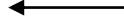


Adınızı soyadınızı giriniz



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)

**TİNİDAZOL VE LİDOKAİNİN YÜKSEK
PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİ
İLE YANYANA ANALİZLERİ**

DERYA GÖNÜLLÜ AYHAN

**DANIŞMAN
PROF. DR. SERAP SAĞLIK ASLAN**

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI**YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programında Yüksek Lisans öğrencisi Derya GÖNÜLLÜ AYHAN tarafından Prof. Dr. Serap SAĞLIK ASLAN 'nın danışmanlığında hazırlanan "Tinidazol ve Lidokainin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi ile Yanyana Analizleri" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 08/07/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri-Danışman

Prof. Dr. Serap SAĞLIK ASLAN
İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Analitik Kimya Anabilim Dalı

**Jüri**

Prof. Dr. Durişehvar ÜNAL
İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Analitik Kimya Anabilim Dalı

**Jüri**

Dr. Öğr. Üyesi Ayşen ÇİÇÜ
Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Analitik Kimya Anabilim Dalı



BEYAN

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 çalışmasıyla 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 olmadığını beyan ederim.

Derya GÖNÜLLÜ AYHAN



İTHAF

Eşime ve aileme ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamın yapılmasına olanak sağlayan ve çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren değerli danışman hocam Prof. Dr. Serap SAĞLIK ASLAN'a;

Desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen sevgili eşime, Cem SARIOĞLU'na, Gamze DEMİRCAN'a ve Gülay YELKEN DEMİREL'e, Anabilim Dalımız Öğretim Üyelerine ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	Xİİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tinidazol.....	3
2.1.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikler	3
2.1.2. Farmakolojik Özellikler	4
2.1.2.1. Farmakodinamik Özellikler	4
2.1.2.2. Farmakokinetik Özellikler	4
2.1.3. Analiz Yöntemleri.....	5
2.1.3.1. HPLC Analiz Yöntemleri	5
2.1.3.2. Diğer Yöntemler ile Analizler	7
2.2. Lidokain Hidroklörür.....	7
2.2.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikler	7
2.2.2. Farmakolojik Özellikler	8
2.2.2.1. Farmakodinamik Özellikleri	8
2.2.2.2. Farmakokinetik Özellikleri	9
2.2.3. Analiz Yöntemleri.....	9
2.2.3.1. HPLC Analiz Yöntemleri	9
2.2.3.2. Diğer Yöntemler ile Analizleri	11
2.3. Sıvı Kromatografisi Sistemleri	11
2.3.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	11
2.4. Sistem Uygunluk Testi	13

2.5. Validasyon Parametreleri	14
2.5.1. Spesifiklik(Seçicilik).....	14
2.5.2. Doğrusallık.....	14
2.5.3. Doğruluk	14
2.5.4. Kesinlik	15
2.5.5. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ).....	15
2.5.6. Sağlamlık	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
3.1. Çalışmadaki Çözücüler, Çözeltiler ve Kimyasal Maddeler	17
3.1.1. Çözücüler ve Kimyasal Maddeler.....	17
3.1.2. Çözeltiler ve Hazırlıkları.....	17
3.1.3. Hareketli Faz Çözeltisi.....	17
3.1.3.1. Çözücü	17
3.1.3.2. Tinidazol Çözeltileri:	18
3.1.3.3. Lidokain Çözeltileri	18
3.2. Çalışmada kullanılan Gereçler	19
3.3. Analizin Yapılması.....	22
3.4. Tinidazol ve Lidokain için Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Metot Geliştirme	23
3.4.1. Dedektör için Dalga Boyunun Belirlenmesi	23
3.4.2. Hareketli Fazın Belirlenmesi.....	23
3.4.3. Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması	24
3.5. Yöntemin Validasyonu.....	24
3.5.1. Spesifiklik(Seçicilik).....	24
3.5.2. Doğrusallık.....	24
3.5.3. Doğruluk	25
3.5.4. Kesinlik	25
3.5.5. Tayin Sınırı (LOQ) ve Teşhis Sınırı (LOD).....	25
3.5.6. Yöntemin Sağlamlığı	25
3.6. Ovüllerde Tinidazol ve Lidokain'in Tayini.....	25
3.6.1. Ovüllerin ve Ovül Çözeltilerinin Hazırlığı	25
4. BULGULAR.....	27

4.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi yöntemi ile yapılan Tinidazol ve Lidokainin Yanyana Analizlerinin Sonuçları	27
4.1.1. Kromatografik Koşulların Tespit Edilmesi.....	27
4.2. Yöntem Validasyonu Sonuçları.....	31
4.2.1. Seçicilik Parametresi için Değerlendirme	31
4.2.2. Doğrusallık Parametresi için Değerlendirme	32
4.2.3. Doğruluk Parametresi için Değerlendirme.....	36
4.2.4. Kesinlik Parametresi için Değerlendirme	37
4.2.5. Tayin (LOQ) ve Teşhis (LOD) Sınırları Parametresi için Değerlendirme	39
4.2.6. Yöntemin Sağlamlığı için Değerlendirme	39
5. TARTIŞMA	46
KAYNAKLAR	49
HAM VERİLER	55
FORMLAR	56
ETİK KURUL KARARI	57
PATENT HAKKI İZNİ	58
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	59
ÖZGEÇMİŞ	61

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: FDA kılavuzundaki sistem uygunluk testi kabul kriterleri	14
Tablo 3-1: Tinidazol kalibrasyon standart çözeltilerinin hazırlığı.....	18
Tablo 3-2: Lidokain kalibrasyon standart çözeltilerinin hazırlığı.....	19
Tablo 3-3: Çalışmada kullanılan Ekipmanlar.....	20
Tablo 3-4: Çalışmada kullanılan Destekleyici Ekipmanlar	21
Tablo 3-5: Çalışmada kullanılan Cam Malzemeler	22
Tablo4-1:Hareketli faz pH değerinin kapasite faktörü üzerine etkisi.....	29
Tablo4-2: I. Gradyent denemesine ait zaman ve hareketli faz yüzdesi değişimi programı.....	29
Tablo4-3: II. Gradyent denemesine ait zaman ve hareketli faz yüzdesi değişimi programı.....	30
Tablo4-4: III. Gradyent denemesine ait zaman ve hareketli faz yüzdesi değişimi programı.....	30
Tablo4-5: Denemeleri yapılan gradiyent çalışmalarında her pike ait ayırım faktörününvekuyruklanma faktörünün değişimi.....	30
Tablo 4-6: Tinidazol'un doğrusallık sonuçları.....	34
Tablo 4-7: Lidokain'in doğrusallık sonuçları	35
Tablo 4-8: Tinidazol için Geri Kazanım Sonuçları	36
Tablo 4-9: Lidokain için Geri Kazanım Sonuçları	37
Tablo 4-10: Tinidazol ve Lidokaine ait Sistem Kesinliği Sonuçları	38
Tablo 4-11: Tinidazol/Lidokain 300mg/100mg Ovül için Tekrarlanabilirlik Sonuçları.....	39
Tablo 4-12: Akış Hızı değişikliğinde sistem uygunluk parametrelerindeki değişimler	40
Tablo 4-13: Kolon Sıcaklığı değişikliğinde sistem uygunluk parametrelerindeki değişimler.....	40

Tablo 4-14: Hareketli faz tamponunun pH değışimi ile elde edilen sonuçlar.....	41
Tablo 4-15: Hareketli faz tampon konsantrasyonun değışimi ile elde edilen sonuçlar.....	41
Tablo 4-16: Kolon marka değışimi ile elde edilen sonuçlar.....	41
Tablo 4-17: Filtre değışimi ile elde edilen sonuçlar (Standart).....	42
Tablo 4-18: Filtre değışimi ile elde edilen sonuçlar (Ovül Numunesi).....	43
Tablo 4-19: + 4C °’deki Tinidazol ve Lidokain çözeltilerine ait çözelti stabilitesi sonuçlar.....	44
Tablo 4-20: : Oda sıcaklığındaki Tinidazol ve Lidokain çözeltilerine ait çözelti stabilitesi sonuçları.....	44

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1 Tinidazol'un kimyasal formülü	3
Şekil 2-2 200-800 nm dalgaboyunda 150 µg/mL konsantrasyonda Tinidazol'un asetonitril:su (30:70) çözücüsünde UV spektrumu.....	3
Şekil 2-3 Lidokain Hidroklorür'ün kimyasal formülü.....	7
Şekil 0-4 200-800 nm dalgaboyunda 50 µg/mL konsantrasyonda Lidokain'in asetonitril:su (30:70) çözücüsünde UV spektrumu.....	8
Şekil 0-5: İki bileşenden oluşan numuneye ait kromatogram.....	12
Şekil 2-6: HPLC sistemi	13
Şekil 0-1: C ₁₈ (125mm x 4.6mm, 5µ) Thermo Hypersil BDS HPLC kolonu ile elde edilen kromatogram.....	27
Şekil 0-2: C ₁₈ (125mm x 4.6mm, 5µ) Thermo Hypersil BDS HPLC kolonu ile elde edilen lidokainspektrumu.....	28
Şekil 0-3: C ₁₈ (125mm x 4.6mm, 5µ) Thermo Hypersil BDS HPLC kolonu ile elde edilen tinidazol spektrum.....	28
Şekil 0-4: C ₁₈ (250mm x 4.6mm, 5µ) Waters Symmetry HPLC kolonu ile elde edilen kromatogram.....	28
Şekil 4-5: Hareketli faz kromatogramı.....	31
Şekil 4-6: Metanol kromatogramı	32
Şekil 4-7: Plasebo çözeltisi kromatogramı.....	32
Şekil4-8: Tinidazol pik saflığı spektrumu.....	32
Şekil 4-9:Lidokain pik saflığı spektrumu.....	33
Şekil4-10:Tinidazolun 75-195 µg/mL konsantrasyonundaki ölçü eğrisi.....	33
Şekil4-11:Lidokainin 25-65 µg/mL konsantrasyonundaki ölçü eğrisi	34

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

HPTLC : Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi

UHPLC: Ultra Hızlı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

UPLC: Ultra Hızlı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

RP-HPLC: Ters Faz Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

DAD: DiyotSerili Dedektörü

UV: Ultraviyole

USP: Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi

EP: Avrupa Farmakopesi

FDA: Food and Drug Administration, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi

LOD : Teşhis Sınırı

LOQ: Tayin sınırı

MS : Kütle Spektrometrisi

ICH: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı

PDA: FotoDiyotSerili Dedektörü

MS/MS: Tandem Kütle Spektrometrisi

SD: Standart Sapma

RSD: Bağlı Standart Sapma

S/N : Sinyal/ Gürültü Oranı

mg: Miligram

µg: Mikrogram

mL: Mililitre

kg:Kilogram

l:Litre

ÖZET

Gönüllü Ayhan, D. (2019). Tinidazol ve Lidokainin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi ile Yanyana Analizleri. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Tinidazol protozoalara ve anaerobik bakterilere karşı sahip olduğu etki mekanizması ile *Trichomonas vaginalis*, *Giardia lamblia* ve *Entamoeba histolytica* ile anaerobik bakteriler ve *Gardnerella vaginalis*'in çoğunda etkili olmaktadır. Lidokain tedavi boyunca sinir iletimini nöron membranını stabilize ederek bloke eder ve lokal anestetik etki ile yanma ve kaşıntı hissiyatını azaltır. Tinidazol ve Lidokain etken maddelerini içeren farmasötik preparatlar; bayanlarda bakteriyel vajinozis ve trikomoniasis (trikomonas vajiniti) tedavisi üzerine etkilidir.

Bu tez çalışmasında, tinidazolun ve lidokainin ovül dozaj formunda yeni, basit ve spesifik olacak şekilde yanyana analizi için ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanılmıştır. Bu şekilde yöntem geliştirilip valide edilmiştir. Geliştirilen bu yöntem ile C18 (250x4,6mm,5µm) ters faz silika HPLC kolonu, hareketli faz olarak 10mM potasyum fosfat tampon(pH: 3.0), asetonitril gradiyent elüsyonu kullanılarak, 1.0 mL/dk akış hızında çalışma yapılmıştır. Kolon sıcaklığı ve numune bölme(oto örnekleyici) sıcaklığı 25C° olarak belirlenmiştir. İki etken maddenin birbirinden ayrılması 220 nm dalga boyunda sağlanmıştır. Alıkonma zamanları lidokain için 6.5 dakika tinidazol için 8.2 dakikadır. Yöntemde fotodiyot array dedektör kullanılarak, herbir preparatın saflığı değerlendirilmiştir. Maddelerin doğrusallık aralıkları Tinidazol için 75-195 µg/mL ve Lidokain için 25-65 µg/mL şeklinde tayin edilmiştir. Gözlemlenebilirlik(LOD) ve tayin sınırları(LOQ) ise sırası ile; Tinidazol için 0.05625 µg/mL ve 0.225 µg/mL, Lidokain için 0.01875 µg/mL ve 0.075 µg/mL olarak bulunmuştur. Tinidazol ile lidokainin yanyana analizlerinde basit, duyarlı ve tekrarlanabilir olacak şekilde yöntem geliştirilerek başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

Anahtar Kelimeler : Tinidazol, Lidokain, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi, Validasyon, Ovül analizleri.

ABSTRACT

Gönüllü Ayhan, D. (2019). Simultaneous Determination of Tinidazole and Lidocaine by High-Performance Liquid Chromatographic Method. İstanbul University, Institute of Health Sciences, Department of Analytical Chemistry. Master Thesis. İstanbul.

Tinidazole is effective in most of the anaerobic bacteria and *Gardnerella vaginalis* with *Trichomonas vaginalis*, *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* with its mechanism of action against protozoa and anaerobic bacteria. Lidocaine stabilizes the neuron membrane during therapy and blocks nerve conduction and reduces the sensation of burning and itching by acting as a local anesthetic. The pharmaceutical preparation consisting the active agents Tinidazole and Lidocaine; It is effective on the treatment of bacterial vaginosis and trichomoniasis (*trichomonas vaginitis*) in the vagina.

A selective, simple and new reversed phase high performance liquid chromatographic method was developed and validated for determination of tinidazole and lidocaine simultaneously in the ovule dosage form for this study. Developed method was performed with gradient elution by getting C₁₈ (250x4.6mm,5µm) reversed phase HPLC column, mobile phase containing 10mM potassium phosphate buffer(pH3.0), acetonitrile at 1.0 mL/min. Temperature for column and autosampler were adjusted at 25C°. The chromatographic separation was done at 220 nm wavelength. Retention times were found as 6.5 min for lidocaine and 8.2 min. for tinidazole. The purity of each preparation was evaluated getting a photodiode array detector. The linearity ranges were 75-195 µg/mL for tinidazole and 25-65 µg/mL for Lidocaine. The limit of detection(LOD) and the limit of quantitation (LOQ) results were 0.05625 µg/mL and 0.225 µg/mL for Tinidazole, 0.01875 µg/mL ve 0.075 µg/mL for Lidocaine. The simple, sensitive and reproducible method was developed and performed for tinidazole and lidocaine simultaneous analysis successfully.

Keywords: Tinidazole, Lidocaine, High Performance Liquid Chromatography, Validation, Ovule analysis.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Normal vajen florasında çok sayıda fakültatif , aerob ve anaerob bakteri türü yaşamaktadır. *Laktobasillus sp.* ise baskın olan immun sistemi modülatörleri ile normal vajen florasının devamlılığını sağlar. Fakat, sebebi açıklanamayan nedenlerle *Laktobasillus* türlerinin konsantrasyonlarında azalma ilk olarak anaerob bakteriler olmak üzere diğer vajen flora üyelerinin aşırı çoğalmasına sebep olur. Bu bakteriler ürettikleri çeşitli enzimler ile vajinal peptidleri akıntının ve kötü kokunun nedeni olarak amin türevlerine dönüştürür. Bu durum Bakteriyel Vazinozis olarak tanımlanmaktadır[1].

