

**TAMSULOSİN, SİLODOSİN VE SOLİFENASİN SÜKSİNATIN
TEKLİ VE KOMBİNE KULLANIMINDA FARKLI
ORTAMLARDA (BOŞ İNSAN PLAZMASI, HASTA PLAZMASI,
RAT PLAZMASI VE FARMASÖTİK PREPARATLARDA)
MİKTAR TAYİN YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLİP, VALİDE
EDİLMESİ VE METABOLOM ANALİZLERİNİN YAPILMASI**

Tuğrul Çağrı AKMAN

Analitik Kimya Anabilim Dalı

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU**

Doktora Tezi-2019

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

**TAMSULOSİN, SİLODOSİN VE SOLİFENASİN
SÜKSİNATIN TEKLİ VE KOMBİNE KULLANIMINDA
FARKLI ORTAMLARDA (BOŞ İNSAN PLAZMASI,
HASTA PLAZMASI, RAT PLAZMASI VE FARMASÖTİK
PREPARATLARDA) MİKTAR TAYİN YÖNTEMLERİNİN
GELİŞTİRİLİP, VALİDE EDİLMESİ VE METABOLOM
ANALİZLERİNİN YAPILMASI**

Tuğrul Çağrı AKMAN

**Analitik Kimya Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU**

**ERZURUM
2019**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

**TAMSULOSİN, SİLODOSİN VE SOLİFENASİN SÜKSİNATIN
TEKLİ VE KOMBİNE KULLANIMINDA FARKLI ORTAMLARDA
(BOŞ İNSAN PLAZMASI, HASTA PLAZMASI, RAT PLAZMASI
VE FARMASÖTİK PREPARATLARDA) MİKTAR TAYİN
YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLİP, VALİDE EDİLMESİ VE
METABOLOM ANALİZLERİNİN YAPILMASI**

Tuğrul Çağrı AKMAN

Tez Savunma Tarihi : 05/12/2019

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Onur ŞENOL (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Irmak Ferah OKKAY (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Mehtap UYSAL (Erzincan Binali Yıldırım Üniv.)

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Muhammed Fatih POLAT (Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki Jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Duygu ARIKAN
Enstitü Müdürü

Doktora Tezi
ERZURUM – 2019

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	VIII
ÖZET	IX
ABSTRACT.....	X
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XV
TABLolar DİZİNİ	XIX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Alt Üriner Sistem Semptomları	5
2.2. Aşırı Aktif Mesane.....	6
2.3. Benign Prostat Hiperplazisi	7
2.3.1. BPH Tedavisi	9
2.3.2. Medikal Tedavi	10
2.3.2.1. Muskarinik reseptör antagonistleri (MRA).....	10
2.3.2.2. Alfa-blokerler.....	11
2.3.2.3. Kombine İlaç Tedavisi	12
2.4. İlaçlar	13
2.4.1. Silodosin	13
2.4.1.1. Silodosinin Kimyasal Yapısı ve Özellikleri.....	13

2.4.1.2. Silodosinin Farmakodinamik Özellikleri	13
2.4.1.3. Silodosinin Farmakokinetik Özellikleri	14
2.4.1.4. Silodosinin Uygulanışı	14
2.4.2. Tamsulosin	14
2.4.2.1. Tamsulosin'in Kimyasal Yapısı ve Özellikleri	14
2.4.2.2. Tamsulosin'in Farmakodinamik Özellikleri	15
2.4.2.3. Tamsulosin'in Farmakokinetik Özellikleri	15
2.4.2.4. Tamsulosin'in Uygulanışı	15
2.4.3. Solifenasin Süksinat	15
2.4.3.1. Solifenasin Süksinat'ın Kimyasal Yapısı ve Özellikleri	15
2.4.3.2. Solifenasin Süksinat'ın Farmakodinamik Özellikleri	16
2.4.3.3. Solifenasin Süksinat'ın Farmakokinetik Özellikleri	16
2.4.3.4. Solifenasin Süksinat'ın Uygulanışı	17
2.5. Litaratür Özetleri	17
2.5.1. Tamsulosin, Silodosin ve Solifenasin Süksinat ile İlgili Analiz Çalışmaları	17
2.5.1.1. Silodosin	17
2.6. İlaç Miktar Tayininde ve Metabolomiks Çalışmalarında Kullanılan Analitik	
Yöntemler	45
2.6.1. Spektroskopi Yöntemleri	45
2.6.1.1. Işının Absorplanması ve Lambert-Beer Yasası	46
2.6.1.2. Lambert-Beer Yasasından Sapmalar	48
2.6.1.3. Ultraviyole-Görünür Bölge Spektrofotometreleri	48

