of two single day regiments of triclabendazole for the treatment of human pulmonary paragonimiasis*. Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg., 97: 451-454 (2003)
- [38] Keiser J, Engels D, Büscher G and Utzinger J , *Triclabendazole for the treatment of fascioliasis and paragonimiasis*. Expert.Opin.Investing.Drugs., 14: 1513-1526 (2005)
- [39] Fisher M.A, Jacobs D.E, Hutchinson M.J and Abbott E.M, *Efficacy of fenbendazole and piperazine against developing stages of Toxocara and Toxascaris in dogs*. Vet.Rec., 132:473-475 (1993)

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	ÖZGE	Soyadı	BAĞIRGAN
Doğ.Yeri	ÇORLU	Doğ.Tar.	10.03.1990
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	45442297670
Email	ozge_koyunlu@hotmail.com	Tel	05349268064

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ	2012
Lise	MUSTAFA ELMAS ARICI ANADOLU LİSESİ	2008

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Ar-Ge Analitik Geliştirme Uzmanı	Deva Holding	2014- Halen
2.	Kalite Kontrol Analisti	Kopaş Kozmetik	2012-2014
3.	University of Sheffield	Placement Student-Analytical Chemistry	06.2011-10.2011

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok İyi	İyi	İyi		66,25

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	66,66	67,45	67,74
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office	İyi
Excell	İyi
SAP	Orta

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Seyahat Etmek, Kitap Okumak



LEVAMİZOL HCL VE TRİKLABENDAZOLÜN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİ İLE YAN YANA ANALİZİ

ORIJINALLIK RAPORU

% 19	% 7	% 1	% 17
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 7
2	Submitted to Marmara University Öğrenci Ödevi	% 4
3	Submitted to Ankara University Öğrenci Ödevi	% 1
4	Submitted to Haliç Üniversitesi Öğrenci Ödevi	% 1
5	tez.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	turkish.safestanabolic-steroid.com İnternet Kaynağı	<% 1
7	worldwidescience.org İnternet Kaynağı	<% 1
8	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1

9	Submitted to Aksaray Aniversitesi	<%1
	Öğrenci Ödevi	
10	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080	<%1
	İnternet Kaynağı	
11	tez.sdu.edu.tr	<%1
	İnternet Kaynağı	
12	hdl.handle.net	<%1
	İnternet Kaynağı	
13	www.tandfonline.com	<%1
	İnternet Kaynağı	
14	acikerisim.istanbul.edu.tr	<%1
	İnternet Kaynağı	
15	Submitted to TechKnowledge Turkey	<%1
	Öğrenci Ödevi	
16	Submitted to Karadeniz Teknik University	<%1
	Öğrenci Ödevi	
17	Anna M. Larsson, Jerry Ståhlberg, T. Alwyn Jones. " Preparation and crystallization of selenomethionyl dextranase from expressed in ", Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, 2002	<%1
	Yayın	
18	Submitted to Anadolu University	<%1
	Öğrenci Ödevi	

19

earsiv.atauni.edu.tr

İnternet Kaynağı

<% 1

20

content.lms.sabis.sakarya.edu.tr

İnternet Kaynağı

<% 1

21

www.drugbank.ca

İnternet Kaynağı

<% 1

22

tr.wikipedia.org

İnternet Kaynağı

<% 1

23

www.narsanat.com

İnternet Kaynağı

<% 1

24

[Submitted to Saglik Bilimleri Universitesi](#)

Öğrenci Ödevi

<% 1

25

pt.scribd.com

İnternet Kaynağı

<% 1

26

entomoloji.ege.edu.tr

İnternet Kaynağı

<% 1

27

mipdatabase.com

İnternet Kaynağı

<% 1

28

scholar.lib.vt.edu

İnternet Kaynağı

<% 1

29

[Submitted to Okan Üniversitesi](#)

Öğrenci Ödevi

<% 1

30

dergipark.gov.tr

İnternet Kaynağı

<% 1

31

Submitted to Eskisehir Osmangazi University

Öğrenci Ödevi

<% 1

32

Submitted to Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Öğrenci Ödevi

<% 1

33

www.japsonline.com

İnternet Kaynağı

<% 1

34

repozitorij.fkit.unizg.hr

İnternet Kaynağı

<% 1

35

Submitted to Canakkale Onsekiz Mart University

Öğrenci Ödevi

<% 1

36

BAŞ, Erhan, ÖZDEMİR, Serap, GÖKHAN
ÇAĞLAYAN, Mehmet and MURAT, İsmail.

"Sefdinir ve Sefiksim'in Farmasötik

Preparatlarda Birinci Türev Spektrofotometrik

Tayini", Türk Eczacılar Birliği, 2013.

Yayın

<% 1

37

www.proz.com

İnternet Kaynağı

<% 1

38

www.thefreelibrary.com

İnternet Kaynağı

<% 1

39

Submitted to Mersin Üniversitesi

Öğrenci Ödevi

<% 1

Alıntıları çıkart

üzerinde

Eşleştirmeleri çıkar

< 5 words

Bibliyografyayı Çıkart

üzerinde