Bakteriyel vajinozis, anormal vajinal akıntının en sık nedenlerinden biri olarak değerlendirilir. Farklı çalışmalarda bu hastalığın sıklığı %4-64 arasında verilmiştir. Cinsel yolla bulaşan hastalıklarda risk oluşturan gruplarda sıklık %40-50'ye ulaşabilmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda gebeler için %10-30, jinekoloji bölümündeki hastalar için %25 seviyesinde bulunmuştur. ABD'de yıllık 3 milyon semptomatik bakteriyel vajinozis olgusu ve buna ilave olarak da üç milyon asemptomatik olgunun olduğu tahmin edilmektedir[2].

Bakteriyel vajinozis ciddi üst genital yol enfeksiyonlarına zemin hazırladığı için önemli bir sendromdur. Bakteriyel vajinozisli kadınlarda *Gardnerella* ve bazı zorunlu anaeroplara (özellikle *Bacteroides species*, *Mobiluncus*, *Peptostreptococcus species*) anlamlı olarak artış göstermiştir. Bu organizmanın postpartum bakteriyemi, pelvik inflamatuvar, endometrit hastalık, erken membran rüptürü, erken doğum eylemi, koriyoamniyonitis, vajinal abselerle ve potoperatif enfeksiyonlar ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. *Gardnerella vaginalis* ek olarak doğum ve düşük sonrası endometritlerden de izole edilmiştir[2].

Trichomonas vaginalis, trikomoniazis hastalığının etkeni olup, özellikle kadınlarda sıklıkla görülen, cinsel yolla bulaşan ve asemptomatik olabilen, vajinit ve servisit yol açan oldukça önemli bir protozoan olup en sık görülen viral olmayan vajinit etkenidir. Özellikle cinsel aktif çağıdaki erkekleri ve kadınları etkilemekte ve her yıl 180 milyon olgunun görüldüğü bildirilmektedir. Trikomoniazis cinsel yolla

bulaşan bir enfeksiyon olduğu gibi pelvik enflamatuvar hastalığa, hamilelikte ise erken membran rüptürüne, erken doğuma ve düşük doğum ağırlıklı bebeğe sebep olabilmekte, son yıllarda ise HIV geçişini iki kat daha fazla oranda kolaylaştırmaktadır[3].

Gelişmekte olan ülkeler için daha fazla görülmekte olup ülkemizde de değişik gruplarda yapılan çalışmalardaki sonuçlar olgulara ve kullanılan yöntemlere bağlı olarak sıklığı %3-72,3 arasında değişik oranlarda saptandığı bildirilmektedir[3].

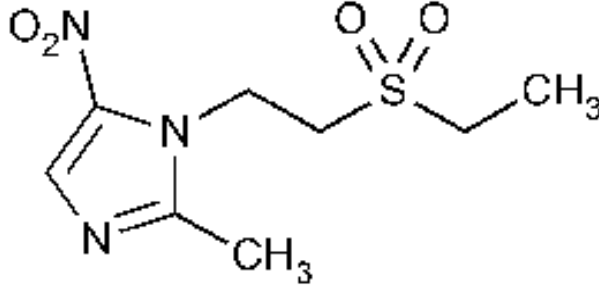
Piyasada bulunan tiokonazol, tinidazol ve lidokain üçlü kombinasyonunun; kandida vajinit, bakteriyel vajinozis ve trikomoniasis rahatsızlıkları üzerinde tedavi edici özelliği varken Tinidazol ve Lidokain ikili kombinasyonunun bakteriyel vajinozis ve trikomoniasis rahatsızlıkları üzerinde tedavi edici özelliği olacağı öngörülmektedir. Eğer hastanın kandida vajinit rahatsızlığı yoksa ikili kombinasyondaki ürün kullanımı ile vücuduna fazladan etkin madde alımı ortadan kaldırılmış olup, sadece bakteriyel vajinozis ve trikomoniasis rahatsızlıkları için spesifik bir tedavi uygulanmış olacaktır.

Öngörülen tinidazol ve lidokainin kombinasyonuna ilişkin analizler incelendiğinde literatürde bu iki etken maddenin yanyana analiz yönteminin bulunmadığı tespit edilmiştir. Her iki etken maddeye ait ayrı ayrı veya başka etken maddeler ile yan yana analizlerine ait literatürde; ince tabaka kromatografisi[4], miseller sıvı kromatografisi[5], yüksek performanslı sıvı kromatografisi[6], gaz kromatografisi-kütle spektrometresi[7] ve sıvı kromatografisi[8] gibi çeşitli yöntemlere rastlanmıştır. Bu yöntemler de göz önünde bulundurularak tinidazol ve lidokainin yanyana analizlerinde kullanılmak üzere literatürde ilk olacak yeni bir analitik yöntemin geliştirilmesi ve valide edilmesi amaçlanmıştır. Yöntemin ilaç sanayide rutin analizlerde kullanılacağı da göz önünde bulundurularak spesifik, basit, güvenilir, ekonomik, kesin, doğru ve UV dedeksiyona ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi esasına göre bir yöntem geliştirilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

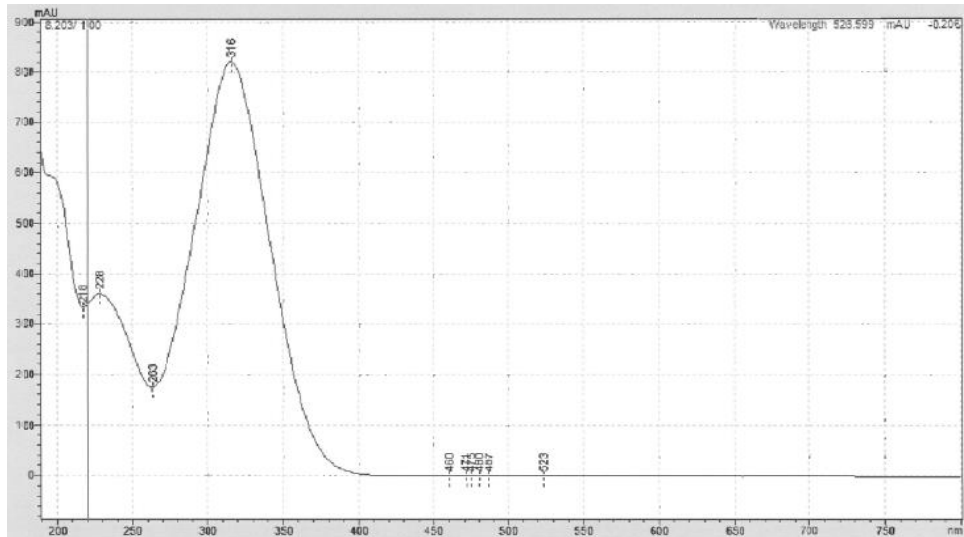
2.1. Tinidazol

2.1.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikler



Şekil 2-1 Tinidazol'un kimyasal formülü

Tinidazol'un kimyasal adı 1-[2-(Etilsülfonil)etil]-2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol ve kapalı formülü $C_8H_{13}N_3O_4S$ şeklindedir. Molekül ağırlığı, 247.3 g/mol olan beyaza yakın ya da açık sarı kristal bir toz olan Tinidazol pratik olarak suda çözünmez, asetonda ve metilen klorür içinde çözünür, az miktarda metanol içinde çözünür. Erime derecesi $125\text{ }^{\circ}\text{C} - 128\text{ }^{\circ}\text{C}$ aralığındadır[9]. Şekil 2-2'de maddeye ait asetonitril:su (30:70) çözücüsündeki UV spektrumu verilmiştir.



Şekil 2-2 200-800 nm dalgaboyunda 150 µg/mL konsantrasyonda Tinidazol'un asetonitril:su (30:70) çözücüsünde UV spektrumu

2.1.2. Farmakolojik Özellikler

2.1.2.1. Farmakodinamik Özellikler

Tinidazolun anaerobik bakterilere ve protozoalara karşı etkisi ilacın mikroorganizma hücresi içerisine penetrasyonu ve DNA iplikçiklerine zarar vermesi ya da sentezinin engellenmesi yoluyla olmaktadır. Tinidazol protozoa ve aynı zamanda zorunlu anaerobik bakterilere karşı etki göstermektedir[10,11]. Antiprotozoal aktivitesi *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica* ve *Giardia lamblia* 'yı kapsamaktadır. Tinidazol bakteriyel vajinoz tedavisi ile *Gardnerella vaginalis* 'e ve anaerob bakterilerin büyük kısmında (*Bacteroides fragilis*, *Bacteroides melaninogenicus*, *Bacteroides spp.*, *Clostridium spp.*, *Eubacterium spp.*, *Peptostreptococcus spp.* ile *Veillonella spp.*) etki göstermektedir. Tinidazolun etki mekanizması halen net bir şekilde açıklanmamıştır. Ferrodoksin sistemi ve sadece anaerobik bakterilerce oluşan düşük oksidasyon redüksiyon potansiyeli ve nitro grubunun redüksiyonuna vasıtalık eder. Bu sebeple, tinidazol her iki çeşit mikroorganizmanın da hücre membranlarına penetre olabilmesine karşın anaeroblar aeroblardan daha çok seviyede tinidazol alabilmektedir. Redüksiyon, reaktif ara ürünlerin ve tinidazolun alımını yükselten difüzyon artışını oluşturmaktadır[11].

2.1.2.2. Farmakokinetik Özellikler

Emilim: Tinidazol, substitue imidazol bileşiklerinin antiprotozoal ve antianaerobik aktiviteye sahip olan bir türevidir. Tinidazol intravajinal uygulama için aşağı yukarı %10 seviyesinde emilim sağlar. 6 sağlıklı gönüllüde 500 mg tinidazol ihtiva eden vajinal ovül uygulama sonrasında maksimum plazma konsantrasyonu ortalama olarak 1.0 µg/ml, maksimum plazma konsantrasyonuna gelinceye kadar geçen zaman (t_{max}) ortalama olarak 8.7 saat olarak tespit edilmiştir. Oral alımdan sonra hızlıca ve tam absorbe edilmektedir. Sağlıklı gönüllülerde, oral tek doz 2 g alımından 2 saat sonra, doruk plazma konsantrasyonları 40-51 µg/mL aralığında değişiklik göstermektedir. Sonuçlar ise , 24 saat geçmesinin akabinde, 11-19 µg/mL olarak elde edilmiştir[10,11,12].

Dağılım: Tinidazol vücut dokularında geniş bir şekilde dağılıp tüm dokularda kan-beyin bariyerini de geçerek etkili konsantrasyonlara ulaşır. Görünür dağılım hacmi

ise takriben 50 lt.olarak belirlenmiştir. Plazmadaki tinidazolun yaklaşık %12'si plazma proteinlerine bağlı bulunmaktadır[10].

Biyotransformasyon: Tinidazol kısmen konjugasyon, oksidasyon ve hidroksilasyon vasıtasıyla metabolize olur. Tinidazol temelde CYP3A4 aracılığıyla biyotransformasyona tabi olur[11].

Eliminasyon: Tinidazol böbreklerden ve karaciğerden atılmaktadır. Sağlıklı gönüllülerdeki çalışmalar, kullanılan dozun %60-65'inin 5 gün içerisinde böbreklerden dışarı atıldığını ve kullanılan dozun %20-25'inin değişime uğramamış tinidazol olduğunu göstermektedir. Dozun takriben %12'si dışkı vasıtasıyla itrah edilmektedir[10].

2.1.3. Analiz Yöntemleri

2.1.3.1. HPLC Analiz Yöntemleri

Wu L. ile arkadaşları Sıçan plazmasında tinidazol, diklonin ve klorheksidinin eş zamanlı tayini için bir HPLC / MS / MS yönteminin geliştirilmesi ve bunun bir film oluşturuucu çözeltinin farmakokinetik araştırmalarında uygulanması için çalışma gerçekleştirmişlerdir. Plazma örnekleri katı faz ekstraksiyonu ile ön işleme tabi tutulmuşlardır. Analitler, elektrosprey pozitif iyonizasyonu ve çoklu reaksiyon izleme modu ile tandem kütle spektrometrisi ile belirlenmiştir. Bu analiz için Phenomenex Gemini C₁₈ (50mmx2.0mm, 5µm) kolon ve metanol-amonyum format(10mM)-formik asit (56:44:0.2,h/h/h) (pH3.5) karışımdan oluşan mobil faz kullanılmış, akış hızı 0.2mL/dk. şeklinde verilmiştir. Metodun doğrusallık aralığı 2-1000 ng/mL olarak tayin edilmiştir[13] .

Wang Y. ve arkadaşları HPLC ile İnsan tükürüğünde eş zamanlı metronidazol, tinidazol, ornidazol ve morinidazo miktar tayini çalışmasını yapmışlardır. Analizi ters faz sıvı kromatografisi ve UV dedeksiyon kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Tükürük numuneleri (100 µl) ilk önce metanol (400 µl) ile çöktürülür, ardından santrifüj edilir ve üst faz doğrudan HPLC sistemine enjekte edilir. Çalışmada C₁₈ kolon ile potasyum dihidrojen fosfat tamponu, asetonitril ve metanol(55:15:30,h/h/h) karışımından oluşan hareketli faz kullanılmış , akış hızı 1.0 ml/dk. şeklinde verilmiştir. Dalga boyu 318 nm'dir. Metodun doğrusallık aralığı 25.2-5040.0, 23.9-4790.0, 25.4-5080.0, 25.0-5000.0 ng/mL olarak tayin edilmiştir[14].

Alton K.B. ve arkadaşları HPLC yöntemi ile İnsan plazmasında Antiprotozoal Ajan Tinidazol tayinini yapmışlardır. Basit bir ekstraksiyon işleminden sonra ters faz sıvı kromatografisi ve UV dedektör ile analizi gerçekleştirmişlerdir. Metodun doğrusallık aralığı 0.20-20.0 µg/mL olarak tayin edilmiştir[15].

Hackett L.P. ve arkadaşları insan plazmasında HPLC tekniğini kullanarak tinidazol ve metronidazol tayini yapmışlardır. Analizi sıvı kromatografisi ve UV dedeksiyonu kullanarak 320nm dalga boyunda yapmışlardır. Çalışmada C₁₈(30cmx400mm) kolon ve pH 4.0 20 ml asetat tamponunda %7 asetonitril hareketli fazı kullanılmış, akış hızı metronidazol için 1.5 mL/dk ve tinidazol için 2.0 mL/dk olarak ayarlanmıştır[16].

Yin Z. ve arkadaşları ters faz sıvı kromatografisi ile losyon bileşimlerinde matrine ve tinidazol'un yanyana analizini UV dedeksiyon ile yapmışlardır. Bu analiz için C₁₈(200mmx4.6mm,5µm) kolon ve 0.025 mol/L potasyum dihidrojen fosfat (%0.05 trietilamin içeren) ve asetonitrilin (80:20, h/h) karışımından oluşan hareketli faz kullanılmış, kolon sıcaklığı 25C° ve akış hızı 1.0mL/dk. şeklinde verilmiştir. Matrine için dalga boyu 210nm ve tinidazol için 310nm olarak ayarlanmıştır. Metodun doğrusal aralığı matrine için 10.0- 100.0 µg/mL ve tinidazol için 20.0-200.0 µg/mL olarak tayin edilmiştir[17].

Belal F. ve arkadaşları misel HPLC ve türev spektrofotometrik yöntemler ile ilaçlarda ve biyolojik sıvılarda flukonazol ve tinidazolun eş zamanlı tayinini yapmışlardır. Bu analiz için UV spektrofotometresinde türevlendirme yapıldıktan sonra 210 nm dalga boyunda C₁₈(250x4.6mm) kolon kullanılarak pH5.5'te 0.02M ortofosforik asit içerisinde 0.15M sodyum dodesil sülfat, %0.3 trietilamin ve %12 n-propanol içeren hareketli faz ile 1mL/dk. akış hızında çalışılmıştır. Metodun doğrusallık aralığı flukonazol ve tinidazol için 1.5-30.0 ve 10.0-200.0µg/mL[18].