2.6.2. Kromatografik Yöntemler	50
2.6.2.1. Yüksek Performans Sıvı Kromatografi (HPLC).....	50
2.6.2.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Cihazı	51
2.6.2.3. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (LC-MS)	53
2.6.3. Kütle Spektrometrisi	54
2.6.3.1. Numune Giriş Sistemi.....	55
2.6.3.2. İyonlaştırıcı	55
2.6.3.3. Kütle Analizörü.....	56
2.6.3.4. Dedektör.....	56
2.6.3.5. Yüksek Vakum Sistemi.....	57
2.6.4. Sıvı Kromatografi Kuadrupole Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi	57
2.7. Yöntem Geliştirme ve Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)	58
2.7.1. Yöntem Geliştirme	58
2.7.2. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon).....	58
2.7.2.1. Doğruluk	59
2.7.2.2. Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik	59
2.7.2.3. Kararlılık/Stabilite.....	60
2.7.2.4. Doğrusallık ve Çalışma aralığı.....	60
2.7.2.5. Duyarlılık	60
2.7.2.6. Seçicilik / Belirleyicilik	61
2.7.2.7. Sağlamlık	61
2.7.2.8. Geri Kazanım	62

2.8. Omiks Teknolojisi.....	62
2.8.1. Metabolomiks	63
2.8.2. İnsan Metabolom Projesi	66
2.8.3. Metabolomiks Teknolojisinin Kullanım Alanları.....	66
2.8.4. Metabolitleri Tanımlamada Kullanılan Analitiksel Yöntemler	68
2.8.5. Metabolomiks Çalışmalarında Kullanılan İstatiksel Yöntemler.....	69
2.8.6. Veri Analizi ve Algoritma Seçimi	69
3. MATERYAL VE METOD	71
3.1. Kimyasal Maddeler ve Cam Malzemeler	71
3.2. Cihazlar	72
3.3. Yöntemler	73
3.3.1. UV-Görünür Bölge Spektroskopi Yöntemi	73
3.3.2. 1D-Türev ve 2D-Türev Spektroskopi Yöntemleri.....	73
3.3.3. Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	74
3.3.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Yöntemi.....	77
3.3.4.1. HPLC Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	78
3.3.4.2. HPLC Yönteminde Farmasötik Preparat Çözeltilerinin Hazırlanması	79
3.3.4.3. Silodosin, Tamsulosin ve Solifenasin Süksinatın Plazmadan Ekstraksiyon Prosesi	81
3.3.5. Metabolomiks Çalışması.....	81
3.3.5.1. Genel Deneysel Prosedür	81
3.3.5.2. Hayvan Deneyleri	82

3.3.5.3. Kan Numunelerinin Hazırlanması ve Metabolit Ekstraksiyonu	83
3.3.5.4. Q-TOF LC/MS Sistemi İçin Çözeltilerin Hazırlanması	84
3.3.5.5. Hedeflenmemiş Metabolomiks Çalışmalarında Yöntem Geçerlilik Testi	84
3.3.5.6. Sıvı Kromatografisi İle Dört Kutuplu Uçuş Zamanı Kütle Spektroskopisi	
Yöntem Şartları.....	85
3.3.5.7. Metabolit Profillemeye Kullanılan Çoklu Analiz ve İstatistiksel Veri Analizi.....	86
4. BULGULAR.....	87
4.1. UV-Görünür Bölge, Birinci-Türev ve İkinci-Türev Spektroskopisi Yöntemleri	87
4.1.1. UV-Görünür Bölge Spektroskopisi Yöntem Geçerlilik Testleri	87
4.1.1.1. Özgünlük (Belirleyicilik).....	87
4.1.1.2. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı	87
4.1.1.3. Doğruluk/ Kesinlik	89
4.1.1.4. Teşhis Limiti (LOD) ve Miktar Tayin Limiti (LOQ)	90
4.1.1.5. Analitik Geri Kazanım.....	91
4.2. Birinci Derece-Türev (1D-Türev) ve İkinci Derece-Türev (2D-Türev).....	92
Spektroskopisi Yöntemleri	92
4.2.1. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)	92
4.2.1.1. Özgünlük (Belirleyicilik).....	92
4.2.1.2. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı	94
4.2.1.3. Doğruluk/Kesinlik	97
4.2.1.4. Teşhis limiti (LOD) ve Miktar tayin limiti (LOQ)	101
4.2.1.5. Analitik Geri Kazanım.....	102