Meshram D.B. ve arkadaşları Flukonazolun ve tinidazolun tablet dozaj formlarında eş zamanlı tayini için HPLC yöntemi ile çalışmışlardır. Bu analiz için C₁₈ kolon kullanılmış ve 0.05M potasyum dihidrojen fosfat tamponu(pH3.25) ve asetonitril(82:18,h/h) karışımından oluşan hareketli faz ile 210 nm dalga boyunda akış hızı 1.5mL/dk. olarak ayarlanmıştır. Metodun doğrusal aralığı flukonazol için 6-14µg/mL ve tinidazol için 80-190µg/mL olarak tayin edilmiştir[19].

Rajnarayana K. ve arkadaşları sıvı kromatografisi yöntemi ile insan serumunda tinidazolun belirlenmesi ve farmakokinetik bir çalışmada uygulanması için çalışma yapmışlardır. Çalışmada C₁₈ kolon ile mobil faz olarak 0.002M fosfat tamponu, metanol ve asetonitril(85:7.5:7.5,h/h/h) karışımı kullanılmıştır. Dalga boyu 320nm'dir[20].

2.1.3.2. Diğer Yöntemler ile Analizler

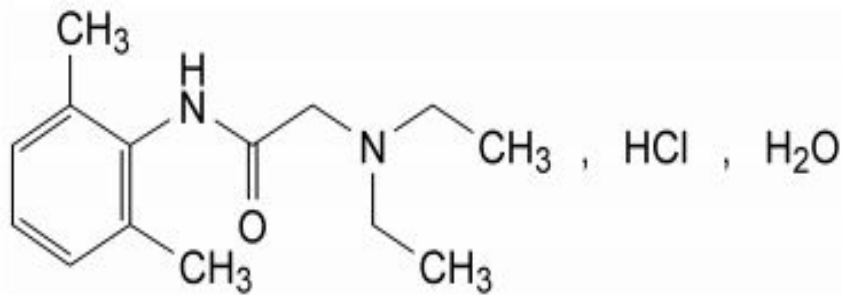
Alnajjar A. ve arkadaşları kapiler elektroforez yöntemi ile çok cevaplı optimizasyonlu ilaçlarda norfloksasin ve tinidazol tayinini yapmışlardır. Bu analiz için pH2.5'te 32.5mmol/L fosfat elektrot kullanılarak 8.0 dakika enjeksiyon zamanında, 25kV ve 25C ° kolon sıcaklığında 301nm dalgaboyunda çalışılmıştır[21].

López-Martínez L. ve arkadaşları Tinidazolun basit spektrofotometrik yöntem ile formülasyonda ve serumda tayinini gerçekleştirmişlerdir. Bu yöntem, tinidazolun 0.1 N sodyum hidroksit içindeki alkalın hidrolizi sırasında bathokromik kayması ile elde edilen 368 nm dalgaboyunda sinyalin absorbansının ölçümüne dayanmaktadır. Metodun doğrusal aralığı 1-30µg/mL'dir[22].

Slamnik M. Polarografik yöntem ile tabletlerde tinidazol tayini gerçekleştirmiştir. Madde numuneden su ile ekstrakte edilmiş ve pH 6.8 Britton – Robinson tamponu solüsyona eklenerek, doymuş calomel elektroduna karşı damlayan civa elektrodunda polarograplanarak analiz edilmiştir[23].

2.2. Lidokain Hidroklorür

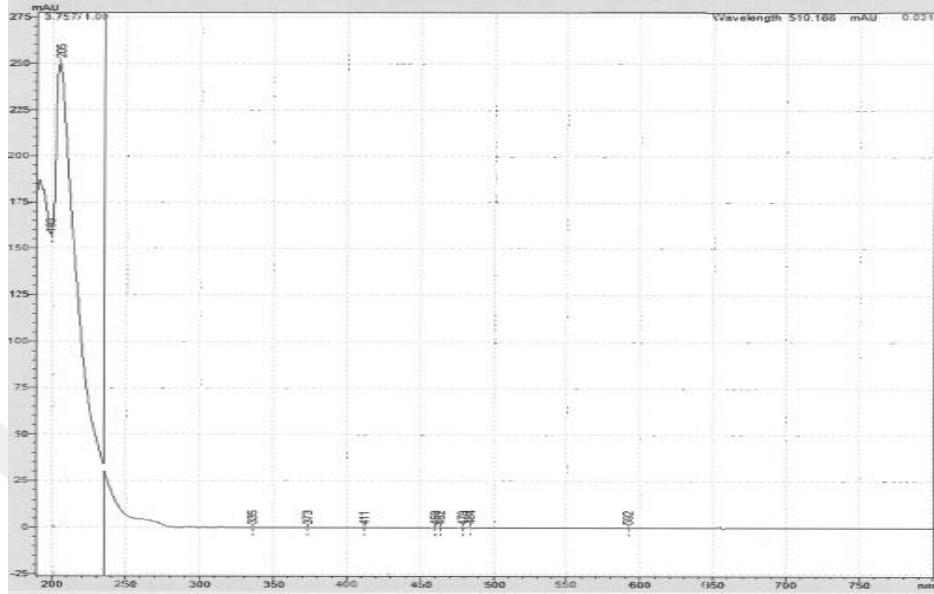
2.2.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikler



Şekil 2-3 Lidokain Hidroklorür'ün kimyasal formülü

Lidokain hidroklorür'ün kimyasal adı 2-(Dietilamino)-N-(2,6-dimetilfenil) asetamid hidroklorid monohidrat olup kapalı formülü C₁₄H₂₃ClN₂O.H₂O'dur. Molekül ağırlığı, 288.8 g/mol olup beyaz ya da beyaza yakın kristal toz olan Lidokian HCl su

içerisinde çok çözünür, %96 etanolde serbestçe çözünür. Erime derecesi 74C°-79 C° arasındadır[24]. Şekil 2-4'de maddeye ait asetonitril:su (30:70) çözücüsündeki UV spektrumu verilmiştir.



Şekil 2-4 200-800 nm dalgaboyunda 50 µg/mL konsantrasyonda Lidokain'in asetonitril:su (30:70) çözücüsünde UV spektrumu

2.2.2. Farmakolojik Özellikler

2.2.2.1. Farmakodinamik Özellikleri

Lidokain sinir iletimini nöron mebranını stabilize edip bloke eder ve lokal anestetik etki gösterir[25]. Lidokain Purkinje liflerinde faz- 4 diastolik depolarizasyonu durdurup otomatisiteyi düşürür ve Purkinje lifleri ile ventrikulus kasında efektif refrakter periyodu ile aksiyon potansiyel süresini kısa tutar (Vaughan-VWilliams klas IB antiaritmik). Lidokain Purkinje liflerinin diastolik uyarı eşiğini ve ventriküllerin fibrilasyon eşiğini artırır. Normal kalp dokularında His-Purkinje sistemi, ventrikül kası ile A.V. - nod kondüksiyonunda değişim görülmemektedir. İskemik dokularda kondüksiyon azalır ya da artar[26]. Minimum seviyede etkin konsantrasyonundan değerlendirildiği zaman prokaine kıyasla aşağı yukarı üç kez daha fazla lokal anestetik etki gösterir. Lidokainin kalpteki otomatisite ile ilgili önemli olan elektrofizyolojik etkisi spontan diastolik depolarizasyonun hızını düşürmesidir. Bu durumun, taban sodyum akımını düşürmesi ve potasyum akımını yükseltmesi ile ilgili olması durumu düşünülmektedir. Sinoatriyal düğüm hücrelerinde bu etki netleşmemiştir. İstinahat membran potansiyelini ile aksiyon potansiyeli oluşumunda ihtiyaç olan voltaj eşiğini

değiştirmeyip, eksitabiliteyi azaltmaktadır. Faz 0'daki hızlı depolarizasyonu etkilemediği belirtilmiş olsa da bu invitro deneylerin az K⁺ konsantrasyonu kullanımıyla olduğu ve K⁺ konsantrasyonu normal seviyede bırakılarak yapılan deneylerde terapötik konsantrasyona uygun olan sınırlarda uygulanan lidokainin aksiyon potansiyelinin fırlama hızını düşürdüğü tespit edilmiştir. Aksiyon potansiyeli zamanını atriyum miyokardında değiştirmeyip Purkinje lifleri ile ventrikül miyokardında büyük oranda kısaltır. Son iki yerde refrakter periyodu daha az seviyede kısaltarak bu etkinin sonucu, patolojik durumlarda, bahsedilen iki yerde de depolarizasyon-repolarizasyon durumlarında meydana gelen asenkronluğu kısmi olarak düzeltilmektedir. EKG'de Q-T mesafesini kısaltmaktadır[27].

2.2.2.2. Farmakokinetik Özellikleri

Emilim: Lidokain mukoz membranlardan basitce absorbe edilirken, absorpsiyonu sağlam deriden zayıftır. Rektal uygulama sonrasında biyoyararlanımı takriben % 50 olarak bulunmuştur. 300 mg yüksek doz lidokain hidroklorür barındıran bir supozitivar uygulama akabinde 112 dakika sonrasında pik plazma konsantrasyonları sadece 0,70 µg/ml olarak tespit edilmiştir[28].

Dağılım: Oral veya intravenöz yoldan uygulandığında lidokain idrarda, barsaklarda ayrıca düşük miktarda feçeste, tespit edilmiştir. Değişim olmamış ilaç ve metabolitleri olarak idrarda tespit edilmiştir. Lidokain plazma proteinlerine(primer olarak al-asitglikoproteine, daha az ise albumine) %33-%80 seviyesinde bağlanıyor. Dağılım hacmi 0.8 - 1.3 L/kg olarak verilmiştir[25].

Biyotransformasyon ve eliminasyon: Karaciğerde hızlıca metabolize edilerek, metabolitleri ve %10'dan daha az değişime uğramamış lidokain idrar ile itrah edilir [28].

2.2.3. Analiz Yöntemleri

2.2.3.1. HPLC Analiz Yöntemleri

Doğanay A. ile arkadaşları Topikal Dozaj formlarda eş zamanlı Dekspantenol, Lidokain HCl, Mepiramin Maleat ve ilgili bileşiklerinin RP-HPLC yöntemi ile analizlerini yapmışlardır. Çalışmada C₁₈(250x4.6mm,5µm) kolon ile amonyum asetat(0.01M) ve metanol gradiyent karışımında hareketli faz kullanılmıştır. 1.3mL/dk. ve 1.5mL/dk. Gradiyent akışta 230nm dalgaboyunda çalışma yapılmıştır. Metodun

doğrusal çalışma aralığı Mepiramin Maleat ve Lidokain HCl için 9-54µg/mL, Dekspantenol için 30-180µg/mL olarak bulunmuştur[29].

Mohamed D. ve arkadaşları insan plazmasında Seftriakson Sodyum ve Lidokain HCl'in yüksek performanslı sıvı kromatografisinde ve MS/MS dedeksiyonu ile tayini için çalışma yapmışlardır. Çalışmada C₁₈(50x4.6mm,5µm) kolon ile metanol ve 0.01M amonyum asetat pH6.4 tamponunun 70:30 oranındaki karışımı hareketli fazı kullanılmıştır. Metot doğrusal çalışma aralığı Seftriakson Sodyum için 3.0-300.0 µg/mL ve Lidokain HCl için 3.0-300.0 ng/mL olarak belirlenmiştir[30].

Grigoriev A. ve arkadaşları insan plazmasında Nifedipin ve Lidokainin yüksek performanslı sıvı kromatografisinde ve MS/MS dedeksiyonda eş zamanlı tayinini gerçekleştirmişlerdir. Bu yöntemde sıvı sıvı ekstraksiyon(metil tert-butil eter) ile elde edilen 10µL numune HPLC-MS/MS sisteminde analize alınmıştır. Bu analiz için hibrid silika baz dolgu maddesi içeren C₁₈(100x2.0mm, S-5µm 12nm) kolon ve %0.15 asetik asit içeren metanol:su (60:40) hareketli fazı kullanılmıştır. Metodun doğrusal çalışma aralığı Nifedipin için 0.5-50ng/mL ve Lidokain için 1.0-500ng/mL olarak belirlenmiştir[31].

Bebawy L.I. ve arkadaşları Aminoakridin HCl, Lidokain HC ve Lidokain Toksik impüritesinin oral jellerde tayini çalışmasını yüksek performanslı sıvı kromatografisinde yapmışlardır. Bu analiz için C₁₈(250x4.6mm,5µm) kolon ve 0.05M disodyum hidrojen fosfat dihidrat pH6.0 tamponu:asetonitril (55:45) oranlarındaki karışımdan oluşan hareketli faz kullanılmıştır. Dalga boyu 240 nm olarak seçilmiştir[32].

Pendela M. ve arkadaşları Lidokain HCl, Hidrokortizon ve Nistatinin farmasötik preparatlarda eş zamanlı tayinini ters faz sıvı kromatografisinde gerçekleştirmişlerdir. Bu analiz için C₁₈(150mmx4.6mm,5µm) kolon ve gradiyent karışımda metanol: 0.1M sodyum dihidrojen fosfat (pH4.5) tamponu kullanılmıştır[33].

Youngvises N. ve arkadaşları Lidokain ve Tolperizonun eş zamanlı tayinini miselar sıvı kromatografisi yöntemi ile gerçekleştirmişlerdir. Bu analiz için C₁₈(12.5mmx4.5mm, 5µm) kolon ve 0.075mol/L SDS: %7.5 izopropanol mobil fazı kullanılmıştır. Akış hızı 0.7 mL/dk. ve dalga boyu 210 nm olarak ayarlanmıştır. Metodun doğrusal çalışma aralığı Lidokain HCl için 0.125-500µg/mL ve Tolperizon için 1.00-500µg/mL olarak belirlenmiştir[34].

Belal T.S. ve arkadaşları Mikonazol Nitrat ve lidokain HCl'in oral jel dozaj formunda stabilite göstergeli metot çalışmasını yüksek performanslı sıvı kromatografisinde ve DAD dedeksiyonda gerçekleştirmişlerdir. Bu analiz için C₈ kolon ve 0.05M fosforik asit ve asetonyitril gradiyent karışımında başlangıç olarak %25 asetonyitril başlayıp 6 dakika içinde doğrusal olarak %65'e yükseltip çalışma sonuna kadar sabit tutulmuştur. Akış hızı 1mL/dk. ve dalgaboyu 215 nm olarak ayarlanmıştır. Metodun doğrusal aralığı 5-100µg/mL olarak bulunmuştur[35].

2.2.3.2. Diğer Yöntemler ile Analizleri

Breuer H. kedi plazmasında gaz kromatografisi yöntemi ile Lidokain tayini yapmıştır[36].

Rahbar N. ve arkadaşları Voltametrik yöntem ile klasik ve Box-Behnken optimizasyon metodolojilerini karşılaştırarak Lidokain tayini yapmışlardır[37].

2.3. Sıvı Kromatografisi Sistemleri

Sıvı kromatografi sistemleri her laboratuvarında değişik modellerde bulunmaktadır. Bu kısımda yüksek performanslı sıvı kromatografisine ait genel özellikler paylaşılacaktır.

2.3.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

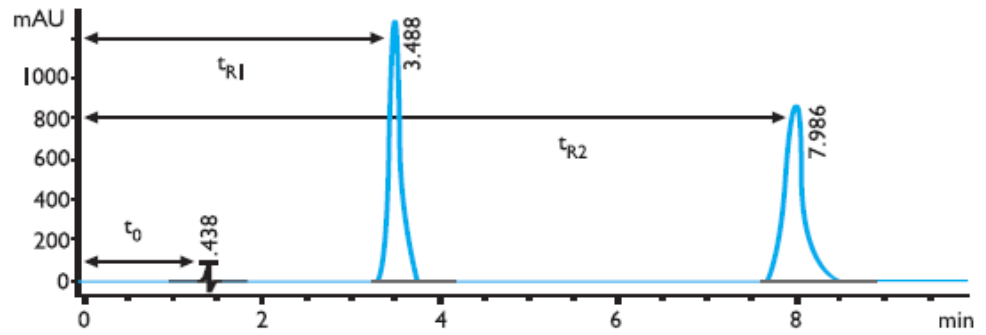
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography) kısaca HPLC olarak adlandırılmaktadır.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), hareketli fazın sıvı olduğu , yüksek basınç altında maddelerin sabit faz ile hareketli faz arasında dağılma esasına dayalı, bir kromatografi çeşididir. Sıklıkla kullanım nedenleri; hassasiyeti, kantitatif analizlerde uygulama kolaylığı, uçucu olmayan ya da sıcakta hızlıca bozulabilen yapıların ayrılması için uygun olmasıdır. Önemli olan ise çok fazla bilim dalı ile sanayinin ve toplumun en çok kullandığı maddelere çoğunlukla uygulanabilir olmasıdır[38].Farmasötik preparatlardaki ilaç etken maddeleri, farmasötik preparatlardaki bozunma ürünleri ve safsızlıklar, kandaki ilaç molekülleri ve bu moleküllerin metabolitleri, organizmadaki enzimler, aminoasitler, proteinler, polisakkaritler, drogların içerdikleri etkili bileşikler, gıdaların kimyasal bileşimi, vb. bir çok analitin miktar tayini için sıklıkla kullanılmaktadır. HPLC başlıca, pompa, enjektör,

hareketli faz rezarvuarı, kolon, dedektör ve kaydediciden oluşur. Ayrım kolonda meydana gelir. Sabit fazda μm boyutunda partiküller vardır, dolayısıyla hareketli fazın kolon içerisinden geçmesi için yüksek basınç pompaları gerekmektedir[39].

Yaygın kullanımda yüksek performanslı sıvı kromatografi denmesinin nedeni; Yüksek performansın basıncın yanında birçok etkenin birleşmesiyle meydana gelmesidir[40].

Dağılma sabiti (KD) kromatografide büyük öneme sahiptir. Türler, kolonda dağılma sabitine bağlı olarak ilerlerken, kolondan bir sıra içinde ayrılırlar. Kromatogram ise zamana karşı kolondan bir sıra ile ayrılan maddelere ait konsantrasyonların programsal olarak hesaplanarak çizilmiş grafiğidir. [41]. Şekil 2.5' de iki bileşenden oluşan numuneye ait kromatogram verilmektedir[42].



Şekil 2-5: İki bileşenden oluşan numuneye ait kromatogram [42]

t_0 değeri, bileşenin enjeksiyonu ile detektöre ulaşması esnasında geçen zamandır ve alıkonma zamanı olarak adlandırılır. t_{R1} ve t_{R2} ; kolondan ilk olarak çıkan ve ikinci olarak çıkan yapılara ait alıkonma zamanlarıdır. Kromatografide önemli bir parametre olan kapasite faktörü ya da alıkonma faktörü, k' şeklinde simgelenir ,eşitlik 2.1'de hesaplaması verilmiştir[42].

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

(2.1)

Alıkonma faktörünün 2'den büyük olması istenmektedir[42].

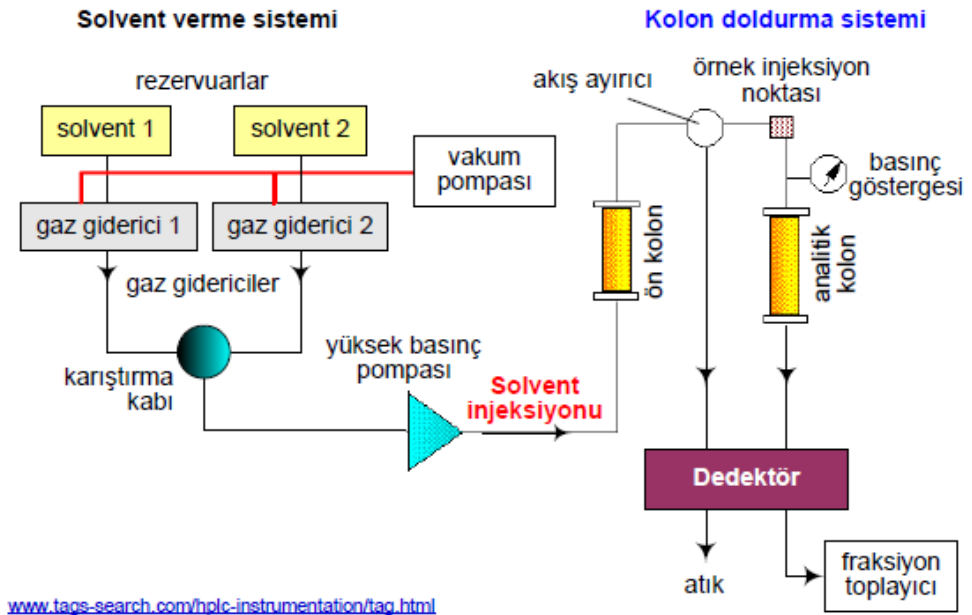
Ayrıma gücü (rezolüsyon) R_s şeklinde gösterilir ve bileşendeki türlerin birbirleri arasındaki ayrımlarının nicel ölçüsüdür. Eşitlik 2.2' de hesaplaması verilmiştir. 'w' değeri piklere ait taban genişliklerinin ölçüsünü vermektedir[42].

$$R_s = 2x \frac{t_{R2} - t_{R1}}{(w_1 + w_2)}$$

(2.2)

Çalışmalarda R_s değerinin 1'den küçük olmaması istenmektedir.

Şekil 2.6' da HPLC sistemi gösterilmiştir.



Şekil 2-6: HPLC sistemi [43]

2.4. Sistem Uygunluk Testi

Amerikan farmakopesine(USP) göre sistem uygunluk parametreleri sıvı kromatografisi yöntemleri için mutlaka olması gereken parametrelerdir. Sistem uygunluk testi kabul kriterleri Tablo 2.1'de FDA kılavuzunda belirtildiği şekilde verilmiştir[45].

2.5. Validasyon Parametreleri

ICH kılavuzu gereğince miktar tayini validasyonu çalışmasında, seçicilik, tekrarlanabilirlik (kesinlik), doğrusallık, doğruluk, dedeksiyon ve belirleme limiti, sağlamlık ve çözelti stabilitesi parametreleri gerekmektedir [46].

2.5.1. Spesifiklik(Seçicilik)

Seçicilik parametresi ile test yönteminin özgülülüğü araştırılır. Bunun için etkin madde içermeyen preparat olan plasebo, çözücü ve hareketli faz sisteme enjekte edilir ve preparattaki etkin madde ile herhangi bir girişim olmadığı gösterilir[47].

Tablo 2-1: FDA kılavuzundaki sistem uygunluk testi kabul kriterleri [45]

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)	$N > 2000$

2.5.2. Doğrusallık

Standart çözeltilerinden en az 5 farklı konsantrasyon olacak şekilde hazırlık yapılarak sisteme enjekte edilir. X-eksenindeki her konsantrasyona karşılık gelen yanıtın eğrinin eğimi ve korelasyon katsayısı ile ortalama, standart sapma ve bağıl standart sapma hesaplanır. Korelasyon katsayısının 0.999'dan büyük olması istenir. Y-kesim noktasının % 100 konsantrasyona karşılık gelen standart alanına oranının miktar tayini için en fazla %2 olması istenir[47].

2.5.3. Doğruluk

Doğruluk çalışmasında 3 farklı konsantrasyon(yüksek, orta, düşük) için üçer hazırlık yapılır. %100 konsantrasyona denk gelen plasebo içerisine 3 farklı konsantrasyon için etkin madde ilave edilir. Ortalama, standart sapma, bağıl standart

sapma ve geri kazanım eş zamanlı hazırlanan standart çözeltilerine karşı okutulurak hesaplanır. Geri kazanımda sapma %2'den fazla olmamalıdır[47].

2.5.4. Kesinlik

Kesinlik çalışmasında eş şartlarda hazırlanan numunelerin sonuçlarının yakınlıkları ve sistemin kesinliği ile tekrar edilebilirliği test edilir. Bunun için Sistem Kesinliği ve Tekrarlanabilirlik çalışmaları yapılır. Hedef seviyede etkin madde içeren minimum 6 adet örnek hazırlanıp analize alınır. Sonuç olarak ortalama, standart sapma ve bağıl standart sapma hesaplanır. Bağıl standart sapmanın $\pm$ %2 olması istenir[47].

2.5.5. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)

Kesinlik ve doğruluk çalışmalarında bir analitin alabileceği en düşük konsantrasyonun belirlenmesi için yapılan çalışmalardır ve en düşük hesaplanabilen konsantrasyon tayin sınırı olarak belirlenir. Standart eğrisindeki en düşük konsantrasyon olarak da tanımlanır. Tayin sınırında sinyal/gürültü oranı 10:1'dir[47]. Aşağıdaki gibi hesaplanır[44].

$$LOQ = 10\sigma/S$$

σ : İnterseptin standart sapması

S: Eğim

Standart çözeltisinin tespit edilebilen en düşük konsantrasyonu teşhis sınırı olarak belirlenir ve sinyal/gürültü oranı 3:1'dir[47]. Aşağıdaki gibi hesaplanır[44].

$$LOD = 3 \sigma/S$$

σ : İnterseptin standart sapması

S: Eğim

2.5.6. Sağlamlık

Sağlamlık; analitik yöntemin yöntem paramaterelerinde yapılan küçük değişimlerden etkilenmeden kalma kapasitesidir[47].

Likit kromatografi yöntemi için yapılabilecek olası değişiklikler[46];

Hareketli fazın pH'sı

Hareketli fazın tampon/tuz konsantrasyonu

Hareketli fazın kompozisyonu (organik çözücü konsantrasyonu)

Kolon tipi

Kolon sıcaklığı

Akış Hızı

Çözelti stabilitesi de sağlamlık parametresi içinde değerlendirilebilmektedir. + 4C° ya da oda sıcaklığında ve belirli sürelerde analize alınan örneklerin çözelti stabilitesi takip edilir. Başlangıç değeri ve belirli sürelerdeki değerler arasındaki fark miktar tayini için en fazla %2 olmalıdır[46].



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı araştırma laboratuvarında 2017-2019 yılları arasında yapılmıştır.

3.1. Çalışmadaki Çözücüler, Çözeltiler ve Kimyasal Maddeler

3.1.1. Çözücüler ve Kimyasal Maddeler

Çalışma için kullanılmış olan çözücüler ve kimyasal maddeler aşağıda verilmiştir.

Tinidazol ,
Lidokain HCl ,
Potasyum dihidrojen fosfat,
Ortofosforik Asit(%85),
Potasyum Hidroksit,
Metanol (HPLC saflığında),
Asetonitril (HPLC saflığında) ,
Ultra saf su (HPLC saflığında),
Tinidazol ve Lidokain HCl içeren ovül

3.1.2. Çözeltiler ve Hazırlıkları

3.1.3. Hareketli Faz Çözeltileri

1.36 g Potasyum dihidrojen fosfat tartılarak 1000 mL su ile çözülerek, çözeltinin pH'ı 3.0'a ortofosforik asit ile ayarlandı. Elde edilen çözelti süzücü ile 0.45 µm filtrelerden süzülerek hareketli faz A olarak analize hazır hale getirildi. Hareketli faz B olan Asetonitril süzücü ile 0.45 µm filtrelerden süzüldü.

3.1.3.1. Çözücü

1.36 g Potasyum dihidrojen fosfat tartılıp 1000 mL su ile çözülerek, çözeltinin pH'ı 3.0'a ortofosforik asit ile ayarlandı. Elde edilen çözelti ile Asetonitril (70:30) oranında karıştırıldı.

3.1.3.2. Tinidazol Çözeltileri:

Stok Çözelti:

300.0 mg Tinidazol tam olarak tartıldı, 100 mL'lik balonjoje'de metanol ile çözündürülerek hacmine tamamlandı. (3000 µg/mL Tinidazol'e eşdeğer)

75-195 µg/mL konsantrasyon aralığında standart çözeltiler stok çözeltiden çözücü kullanılarak hazırlandı (Tablo 3-1).

Tablo 3-1: Tinidazol kalibrasyon standart çözeltilerinin hazırlığı

Standart Adı	Analit	Konsantrasyon (µg/mL)	Seyreltme Hacmi (mL)	Final Hacmi (mL)
Standart1	Tinidazol	75	2.5	100
Standart2	Tinidazol	105	3.5	100
Standart3	Tinidazol	120	4.0	100
Standart4	Tinidazol	135	4.5	100
Standart5	Tinidazol	150	5.0	100
Standart6	Tinidazol	165	5.5	100
Standart7	Tinidazol	180	6.0	100
Standart8	Tinidazol	195	6.5	100

3.1.3.3. Lidokain Çözeltileri

Stok Çözelti:

123.26 mg Lidokain HCl (100 mg Lidokain'e eşdeğer) tam olarak tartıldı, 100mL lik balonjoje'de metanol ile çözündürülerek hacmine tamamlandı(1000 µg/mL Lidokain'e eşdeğer).

25-65 µg/mL konsantrasyon aralığında standart çözeltiler stok çözeltiden çözücü kullanılarak hazırlandı(Tablo 3-2).

Tablo 3-2: Lidokain kalibrasyon standart çözeltilerinin hazırlığı

Standart Adı	Analit	Konsantrasyon (µg/mL)	Seyreltme Hacmi (mL)	Final Hacmi (mL)
Standart1	Lidokain	25	2.5	100
Standart2	Lidokain	35	3.5	100
Standart3	Lidokain	40	4.0	100
Standart4	Lidokain	45	4.5	100
Standart5	Lidokain	50	5.0	100
Standart6	Lidokain	55	5.5	100
Standart7	Lidokain	60	6.0	100
Standart8	Lidokain	65	6.5	100

3.2. Çalışmada kullanılan Gereçler

Analizde Shimadzu LC-20A PDA sistemi kullanıldı. Ekipmana ait parçalar Tablo 3-3’de verilmiştir.

Tablo 3-3: Çalışmada kullanılan Ekipmanlar

HPLC Sistemi	Marka ve Model
Pompa	Shimadzu LC-20AT
Oto örnekleyici	Shimadzu SIL-20AC
Dedektör	Shimadzu SPD M-20A
Kolon Fırını	Shimadzu CTO-10ASvp
Yazılım	Shimadzu Labsolutions
Analitik Kolon	Waters Symmetry 5 µm, 250 x 4,6 mm, C18 Phenomenex LUNA 5 µm, 250 x 4,6 mm, C18 Thermo Hypersil BDS 5 µm, 125 x 4,6 mm, C18

Metot geliştirme ve validasyon çalışmalarında kullanılan destekleyici ekipmanlar Tablo 3-4’de verilmiştir.

Tablo 3-4: Çalışmada kullanılan Destekleyici Ekipmanlar

Destek Ekipmanlar	Marka ve Model
UV Spektrofotometre	Shimadzu UV 254
10 cm'lik kuartz küvetler	QS 1000 10 x10 x 45 mm
Sonik Banyo	Branson
Sıcak Su Banyosu	Memmert
Buz Banyosu	Kale Buzzbar
pH metre	Mettler Toledo
Otomatik pipetler	Eppendorf 10-100 µL ve 100-1000 µL
Tekli manyetik karıştırıcı	IKA RO 15
Oto örnekleyici Vialleri ve kapakları	Isolab
Vorteks	Thermo Fisher
Analitik Terazı	Mettler Toledo
Hareketli Faz Filtresi	Millipore, 0.45 µm
PVDF,Nylon,PTFE Filtre 0.45 µm	Merck
Buzdolabı	Liebherr LCexv 4010
Paslanmaz çelik rende	Isolab
Mavi bant filtre	Macherey-Nagel
Tüplük	Isolab

Metot geliştirme ve validasyon çalışmalarında kullanılan cam malzemeler Tablo 3-5'de verilmiştir.