4.3. Kromatografik Yöntemler.....	105
4.3.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)	
.....	105
4.3.1.1. Özgünlük (Belirleyicilik).....	105
4.3.1.2. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı	107
4.3.1.3. Doğruluk ve Kesinlik.....	111
4.3.1.4. Teşhis limiti (LOD) ve Miktar tayin limiti (LOQ)	115
4.3.1.5. Analitik ve Plazma Geri Kazanımı	118
4.4. Yöntemlerin Gerçek Numunelere Uygulama	122
4.4.1. Urorec® Yumuşak Kapsül.....	122
4.4.2. Flomax MR® Yumuşak Kapsül	123
4.4.3. Kinzy® Tablet	125
4.5. Metabolomiks	127
4.5.1. Plazma Örneklerinin Metabolik Veri Setleri ve Analitik Yaklaşımı	127
4.5.2. Kemometrik Analiz.....	133
4.5.3. Metabolitlerin Yolak Analizi	136
4.5.3.1. Silodosin	137
4.5.3.2. Tamsulosin.....	143
4.5.3.3. Solifenasin Süksinat.....	152
5. TARTIŞMA	160
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	189
KAYNAKLAR	191

EKLER	218
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	218
EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU	219
EK-3. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	221

TEŞEKKÜR

Bana güvenerek akademik hayata adım atmama imkan tanıyan, değerli bilgi ve deneyimleri ile akademik anlamda en iyi şekilde yetişmemi sağlayan, doktora tezimin her aşamasında ilgi ve fikirlerini esirgmeden çalışmalarına ışık tutan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU'na en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Başta kromatografik çalışmalarım olmak üzere doktora eğitimimde ve akademik çalışmalarımda gece gündüz demeden yardımını ve desteğini esirgemeyen, değerli hocam Doç. Dr. Alptuğ ATİLA'ya saygı ve şükranlarımı sunarım. Metabolomiks çalışmalarımda bana yol gösteren, bu alan ile ilgili bilgi birikimini bana aktararak ufkumu açan, doktora eğitimim boyunca her anlamda bana yardımcı olan sayın Dr. Öğr. Üyesi Onur ŞENOL'a saygı ve şükranlarımı sunarım. Doktora eğitimimde her zaman yanımda olan Dr. Emrah YAMAN ve Uzm. Nurgül KIZILTAŞ'a, doktora ders döneminde yardımcı olan Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU'na ve hayvan çalışmalarında bana yardımcı olan Doç. Dr. Beyzagül ERKAYMAN'a teşekkürlerimi sunarım.

5 yıl boyunca bana evlerini açan, Erzurum'da yalnız bırakmayan, her daim desteklerini hissettiğim kız kardeşim Tuğçe Gülden AVCILAR ve Ecz. Arş. Gör. İsmail Çağrı AYDIN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Son olarak, emeklerini, ilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen başta babam Ruhi AKMAN olmak üzere sevgili ve değerli ailelerimin her bir üyesine, hayatım boyunca varlıkları ile bana güç ve sabır veren, hayatımın merkezinde olan değerli eşim Ebru AKMAN ve oğlum Alptuğ Ali AKMAN'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Tuğrul Çağrı AKMAN

ÖZET

TAMSULOSİN, SİLODOSİN VE SOLİFENAZİN SÜKSİNATIN TEKLİ VE KOMBİNE KULLANIMINDA FARKLI ORTAMLARDA (BOŞ İNSAN PLAZMASI, HASTA PLAZMASI, RAT PLAZMASI VE FARMASÖTİK PREPARATLARDA) MİKTAR TAYİN YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLİP, VALİDE EDİLMESİ VE METABOLOM ANALİZLERİNİN YAPILMASI

Amaç: Bu çalışmada, tamsulosin, silodosin ve solifenasin süksinatın tekli ve eşzamanlı olarak farklı ortamlarda miktar tayini için yeni analitik yöntemlerin geliştirilmesi ve ayrıca tamsulosin, silodosin ve solifenasin süksinatın oral yoldan kronik olarak uygulandığı ratların metabolom profillerinin çıkarılması amaçlandı.