Tablo 3-5: Çalışmada kullanılan Cam Malzemeler

Cam Malzemeler	Marka
Balon 5 Litre	Isolab laboratuvar malzemeleri
Balon 2 Litre	Isolab laboratuvar malzemeleri
Balon 1 Litre	Isolab laboratuvar malzemeleri
Balon joje 5 mL	Isolab laboratuvar malzemeleri
Balon joje 10 mL	Isolab laboratuvar malzemeleri
Balon joje 50 mL	Isolab laboratuvar malzemeleri
Balon joje 100 mL	Isolab laboratuvar malzemeleri
Mezür 1000 mL	Isolab laboratuvar malzemeleri
Pipet 2.5 mL	Isolab laboratuvar malzemeleri
Pipet 4 mL	Isolab laboratuvar malzemeleri
Mezür 1000 mL	Isolab laboratuvar malzemeleri
Pipet 5 mL	Isolab laboratuvar malzemeleri
Pipet 6 mL	Isolab laboratuvar malzemeleri
Deney tüpü	Isolab
Huni	Isolab

3.3. Analizin Yapılması

- Bilgisayardaki açma butonundan Shimadzu LC-20A PDA HPLC sistemi çalıştırılır.
- HPLC bölümlerinin hepsi açılır.

- Dedektör ile bağlantı PDA dedektörünün açma/kapama butonuna basılarak yapılır.
- LC Solution simgesi vasıtasıyla LC Solution yazılımı çalıştırılır.
- Bağlantı yapılan HPLC LC Solution penceresinden seçilir.
- A ve B hatlarına hareketli faz çözeltileri konur. C ve D hatları asetonitril:su(30:70) karışımı içerisine, yıkama hattı ise asetonitril:su(5:95) karışımına konur.
- Hatlara purge yapılır.
- Akış yavaş yavaş artırılarak son akış 1.0 mL/dakika olacak şekilde kolondan akış geçirilir.
- 20 dakika analiz süresidir.
- 25C° kolon fırını sıcaklığıdır.
- Oto örnekleyici sıcaklığı 25C°'dir.
- Enjeksiyon hacmi 20µL'dir.
- 220 nm dedektör dalga boyudur.

3.4. Tinidazol ve Lidokain için Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Metot Geliştirme

3.4.1. Dedektör için Dalga Boyunun Belirlenmesi

Tinidazol molekülündeki imidazol aromatik yapısı ve lidokaindeki amit aromatik yapısı sebebi ile UV bölgede absorpsiyon yapabilen maddeler oldukları için UV dedektör kullanılması uygun görüldü. Tinidazol ve Lidokain'in absorbans verdiği en yüksek dalga boyu Spektrofotometri yöntemiyle Tinidazol için 316 nm ve Lidokain için 205 nm şeklinde tespit edilmiştir. Sırasıyla (Şekil2-2) ve (Şekil2-4) olarak gösterilmiştir. 220 nm dalga boyu iki etkin madde içinde uygun bulunmuştur.

3.4.2. Hareketli Fazın Belirlenmesi

Çalışmada; kimyasal girişimleri azaltarak dedektörün hassasiyetini yüksek tutarak verimli bir çalışmaya olanak sağlayacak düşük molaritede ve yüksek uçuculukta

organik çözücüler kullanıldı. Çalışma için potasyum fosfat tamponu 10mM olarak ve asetonitril organik çözücü olarak uygun görüldü. Hareketli fazlarda pH değeri kromatografide piklerin ayrımında etkili faktörlerden biridir. Düşük pH'lardaki hareketli fazlarda bazik yapıdaki pikler erken alıkonma gösterirken durum asidik yapıdaki pikler için tam tersi olarak işlemektedir. Tinidazol'un düşük pH ve lidokain'in yüksek pH'ya sahip olması da göz önünde bulundurularak tinidazol ve lidokain için en iyi ayrımı gösteren tampon pH'ı pH:3.0 olarak uygun görüldü. Hareketli faz gradiyent elüsyonda 10mM potasyum fosfat tamponu(pH:3.0) ve asetonitril olarak belirlendi.

3.4.3. Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

75-105-120-135-150-165-180-195µg/mL Tinidazol ve 25-35-40-45-50-55-60-65µg/mL Lidokain içerecek şekilde; çözeltiler stok çözeltilerin 100 mL'lik balon jöjelere seyreltilmesi ile hazırlandı, 30 saniye süresince vorteks yapıldı

Yapılan 20 µL enjeksiyonlardan hesaplanan alanlar ile kalibrasyon eğrisi çizdirildi.

3.5. Yöntemin Validasyonu

Yöntemi geliştirilen metot validasyonu, Uluslararası Harmonizasyon Konferansı (ICH, International Conference Harmonization)Q2 kılavuzuna göre yapılmıştır [46].

3.5.1. Spesifiklik(Seçicilik)

Çalışmada; metanol, hareketli faz, ovül yardımcı maddeleri ve etkin madde içermeyen ilaç preparatı(plasebo) ile girişimin olup olmadığı kontrol edildi ve Tinidazol ile Lidokain piklerinin pik saflıkları değerlendirildi. Çalışmaya ait kromatogram ve spektrumlar 4.2.1. bölümünde belirtilmiştir.

3.5.2. Doğrusallık

Çalışmada; regresyon analizi yapılarak y-(ordinat)-kesim noktası, korelasyon katsayısı ile eğrinin eğimi hesaplanarak eğri denklemi belirlendi. Korelasyon katsayısının 0.99'dan büyük bulunmuştur ve bölüm 4.2.2'de verilmiştir. y-kesim noktası , %100

konsantrasyondaki standart çözeltisi alanına kıyasla %2 değerinden küçüktür ve sonuç 4.2.2 bölümünde verilmiştir.

3.5.3. Doğruluk

Etkin madde içermeyen ilaç preparatına tinidazol ve lidokain %120,%100 ve % 80 konsantrasyonlarında eklendi ve eş zamanlı hazırlanan standartlara karşı okutma yapıldı. Tüm konsantrasyonlarda üçer hazırlık yapıldı. 4.2.3. bölümünde sonuçlar gösterilmiştir.

3.5.4. Kesinlik

Çalışmada; Sistem Kesinliği ve Tekrarlanabilirlik değerlendirildi.

Sistem kesinliği çalışmasında; yöntemde belirtildiği gibi standart hazırlığı yapıldı ve 6 okutma yapıldı. Bölüm 4.2.4’de sonuçlar gösterildi.

Tekrarlanabilirlik çalışmasında; aynı seriye ait 6 farklı numune hazırlandı. 4.2.4. bölümünde sonuçlar gösterilmiştir.

3.5.5. Tayin Sınırı (LOQ) ve Teşhis Sınırı (LOD)

Çalışmada teşhis sınırı ve tayin sınırı hesaplanmıştır ve 4.2.5. bölümünde sonuçlar verilmiştir

3.5.6. Yöntemin Sağlamlığı

Standart ve numune çözeltileri hazırlanarak sistem uygunluk kriterlerindeki değişimler takip edildi. 4.2.6.bölümünde sonuçlar gösterilmiştir.

Çözelti stabilitesi için numune ve standart çözeltileri, otomatik numune örnekleyicisinde 48 saat süresince +25C°’de +4C°’de tutuldu. 4.2.6 bölümünde sonuçlar gösterilmiştir.

3.6. Ovüllerde Tinidazol ve Lidokain’in Tayini

3.6.1. Ovüllerin ve Ovül Çözeltilerinin Hazırlığı

Her ovül 300 mg Tinidazol, 100 mg Lidokain’e eşdeğer 123,26 mg Lidokain HCl içermektedir. Ovül formülasyonunda, Polisorbat 80 yüzey aktif maddesi ve sıvağ dolgu materyali kullanılmıştır. Ovül ağırlığı 2500 mg olacak şekilde dolum yapılmıştır. Etkin maddeler eleme işlemine tabi tutulduktan sonra , üretim akış şemasındaki süreler

dikkate alınarak karıştırılmıştır. Sıvı karışım, kalıplara dökme yöntemiyle doldurularak dondurulmuşlardır.

300 mg Tinidazol ve 100 mg Lidokain içeren 10 adet ovülün ortalama ovül ağırlığı hassas olarak tartılarak alındı. Paslanmaz çelik rende ile rendelendi ve homojen bir hale getirildi. Rendelenen ovül numuneleri tartım öncesinde kolaylık sağlaması için 15 dakika buzdolabında bekletildi. Bir adet ovül ağırlığı kadar numune(2500mg ovül ağırlığı) , 6 farklı tartım olacak şekilde 100mL'lik balon jojelere tartıldı. Her bir balon jojeye 50 mL metanol ilave edilip 60°C sıcaklığa ayarlanmış sıcak su banyosunda numunedeki sıvı eriyene kadar 5 dk boyunca tutuldu. Balon jojeler sıcak su banyosundan alınıp oda koşullarına getirilerek hacimlerine metanol ile tamamlandı. Her bir balon joje numune çözeltisindeki sıvı'nın çökmesi için buz banyosunda 20 dk tutuldu. Çökme gözlemlendikten sonra her bir balon jojedeki numune çözeltileri mavi bant kaba filtreden süzüldü. Süzüntülerin 5'er mL'si 100 mL'lik balon jojelere transfer edildi. Balon jojeler hacimlerine çözücü ile tamamlandı. Her bir çözelti 0.45 µm PVDF filtreden süzüldü. Bu şekilde 150 µg/mL Tinidazol ve 50 µg/mL Lidokain içeren 6 adet ovül çözeltisi hazırlanmış oldu.

4. BULGULAR

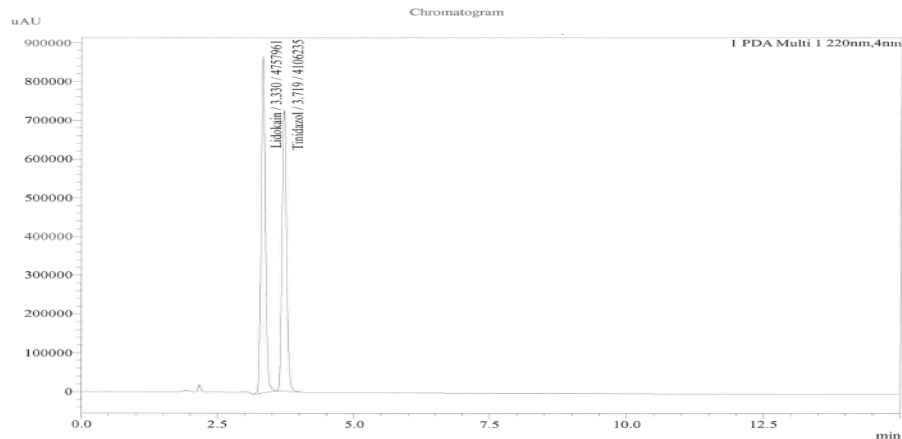
Çalışmalara ait tüm bulgular ilgili kısımlarda verilmiştir.

4.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi yöntemi ile yapılan Tinidazol ve Lidokainin Yanyana Analizlerinin Sonuçları

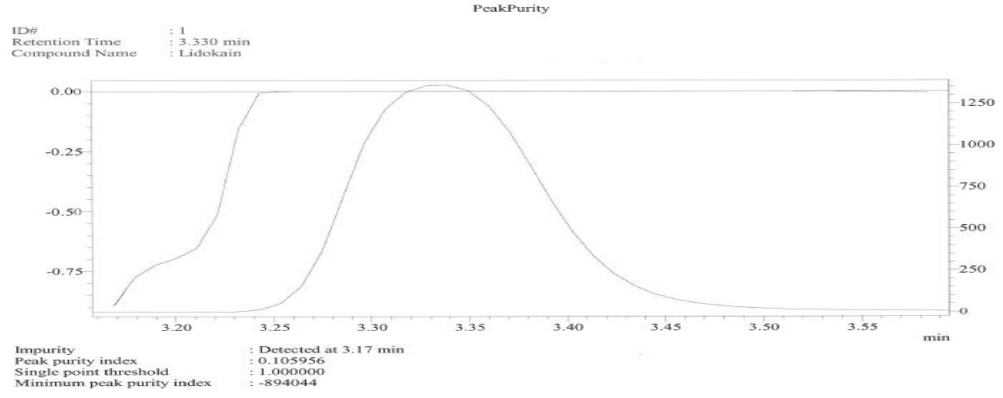
4.1.1. Kromatografik Koşulların Tespit Edilmesi

Çalışmalarda uygun pH değerinde tampon, uygun kolon özellikleri ve uygun hareketli faz karışım oranları elde edebilmek için farklı pH aralıklarında tampon çözeltiler hazırlanıp farklı oranlarda organik çözücüler ile karıştırılmış ve farklı akış programlarında ve farklı kolon boyutlarında analizler yapılmıştır.

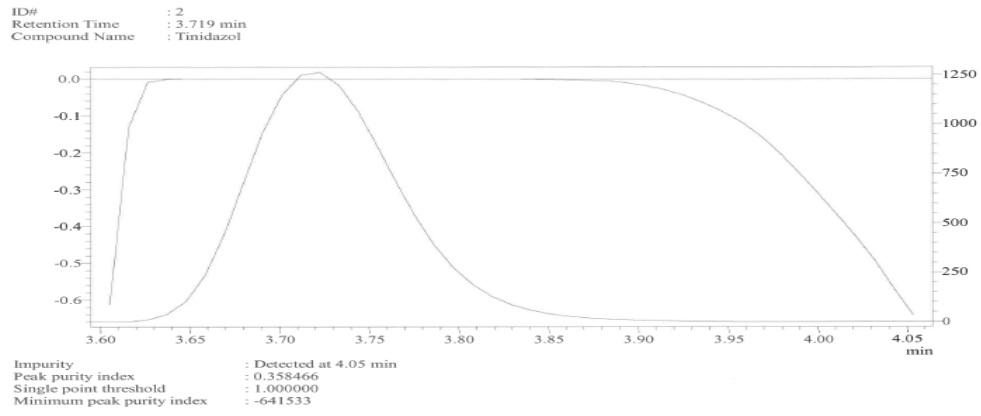
Metot geliştirme çalışmasına Thermo Hypersil BDS C₁₈(125mm x 4.6mm,5µ) HPLC kolonu ile başlandı. Yapılan çalışmalarda piklerin iyi ayrılmadığı ve etkin madde piklerinin alıkonma zamanlarında girişim olduğu gözlenmiştir.(Şekil4-1),(Şekil4-2), (Şekil4-3). Ayrılmanın daha iyi hale getirilmesi ve saf piklerin elde edilmesi için C₁₈ (250mm x 4.6mm, 5µ) Waters Symmetry HPLC kolonu kullanılmıştır(Şekil4-4). Aynı şartlarda daha iyi ayırma gücü ve pik simetrisi sağlayan bu kolon ile geliştirme çalışmalarına devam edilmiştir.Waters Symmetry kolonunun karbon yükünün Thermo Hypersil BDS kolonundan daha yüksek olması ayrılmanın Waters Symmetry kolonda daha iyi olmasını sağlamıştır.



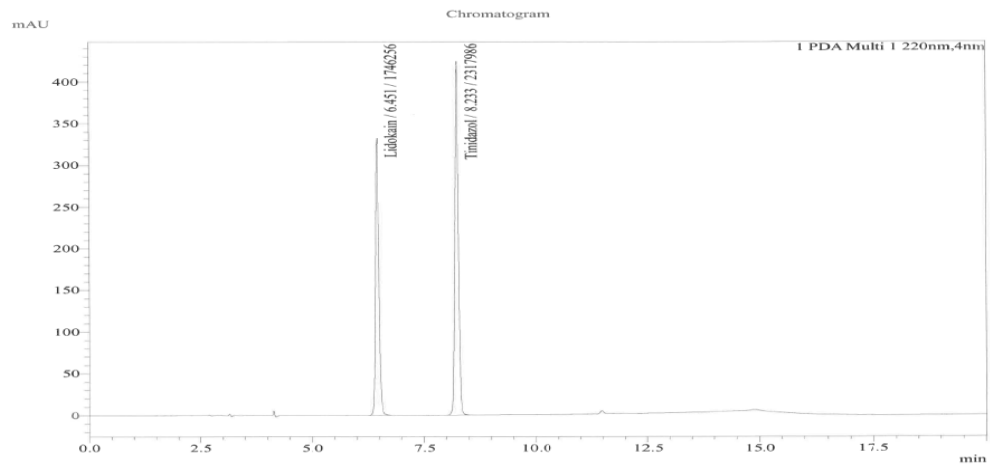
Şekil 4-1: C₁₈ (125mm x 4.6mm, 5µ) Thermo Hypersil BDS HPLC kolonu ile elde edilen kromatogram



Şekil 4-2: C₁₈ (125mm x 4.6mm, 5µ) Thermo Hypersil BDS HPLC kolonu ile elde edilen lidokain spektrumu



Şekil 4-3: C₁₈ (125mm x 4.6mm, 5µ) Thermo Hypersil BDS HPLC kolonu ile elde edilen tinidazol spektrum



Şekil 4-4: C₁₈ (250mm x 4.6mm, 5µ) Waters Symmetry HPLC kolonu ile elde edilen kromatogram

Yapılan metot geliştirme çalışmalarında farklı pH aralıklarında hareketli fazlar hazırlanmıştır ve analiz edilmişlerdir. pH:2.0'da kapasite faktörü düşük bulunmuş ve pH:7.0'da ise yüksek bulunmuştur(Tablo4-1). Bu neden ile pH:3.0'ın yeterli ayrılmayı ve kromatografi süresini sağladığı ve HPLC kolonunun çalışma aralığı olan pH:2.0 ve pH:8.0 koşulları içerisinde olduğu tespit edilmiştir.

Tablo4-1: Hareketli faz pH değerinin kapasite faktörü üzerine etkisi

Kapasite Faktörü			
pH	2.0	3.0	7.0
Tinidazol	1.6	4.5	10.2
Lidokain	1.5	3.6	8.7

Gradiyent programı olarak 3 farklı deneme çalışması yapılmıştır(Tablo4-2),(Tablo4-3),(Tablo4-4).Çalışma sonuçlarında sistem uygunluk parametreleri değerlendirildiğinde ayrılmanın ve kuyuruklanma faktörünün Deneme II. ve III. çalışmalarında önemli bir ölçüde değişmediği görülmüştür.II.gradiyent programı metot geliştirme çalışması için uygun olarak değerlendirilmiştir(Tablo4-5).

Tablo4-2: I. Gradiyent denemesine ait zaman ve hareketli faz yüzdesi değişimi programı

Zaman(dakika)	Yüzde Oranlar	
	Hareketli Faz A(%)	Hareketli Faz B(%)
0	90	10
12	80	20
15	90	10
20	90	10

Tablo4-3: II. Gradyent denemesine ait zaman ve hareketli faz yüzdesi değişimi programı

	Yüzde Oranlar	
Zaman(dakika)	Hareketli Faz A(%)	Hareketli Faz B(%)
0	90	10
12	50	50
15	90	10
20	90	10

Tablo4-4: III. Gradyent denemesine ait zaman ve hareketli faz yüzdesi değişimi programı

	Yüzde Oranlar	
Zaman(dakika)	Hareketli Faz A(%)	Hareketli Faz B(%)
0	90	10
12	30	70
15	90	10
20	90	10

Tablo4-5: Denemeleri yapılan gradiyent çalışmalarında her pike ait ayırım faktörünün ve kuyruklanma faktörünün değişimi

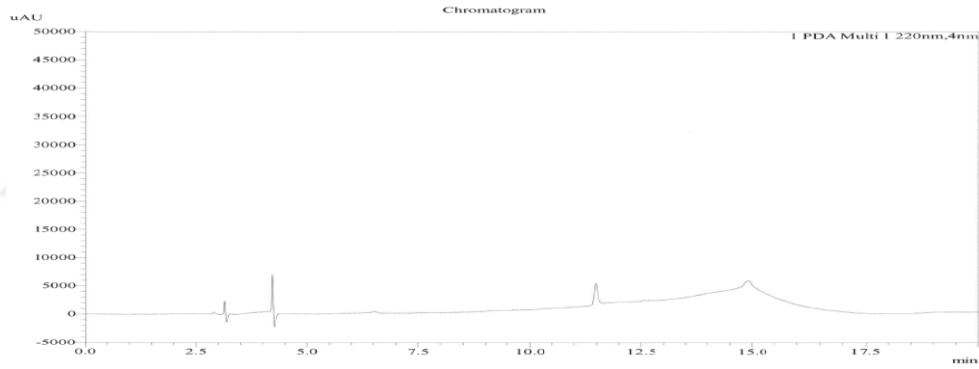
	Ayırım Faktörü		Kuyruklanma Faktörü	
Gradyent	Tinidazol	Lidokain	Tinidazol	Lidokain
I.	13.2	13.2	1.90	1.82
II.	11.0	11.0	1.06	1.22
III.	6.0	6.0	1.01	1.10

Gerçekleştirilen deneme çalışmalarında optimum sonuçlar; C₁₈, 5 µm partikül çapına sahip, 250 mm uzunluğu olan, 4.6 mm iç çapında kolon (Waters Symmetry), 10mM potasyum fosfat tamponu(pH: 3.0), asetonitril gradiyent elüsyonu kullanılarak(Tablo4-3) 25C° kolon sıcaklığı ve 25C° numune bölme(oto örnekleyici) sıcaklığında ve 1.0mL/dakika akış hızında elde edilmiştir. Yöntemde PDA detektör, 220 nm dalgaboyunda kullanılmıştır. Alıkonma zamanları sırasıyla Tinidazol için 8.2 dakika ve Lidokain için 6.5 dakika olarak bulunmuştur (Şekil4-4).

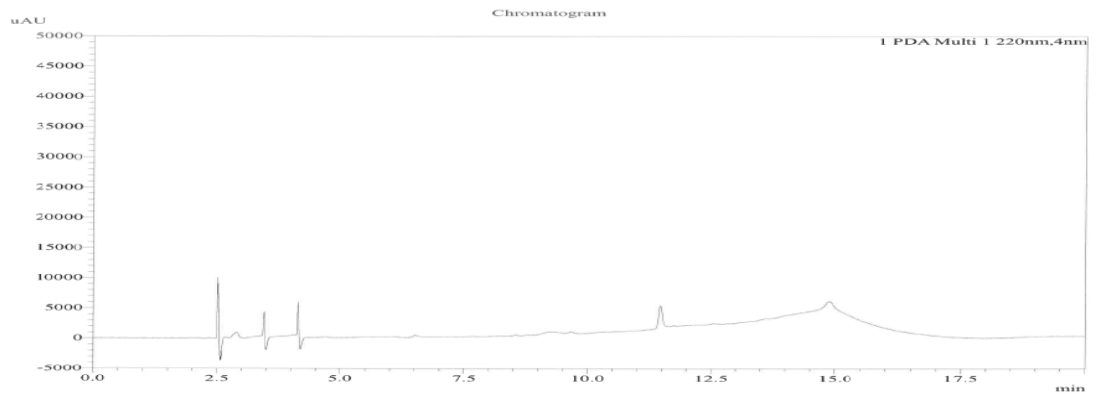
4.2. Yöntem Validasyonu Sonuçları

4.2.1. Seçicilik Parametresi için Değerlendirme

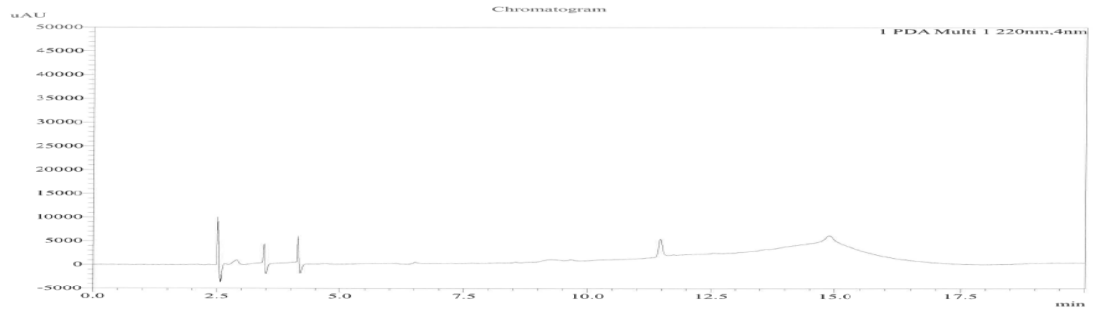
Çalışmaya ait sonuçlar Şekil 4-5, Şekil 4-6, Şekil 4-7, Şekil 4-8, Şekil 4-9'da verilmiştir. Metanol, plasebo ve hareketli faz ile etkin madde alıkonma zamanlarında herhangi bir girişim gözlemlenmemiştir.



Şekil 4-5: Hareketli faz kromatogramı

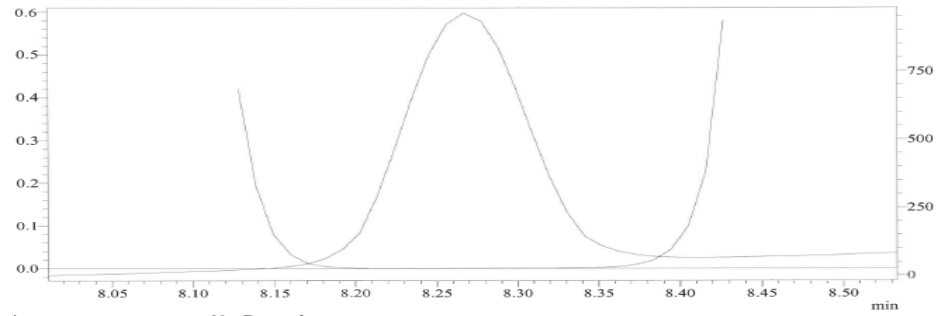


Şekil 4-6: Metanol kromatogramı



Şekil 4-7: Plasebo çözeltisi kromatogramı

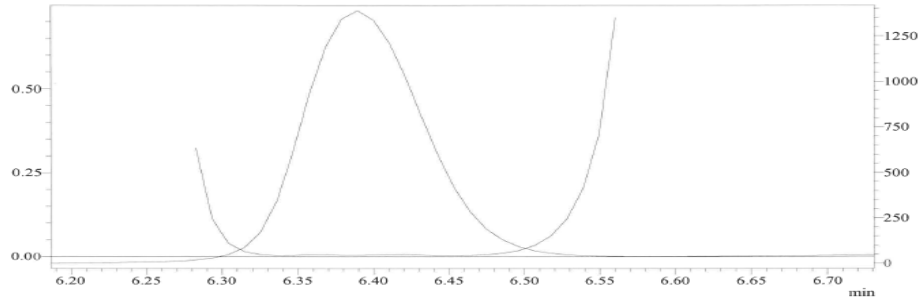
ID# : 2
Retention Time : 8.267 min
Compound Name : Tinidazol



Impurity : Not Detected
Peak purity index : 0.999999
Single point threshold : 0.999653
Minimum peak purity index : 346

Şekil 4-8: Tinidazol pik saflığı spektrumu

ID# : 1
Retention Time : 6.388 min
Compound Name : Lidokain



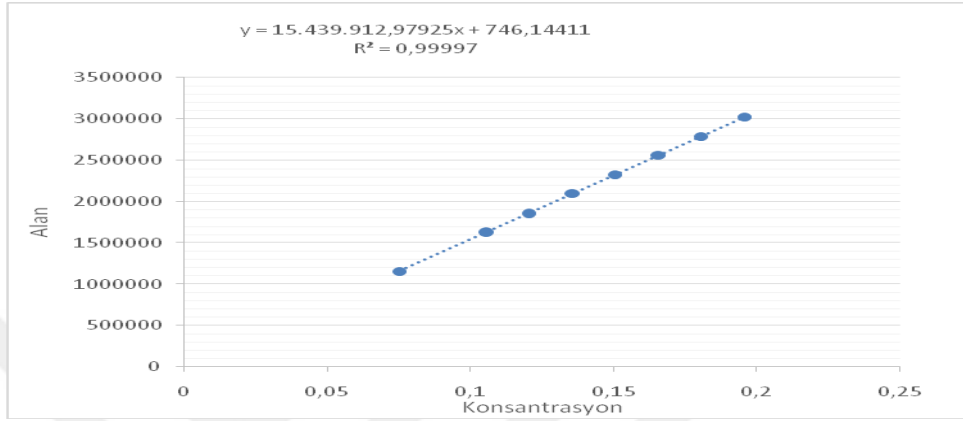
Impurity : Not Detected
Peak purity index : 1.000000
Single point threshold : 0.996672
Minimum peak purity index : 3327

Şekil 4-9: Lidokain pik saflığı spektrumu

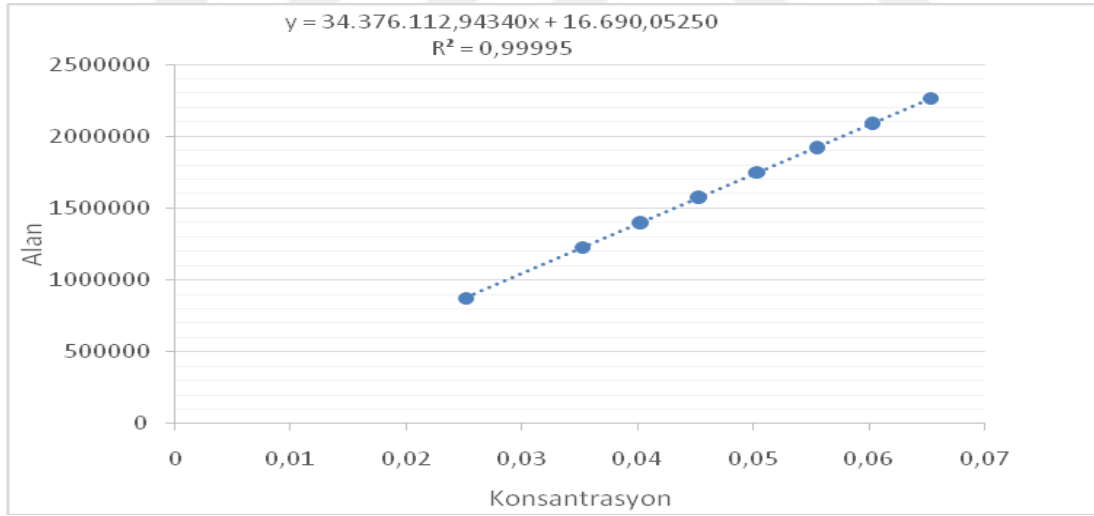
4.2.2. Doğrusallık Parametresi için Değerlendirme

75µg/mL Tinidazol - 25 µg/mL Lidokain, 105 µg/mL Tinidazol - 35 µg/mL Lidokain, 120 µg/mL Tinidazol - 40 µg/mL Lidokain, 135 µg/mL Tinidazol - 45 µg/mL Lidokain, 150 µg/mL Tinidazol - 50 µg/mL Lidokain, 165 µg/mL Tinidazol - 55 µg/mL Lidokain, 180 µg/mL Tinidazol - 60 µg/mL Lidokain, 195 µg/mL Tinidazol - 65 µg/mL Lidokain olan 8 farklı

konsantrasyonda örnekler hazırlandı. %50, %100 ve %130 örnek konsantrasyon seviyelerine denk gelen konsantrasyondaki örneklerden 6'sar, diğer konsantrasyondaki örneklerden 2'ser okuma verildi ve alana karşı grafiğe geçirildi. Şekil 4-10 ve Şekil 4-11 ile Tablo 4-6 ve Tablo 4-7'de sonuçlar verilmiştir. Korelasyon katsayıları 0.999 değerinden büyük bulunarak kabul kriterlerini sağlamıştır.



Şekil 4-10: Tinidazolun 75-195 µg/mL konsantrasyonundaki ölçü eğrisi



Şekil 4-11: Lidokainin 25-65 µg/mL konsantrasyonundaki ölçü eğrisi

Tablo 4-6: Tinidazol'un doğrusallık sonuçları

Tinidazolun Seviyesi(%)	Ortalama Pik Alanı	Konsantrasyon($\mu\text{g/mL}$)
50	1157788	75.195
70	1628959	105.273
80	1856476	120.312
90	2095801	135.351
100	2322426	150.390
110	2557846	165.429
120	2785615	180.468
130	3016123	195.507

Tablo 4-7: Lidokain'in doğrusallık sonuçları

Lidokainin Seviyesi(%)	Ortalama Pik Alanı	Konsantrasyon($\mu\text{g/mL}$)
50	876251	25.133704
70	1229069	35.187186
80	1398918	40.213926
90	1576106	45.240668
100	1747596	50.267409
110	1922462	55.529415
120	2090462	60.320891
130	2260732	65.347632

Bu sekiz farklı konsantrasyondan kalibrasyon eğrisi çizilerek doğru denklemi meydana getirildi.

Tinidazol için doğru denklemi;

$y=15439912,97925x+746,14411$ ve korelasyon katsayısı 0,99997 şeklinde tayin edilmiştir.

Lidokain için doğru denklemi;

$y=34376112,94340x+16690,05250$ ve korelasyon katsayısı 0,99995 şeklinde tayin edilmiştir.

Tinidazol için Y-Intersept/ %100 Standard alanı*100; %0.03.

Lidokain için Y-Intersept/ %100 Standard alanı*100; %0.96.

4.2.3. Doğruluk Parametresi için Değerlendirme

Hesaplanan geri kazanımlar Tablo 4-8 ve Tablo 4-9’da gösterilmiştir.

Tablo 4-8: Tinidazol için Geri Kazanım Sonuçları

Seviye	Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Deneysel Konsantrasyon (µg/mL)	%Geri Kazanım	% RSD
% 80	122.50	121.46	99.15	0.10
	122.75	121.60	99.06	
	122.80	121.52	98.96	
%100	154.00	152.43	98.98	0.16
	154.25	152.76	99.03	
	154.35	152.40	98.74	
%120	182.25	181.65	99.67	0.18
	182.00	180.82	99.35	
	182.10	181.48	99.66	

Tablo 4-9: Lidokain için Geri Kazanım Sonuçları

Seviye	Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Deneyisel Konsantrasyon (µg/mL)	%Geri Kazanım	% RSD
% 80	41.31	41.34	100.07	0.12
	41.33	41.32	99.98	
	41.35	41.28	99.83	
%100	51.88	51.97	100.17	0.20
	51.84	51.95	100.21	
	51.86	51.78	99.84	
%120	60.91	61.11	100.33	0.18
	60.95	60.96	100.02	
	60.87	61.07	100.33	

4.2.4. Kesinlik Parametresi için Değerlendirme

Tinidazol ve Lidokaine ait kesinlik çalışması sonuçları Tablo 4-10 ve Tablo 4-11’de, gösterilmiştir. Sonuçlar kabul kriterleri içinde bulunmuştur.

Tablo 4-10: Tinidazol ve Lidokaine ait Sistem Kesinliği Sonuçları

Enjeksiyon Sayısı	% 100 Standard Alanına ait Tinidazol Alanı	% 100 Standard Alanına ait Lidokain Alanı
1. Enjeksiyon	2314667	1746302
2. Enjeksiyon	2317742	1744552
3. Enjeksiyon	2316378	1746135
4. Enjeksiyon	2316342	1745628
5. Enjeksiyon	2316143	1747627
6. Enjeksiyon	2316573	1746256
Ortalama	2316308	1746083
Standart Sapma	985	1001
Bağıl Standart Sapma(%)	0.043	0.057

Tablo4-11: Tinidazol/Lidokain 300mg/100mg Ovül için Tekrarlanabilirlik Sonuçları

Numune	Tinidazol Sonuç (mg/ovül)	Lidokain Sonuç (mg/ovül)
Numune 1	299.49	100.08
Numune 2	297.09	99.50
Numune 3	299.46	100.15
Numune 4	299.24	100.12
Numune 5	298.65	99.98
Numune 6	299.13	100.04
Ortalama	298.84	99.98
Standart Sapma	0.911	0.244
Bağıl StandartSapma(%)	0.305	0.244

4.2.5. Tayin (LOQ) ve Teşhis (LOD) Sınırları Parametresi için Değerlendirme

Teşhis ve tayin sınırları sırasıyla Tinidazol için 0.05625 µg/mL ve 0.225 µg/mL ve Lidokain için 0.01875 µg/mL ve 0.075 µg/mL olarak bulunmuştur.

4.2.6. Yöntemin Sağlamlığı için Değerlendirme

Yöntemde yapılan küçük değişimlerin sistem uygunluk parametrelerine olan etkisi incelenmiştir. Sonuçlar; Tablo 4-12, Tablo 4-13, Tablo 4-14, Tablo 4-15, Tablo 4-16, Tablo 4-17 ve Tablo 4-18’de gösterilmiştir.

Çalışmada yapılan değişimler;

Akış Hızı değişimi

Filtre Etkisi

Farklı markada kolon kullanımı

Kolon sıcaklığı

Hareketli fazın tampon pH değişimi

Hareketli fazın tampon konsantrasyonu

Çözelti stabilitesi çalışmasında numune ve standart çözeltileri, otomatik numune örnekleyicide 48 saat süresince +25C°'de (oda koşullarında) ve +4C°'de bekletildi. Tablo 4-19 ve Tablo 4-20'de sonuçlar verilmiştir.

Tablo 4-12: Akış Hızı değişikliğinde sistem uygunluk parametrelerindeki değişimler

Akış Hızı (mL/dakika)	Simetri Faktörü			Ayrım Faktörü			Teorik Plaka Sayısı		
	0.9	1.0	1.1	0.9	1.0	1.1	0.9	1.0	1.1
Tinidazol	1.07	1.06	1.05	11.5	11.21	10.6	1173356	1159989	1146945
Lidokain	1.23	1.22	1.22	11.5	11.21	10.6	120258	106274	98256

Tablo 4-13: Kolon Sıcaklığı değişikliğinde sistem uygunluk parametrelerindeki değişimler

Kolon Sıcaklığı (°C)	Simetri Faktörü			Ayrım Faktörü			Teorik Plaka Sayısı		
	20	25	30	20	25	30	20	25	30
Tinidazol	1.04	1.06	1.07	11.5	11.21	10.6	1156538	1159989	157351
Lidokain	1.20	1.22	1.24	11.5	11.21	10.6	106227	106274	1107206

Tablo 4-14: Hareketli faz tamponunun pH değışimi ile elde edilen sonuçlar

Hareketli Faz Tampon pH	Simetri Faktörü			Ayrım Faktörü			Teorik Plaka Sayısı		
	2.5	3.0	3.5	2.5	3.0	3.5	2.5	3.0	3.5
Tinidazol	1.06	1.06	1.06	10.9	11.21	9.2	1149887	1159989	1155558
Lidokain	1.20	1.22	1.24	10.9	11.21	9.2	106491	106274	110349

Tablo 4-15: Hareketli faz tampon konsantrasyonun değışimi ile elde edilen sonuçlar

Hareketli Faz Tampon Konsantrasyonu(g/L)	Simetri Faktörü			Ayrım Faktörü			Teorik Plaka Sayısı		
	1.10	1.36	1.62	1.10	1.36	1.62	1.10	1.36	1.62
Tinidazol	1.06	1.06	1.06	11.0	11.21	11.0	1157310	1159989	1157403
Lidokain	1.22	1.22	1.22	11.0	11.21	11.0	107791	106274	108024

Tablo 4-16: Kolon marka değışimi ile elde edilen sonuçlar

Kolon Marka	Simetri Faktörü		Ayrım Faktörü		Teorik Plaka Sayısı	
	Waters Symmetry C18	Phenomenex LUNA C18	Waters Symmetry C18	Phenomenex LUNA C18	Waters Symmetry C18	Phenomenex LUNA C18
Tinidazol	1.06	1.16	11.21	13.9	1159989	191636
Lidokain	1.22	1.28	11.21	13.9	106274	131222

Tablo 4-17: Filtre değişimi ile elde edilen sonuçlar (Standart)

Filtre Marka ve çözelti mL'si	Tinidazol Standart Alanı			Lidokain Standart Alanı		
	PVDF	Nylon	PTFE	PVDF	Nylon	PTFE
1 mL	2320935	2340248	2345486	1751554	1577507	1757476
2 mL	2326994	2344255	2344110	1749717	1722391	1756540
3 mL	2349980	2340029	2357235	1763841	1732769	1763525
4 mL	2348441	2343184	2358657	1762069	1735853	1761944
5 mL	2338474	2332771	2364992	1756288	1735853	1769141
6 mL	2338589	2347278	2350273	1755078	1732676	1759072
7 mL	2335078	2358252	2338957	1752633	1746645	1753493
8 mL	2327435	2337044	2343457	1745637	1756360	1755599
9 mL	2330092	2340304	2341207	1749404	1745969	1755081
10 mL	2333036	2337230	2339806	1750482	1747840	1753040

Tablo 4-18: Filtre değişimi ile elde edilen sonuçlar (Ovül Numunesi)

Filtre Marka ve Çözelti mL'si	Tinidazol Alanı			Lidokain Alanı		
	PVDF	Nylon	PTFE	PVDF	Nylon	PTFE
1 mL	2177868	2178728	2184334	1678112	1545239	1671350
2 mL	2184991	2185074	2187116	1677341	1625914	1673296
3 mL	2182609	2184506	2180913	1674811	1639680	1668955
4 mL	2181442	2185683	2179574	1673206	1647684	1667760
5 mL	2183983	2186069	2188956	1675286	1649104	1675706
6 mL	2181126	2183337	2189884	1670113	1653904	1676154
7 mL	2182226	2185964	2187454	1673386	1658283	1674213
8 mL	2185187	2181892	2204447	1673500	1655694	1687103
9 mL	2197040	2193701	2193780	1682812	1654739	1677118
10 mL	2184673	2203329	2185637	1674819	1665358	1672577

Tablo 4-19: + 4C °’deki Tinidazol ve Lidokain çözeltilerine ait çözelti stabilitesi sonuçları

Uygulama	Standart Çözeltisi		Ovül Numunesine ait Çözelti	
	Tinidazol	Lidokain	Tinidazol	Lidokain
0.Saat Başlangıç alanları	2312930	1762879	2372653	1841354
+4C° 48 saat alanları	2312896	1761356	2357082	1827605

Tablo 4-20: Oda sıcaklığındaki Tinidazol ve Lidokain çözeltilerine ait çözelti stabilitesi sonuçları

Uygulama	Standart Çözeltisi		Ovül Numunesine ait Çözelti	
	Tinidazol	Lidokain	Tinidazol	Lidokain
0.Saat Başlangıç alanları	2320170	1753014	2282169	1751889
+25 C° (Oda sıcaklığı) 48 saat alanları	2344877	1764309	2289634	1758130

Sonuç olarak numune ve standart çözeltileri +25 C° ve +4C°’de 48 saat boyunca stabil bulunmuştur. Filtre etkisinde naylon filtre kullanımında numune ve standart çözeltilerinin süzüntü miktarları arasında anlamlı bir fark görülmüştür. Bu nedenle süzüntü miktarları arasında anlamlı bir fark olmayan PVDF ve PTFE filtrelerinin kullanılması uygun görülmüştür. Bu iki filtre arasındaki seçim filtrelerin özellikleri göz önünde bulundurularak yapılmıştır. PTFE filtre politetrafloroetilen

yapıda bir filtredir. Özellikle polar sıvıların ve gazların süzülmesinde kullanılmaktadırlar. PVDF filtreler ise poliviniliden diflorür yapıda filtrelerdir. Filtre, materyali ile örnek arasındaki etkileşimi minimum olan ve geri kazanımı maksimum olan bir filtre olduğu için ve ayrıca apolar sıvılardaki yaygın kullanımı nedeni ile kullanımı çalışma için uygun bulunmuştur.



5. TARTIŞMA

Vajinit, vajinal mukozanın iltihabı ve jinekologlara sıklıkla başvuru sebeplerinden biridir. Mevcut çalışmalar gösteriyor ki ergenlik dönemindeki kadınların %90'unu vajinitten etkilenmektedir ayrıca olguların %30' luk kısmında iki ya da daha çok enfeksiyon görülmektedir. En sık görülen enfeksiyonlar; vajinal mantar enfeksiyonu, bakteriyel vajinozis ve trikomonas vajinalisdir. Mantar enfeksiyonunun etkeni çoğunlukla *Candida albicans* olarak bilinen maya mantarlarıdır. Buradaki vajinit çeşidi yetişkin kadınların hayatları süresince takriben %75'inde minimum bir defa olmaktadır, %40-50'sinde ise iki ya da daha çok defa tekrarlanmaktadır. Bakteriyel vajinoz ise doğurganlık dönemindeki kadınlarda sıklıkla olan bakteriyel vajinal enfeksiyon olup, normal vajinal flora değişerek, sağlıklı floradaki *Lactobacillus* yararlı bakterileri kaybolup diğer bakteriler artar. Cinsel yol vasıtasıyla bulaşan parazit *Trichomonas vaginalis* ise Trikomoniazis dir. *Trichomonas* paraziti özellikle *Gardnerella vaginalis* gibi anaerob bakterilerle birlikte bulunurlar. Özellikle vajinanın pH'nın asit ortamdan alkaliye dönüşmesi trikomonas parazit için üreme ortamı hazırlar. Mevcut üçlü kombinasyon olan tiokonazol,tinidazol ve lidokain etkin maddelerindeki farmasötik preparat, kandida vajinit, bakteriyel vajinozis ve trikomoniazis rahatsızlıkları üzerinde etki mekanizmasına sahiptir. Bu rahatsızlıklardan bakteriyel vajinozis ve trikomoniazis tıp dünyasında sıklıkla rastlanılan enfeksiyonlar olup, eğer hastada diğer bir enfeksiyon türü olan kandida vajinit mevcut değilse antiprotozoal ve antianaerobik etkiye sahip olan tinidazol ve impulsların oluşmasında ve iletilmesinde gerekli olan iyon akışını durduran lokal anestezik bir ajan olan Lidokain ikili kombinasyonu; tedavi için daha spesifik görülmüştür. Ovül farmasötik preparatındaki etkin maddelerin yanyana analizleri için spesifik bir (HPLC) yöntemi geliştirilmiştir.

Çalışmada en yüksek absorbands dalga boyları sırasıyla Tinidazol için 316 nm, Lidokain için 205 nm şeklinde belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda öncelikli olarak ayrılmanın en iyi olduğu, kuyruklanma faktörünün en uygun olduğu optimum kromatografik koşullar belirlenmiştir. Yapılan metot geliştirme çalışmalarında simetri faktörü Waters Symmetry ve Phenomenex LUNA C₁₈ kolonları için sistem uygunluk parametresi gereğini karşılıyor olsa da Phenomenex LUNA kolonunda değerler Waters Symmetry kolonuna göre daha yüksek

bulunduğu için C_{18} , 4,6 mm çapında, 250 mm uzunluğunda, 5 μ m partikül çaplı kolon olan (Waters Symmetry) kolonu ile çalışma gerçekleştirilmiştir. 10mM potasyum fosfat tamponu(pH: 3.0), asetonitril gradiyent elüsyonu hareketli faz seçilmiştir. 25C° kolon sıcaklığı ve 25C° numune bölme(oto örnekleyici) sıcaklığı, 1.0mL/dakika akış hızı kullanılarak PDA dedektörde 220nm dalgaboyunda elde edilmiştir. Alıkonma zamanları ise Tinidazol için 8.2 ve Lidokain için 6.5 dakika şeklinde tespit edilmiştir.

Yöntem validasyonunda seçicilik parametresinde etkin maddelerin, plasebo,çözücü ve metanol ile herhangi bir girişimde bulunmadığı ve etkin madde piklerinin saf olduğu; spektrumlar ile de gösterilmiştir.

Geliştirilen yöntem ile yapılan çalışmada doğrusal aralık, tinidazol için 75-195 μ g/mL ve lidokain için 25-65 μ g/mL şeklinde bulunmuştur Kesinlik parametresindeki tekrarlanabilirlik çalışmasında bağıl standart sapma tinidazol için % 0,305 ve lidokain için % 0,244'dür. Doğruluk çalışmasında geri kazanım değerleri tinidazol için %98.74 - %99.67 lidokain için %99.83-%100.33 olarak hesaplanmıştır. Çalışmada Sinyal/Gürültü değerinden hesaplanarak elde edilen teşhis ve tayin sınırları sırasıyla tinidazol için 0.05625 μ g/mL ve 0.225 μ g/mL; lidokain için 0.01875 μ g/mL ve 0.075 μ g/mL olarak hesaplanmıştır.

Sağlamlık parametresinde yapılan hareketli faz tampon pH'ı, kolon sıcaklığı, akış hızı, hareketli faz tampon konsantrasyonu, farklı markada kolon kullanımı değişimleri sistem uygunluk parametrelerinde anlamlı bir değişiklik oluşturmamıştır. Standart ve numune çözeltilerinde filtre etkisi çalışması yapılmış, süzüntü miktarının kayda değer bir değişim göstermediği PVDF filtre, metod için uygun bulunmuştur. Çözelti stabilitesi için yapılan çalışmalarda standart ve numune çözeltilerinin 48 saat süresince +25C°'de ve +4C°'de stabil kaldığı gösterilmiştir.

Literatür araştırmalarında Tinidazol ve lidokainin farmasötik preparatlarda yanyana analizlerine ait bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Her iki etken madde için yapılan çalışmalarda ortak olarak HPLC[14,31], HPLC/MS/MS[13,30] yöntemlerinin kullanıldığı, bunların dışında da kullanılan bir çok yöntemin olduğu belirlenmiştir. HPLC/MS/MS yöntemi ile metod geliştirme çalışmalarının yapılmamasının nedeni, her laboratuvarında kütle spektrofotometre cihazının maliyetli bir ekipman olması sebebi ile bulunmamasıdır. HPLCyöntemi[14,15,16,17,20,30] ile yapılan çalışmalar incelendiğinde, kolay

ulaşılabilirliği ve kullanılan kimyasallar ile malzemelerin daha ekonomik olması gibi avantajları göz önünde bulundurularak HPLC yöntemi ile metot geliştirilip valide edilmiştir. Tinidazol ve lidokainin farmasötik preparatlardaki(ovül) analizi için geliştirilerek valide edilen yöntem ile spesifik, doğru, duyarlı, stabil ve orijinal bir metot elde edilmiştir.



KAYNAKLAR

- [1] Taş E.E ve Yavuz Avşar A.F. (2014). *Bakteriyel Vajinozis*. Türkiye Klinikleri J Dermatol-Special Topics, 7(1):80-6. Erişim 08.01.2018, www.turkiyeklinikleri.com/article/en-bakteriyel-vajinozis-68301.html.
- [2] Günay T. ve Aksakoğlu G. (2002). *Bakteriyel Vajinozis*. Sürekli Tıp Eğitim Dergisi, 11(9):369. Erişim 08.01.2018, http://www.ttb.org.tr/STED/sted1002/bakteriyel_vajinozis.pdf.
- [3] Demirdağ S. (2015). *Trichomonas vaginalis'in aktin gen bölgesi kullanılarak PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism) ile moleküler tiplendirmesi*, Erişim 05.01.2018, <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp>
- [4] Dolowy M, Kulpinska-Kucia K. ve Pyka A. (2014). Validation of a thin-layer chromatography for the determination of hydrocortisone acetate and lidocaine in a pharmaceutical preparation. *Scientific World Journal*, doi:10.1155/2014/107879. Erişim 10.01.2018, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24526880>.
- [5] Youngvises N, Liawruangrath B. ve Liawruangrath S. (2003). Simultaneous micellar LC determination of lidocaine and tolperisone. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31(4):629-38. Erişim 10.01.2018, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12644189>
- [6] Pendela M., Kahsay G., Baekelandt I., Van Schepdael A. ve Adams E. (2011). Simultaneous determination of lidocaine hydrochloride, hydrocortisone and nystatin in a pharmaceutical preparation by RP-LC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56(3):641-4. Erişim 10.01.2018, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21794999>
- [7] Yang Y., Zhang W. ve Ye L. (2009). Simultaneous determination of prilocaine and lidocaine in transdermal receiving fluid using gas chromatography-mass spectrometry, *Chinese Journal of Chromatography*, 27(1):74-7. Erişim 10.01.2018, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19449545>

- [8] Pai P.N., Rao G.K., Srinivas B. ve Puranik S. (2008). *RPLC Determination of Tinidazole and Diloxanide Furoate in Tablets*, Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, **70**(5):670-2. Erişim 10.01.2018, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21394273>
- [9] Pharmacopoeia 9th ed., *Tinidazole*, 01/2008: 1271
- [10] Başaran F.(2012). *Bazı Antifungal İlaçların Ters Faz Sıvı Kromatografik Yöntemle Analizleri için Metot Optimizasyonu* . Erişim 10.01.2018, http://cdn.hitit.edu.tr/fbe/files/13625_1608261113940.pdf
- [11] Gynomax Vajinal Ovül Kısa Ürün Bilgisi. *Exeltis İlaç San. ve Tic. A.ř.* İlk yayın tarihi 24.07.2006.
- [12] İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı *Rx Media Pharma*
- [13] Wu L., Liu J., Zhang Y. ve Hou Y.(2012) Development of a HPLC/MS/MS method for simultaneous determination of tinidazole, dyclonine and chlorhexidine in rat plasma and its application in the pharmacokinetic research of a film-forming solution, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **62**:224-227. Erişim15.01.2018, <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0731708512000131>
- [14] Wang Y., Zhang P., Jiang N., Gong X., Meng L., Wang D. ve ark.(2012). Simultaneous quantification of metronidazole, tinidazole, ornidazole and morinidazole in human saliva. *Journal of Chromatography B*, **899**:27-30. Erişim 15.01.2018, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023212002577>
- [15] Alton K.B. ve Patrick J.E. (1979). High-Performance Liquid Chromatographic Assay for the Antiprotozoal Agent, Tinidazole, in Human Plasma. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **68**:599-601. Erişim 15.01.2018, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022354915426516#!>
- [16] Hackett L.P. ve Dusci L.J. (1979). Determination of metronidazole and tinidazole in human plasma using high- performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **175**:347-349. Erişim 15.01.2018, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967300894443>
- [17] Yin Z., Ma S., Wang J. ve Shang X. (2013). Simultaneous Determination of Matrine and Tinidazole in Compound Lotion by RH-HPLC Method. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, doi:10.1155/2013/185706. Erişim 15.01.2018,

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23971001>

[18] Belal F., Sharaf El-Din M.K., Eid M.I. ve El- Gamal R.M. (2014). Micellar HPLC and derivative spectrophotometric methods for the simultaneous determination of fluconazole and tinidazole in pharmaceuticals and biological fluids. *Journal of Chromatographic Science*, **52**(4):298-309. Erişim 16.01.2018,

[19] Meshram D.B., Bagade S.B. ve Tajne M.R. (2009). Simple HPLC method for simultaneous estimation of fluconazole and tinidazole in combined dose tablet. *Journal of Chromatographic Science*, **47**(10):885-8. Erişim 16.01.2018,

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19930800>

[20] Rajnarayan K., Chaluvadi M.R., alapati V.R., Mada S.R., Jayasagar G. ve Krishna D.R. (2002) *Die Pharmazie*, **57**(8):535-7. Erişim 17.01.2018,

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12227192>

[21] Alnajjar A., AbuSeada H.H. ve Idris A.M. (2007). Capillary electrophoresis for the determination of ofloxacin and tinidazole in pharmaceuticals with multi- response optimization. *The International Journal of Pure and Applied Analytical Chemistry*, **72**:842-846. Erişim 20.01.2018,

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914006007612>

[22] López-Martínez L., Luna Vázquez F.J. ve López-de-Alba P.L. (1997) Simple spectrophotometric determination of tinidazole in formulation and serum. *Analytica Chimica Acta*, **340**:241-244. Erişim 20.01.2018,

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267096005089#!>

[23] Slamnik M. (1976). Determination of Tinidazole in Tablets by dc Polarography. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **65**:736-737. Erişim 20.01.2018

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022354915407762>

[24] Pharmacopoeia 9th ed., *Lidocaine HCl*, 01/2017: 0583

[25] MİXOVUL ovül Farmakolojik Özellikler. *Bilim İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş.* İlk yayın tarihi 10.12.2012

[26] <https://www.tiplopedi.com/Lidokain>

[27] DİFESTOL Jel Farmakolojik Özellikler. Münir Şahin İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş. İlk yayın tarihi 18.05.2015

[28] PROCTO-GLYVENOL %5+%2 Krem Kısa Ürün Bilgisi. Recordati İlaç San. Ve Tic. A.Ş. İlk yayın tarihi 18.05.2011

[29] Doğanay A., Koksel B., Gundoğdu S.O. ve Capan Y. (2018) Simultaneous Determination of Dexpanthenol, Lidocaine Hydrochloride, Mepyramine, Maleate and their Related Substances by a RP-HPLC Method in topical Dosage Forms. *Journal of Chromatographic Science*, **56**(10):903-911. Erişim 20.11.2018,

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30085004>

[30] Mohamed D. ve Kamal M. (2018) Enhanced HPLC-MS/MS method for the quantitative determination of the co-administered drugs ceftriaxone sodium and lidocaine hydrochloride in human plasma following an intramuscular injection and application to a pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*, doi:10.1002/bmc.4322, Erişim 20.11.2018,

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29934999>

[31] Grigoriev A., Nikitina A., Yaroshenko I. ve Sidorova A. (2016) Development of a HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of nifedipine and lidocaine in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **131**:13-19. Erişim 22.01.2018,

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27521985>

[32] Bebawy L.I., Elghobashy M.R., Abbas S.S. ve Shokry R.F. (2016) Chromatographic Determination of Aminoacridine Hydrochloride, Lidocaine Hydrochloride and Lidocaine Toxic Impurity in Oral Gel. *Journal of Chromatographic Science*, **54**(4):492-9. Erişim 22.01.2018,

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26671412>

[33] Pendela M., Kahsay G., Baekelandt I., Van Schepdael A. ve Adams E. (2011) Simultaneous determination of lidocaine hydrochloride, hydrocortisone and nystatin in a pharmaceutical preparation by RP-LC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **56**(3):641-644. Erişim 22.01.2018,

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0731708511003724>

- [34] Youngvises N., Liawruangrath B. ve Liawruangrath S. (2003) Simultaneous micellar LC determination of lidocaine and tolperisone. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*,**31**(4):629-638. Erişim 23.01.2018,
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0731708502006933>
- [35] Belal T.S. ve Haggag R.S. (2012) Gradiyent HPLC-DAD stability indicating determination of miconazole nitrate and lidocaine hydrochloride in their combined oral gel dosage form. *Journal of Chromatographic Science*,**50**(5):401-9.Erişim 23.01.2018,
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22407005>
- [36] Breuer H. (1982). Gas-liquid chromatographic determination of lidocaine in cat plasma using mepivacaine as internal standard. *Journal of Chromatography B*,**231**(1):65-72. Erişim 23.01.2018,
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378434700805095>
- [37] Rahbar N., Ramezani Z. ve Ghanavati J. (2016) CuO-nanoparticles modified carbon paste electrode for square wave voltammetric determination of lidocaine: Comparing classical and Box-Behnken optimization methodologies.*Chinese Chemical Letters*, **27**(6):837-842. Erişim 23.01.2018,
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1001841716300912>
- [38]<http://merlab.kastamonu.edu.tr/cihaz/hplc-yuksek-performansli-sivi-kromatografisi/>
- [39] Aletli Analiz Yöntemleri, Erişim 10.10.2018,
http://web.hitit.edu.tr/dersnotlari/gokcemerey_13.10.2015_108A.pdf
- [40] Arlab viii. Hücresel, Moleküler ve Analitik Teknikler Kursu (2012), Erişim 10.10.2018,
http://webb.deu.edu.tr/arlab/images/arlab_kurs_kitapciki_2012.pdf
- [41] Enstrümental Analiz Ders Notları , Erişim 11.10.2018,
http://www.profdrmehmetyaman.com/ders_notlari/ens.pdf
- [42] Aletli Analiz Laboratuvarı , T.C. Anadolu Üniversitesi yayını no: 2092, Açıköğretim Fakültesi yayını no: 1123
- [43] Sıvı Kromatografisi, Erişim 11.10.2018,

http://besergil.cbu.edu.tr/25_BOLUM_8.pdf

[44]Söğütertaş Ö. ve Kayalı A. (2005)Ankara Ecz. Fak. Derg. 34 (1) 37 – 57

[45]United States Pharmacopoeia 40th ed., 621 Chromatography, USP 40-NF 35: 508

[46]ICH Q2 (R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. 2005

Kasım. Erişim 10.11.2015;

http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf

[47] Shabir G.A. (2004). Step-by-step analytical methods validation and protocol in the quality system compliance industry.Erişim 10.02.2018

<https://www.semanticscholar.org/paper/Step-by-step-analytical-methods-validation-and-in-Shabir/68718039ed36445c5e02c1100f21632f6858eff1#citing-papers>

HAM VERİLER



FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

PATENT HAKKI İZİNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

TİNİDAZOL “VE” LİDOKAİNİN “YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİ İLE YANYANA” ANALİZLERİ

ORIJINALLIK RAPORU

% 8	% 2	% 1	% 8
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 6
2	polen.itu.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
3	Submitted to Marmara University Öğrenci Ödevi	% 1
4	Submitted to Konya Necmettin Erbakan University Öğrenci Ödevi	<% 1
5	cdn.hitit.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	idus.us.es İnternet Kaynağı	<% 1
7	merlab.kastamonu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
8	Submitted to Ankara University Öğrenci Ödevi	<% 1

9 Submitted to TechKnowledge Turkey <%1
Öğrenci Ödevi

10 www.science.gov <%1
İnternet Kaynağı

Alıntıları çıkart üzerinde Eşleşmeleri çıkar < 5 words
Bibliyografyayı Çıkart üzerinde

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Derya	Soyadı	GÖNÜLLÜ AYHAN
Doğ. Yeri	Akşehir	Doğ. Tar.	02.01.1986
Email	deryagonullu8@gmail.com	Uyruğu	T.C.

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	Hacettepe Üniversitesi	2009
Lise	Aliğa Alp Oğuz Anadolu Lisesi	2003

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl -Yıl)
.	Ar-Ge Sorumlusu	Exeltis İlaç	2016-devam ediyor
.	Ar-Ge Uzmanı	Deva İlaç	2012-2016
.	Analist	Koçak Farma	2010-2012

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi	-	-

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	-	-	-
(Diğer) Puanı	-	-	-

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

İngilizce Öğretmenliği Pedagojik Formasyon Eğitimi Sertifikası(2009)

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Tenis oynamak,seyahat etmek,yoga yapmak