Materyal ve Metot: %1.0 TFA çözeltisi ile hazırlanan her üç etken madde çözeltileri UV-Görünür Bölge, 1D-Türev ve 2D-Türev Spektroskopi yöntemleriyle spektrumları alındı ve absorbanları okundu. HPLC yönteminde ise hareketli fazla hazırlanan numuneler 10.0 mM amonyum format tamponu (pH: 4): asetonitril: metanolden (55:32.5:12.5 h/h/h) oluşan hareketli faz, C₁₈ kolon, 30 ° C, 1 mL/dk akış hızı ve 210 nm dalga boyu kullanılarak analiz edildi. Geliştirilen dört yöntemin geçerlilik testleri yapıldı ve yöntemler ticari farmasötik preparatlara uygulandı. Ayrıca üç maddenin plazmadan ekstraksiyonu için yeni bir prosedür geliştirildi. Metabolomiks çalışmasında, alınan rat plazma örneklerinden elde edilen ekstraktlar hareketli faz içerisinde çözüldükten sonra LC/QTOF-MS cihazı ile pozitif iyon modunda analiz edildi. Analiz sonuçları çoklu değişkenli veri analiz yöntemleri kullanılarak değerlendirildi.

Bulgular: Geliştirdiğimiz yöntemler üç etken maddenin gerçek numunelere uygulandığında %93.2-103.2 arasında geri kazanım elde edildi. Yöntemlerin günüçi ve günler arası kesinlik ve doğruluk değerleri %8'den düşük bulundu. Plazma katım yapılan etken maddelerin önerilen ekstraksiyon prosedürüyle geri kazanımı silodosin, tamsulosin ve solifenasin için sırası ile %92.9-99.4, 93.9-100.4 ve 93.1-98.1'dir. LC/QTOF-MS ile analiz edilen üç ilacın uygulandığı grupların sonuçları kontrol grupları karşılaştırıldı ve istatistiksel olarak silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat grupları için sırasıyla anlamlı 41, 35 ve 43 tane metabolit tespit edilip tanımlandı ve metabolitlerin ilişkili olduğu yollar analiz edildiğinde gliserofosfolipid, araşidonik asit, sfingolipid, glutamat, retinol, tiamin metabolizması ve aminoasit-tRNA biyosenteziyle anlamlı derecede ilişkili olduğu görüldü.

Sonuç: Geliştirilip geçerlilik testleri yapılan yöntemlerle üç etken maddenin piyasada mevcut farmasötik preparatlarda ve katım yapılan plazmada miktar tayinleri yapıldı. Çalışma sonucunda, analitik yöntemlerin kalite kontrol çalışmalarında ve önerilen ekstraksiyon prosedürünün ise klinik çalışmalarında başarıyla uygulanabileceği sonucuna varıldı. Metabolomiks çalışmasında her madde için tanımlanan metabolitlerin ve rat metabolizmasında gliserofosfolipid, araşidonik asit, sfingolipid, glutamat, retinol, tiamin metabolizması ve aminoasit-tRNA biyosentezinde meydana gelen değişiklikler ileri dönemde yapılacak araştırmalara yol göstereceği kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Metabolomiks, silodosin, solifenasin süksinat, tamsulosin, LC/QTOF-MS, validasyon.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF QUANTITATIVE ANALYSIS METHODS FOR SINGLE AND COMBINED FORM OF TAMSULOSIN, SILODOSIN AND SOLIFENACIN SUCCINATE IN DIFFERENT MATRICES (BLANK HUMAN PLASMA, PATIENT PLASMA, RAT PLASMA AND PHARMACEUTICAL FORMULATIONS) AND PERFORMING THEIR METABOLOME ANALYSIS

Aim: In this study, it is aimed to develop new analytical methods for single and simultaneous quantification of tamsulosin, silodosin and solifenacin succinate. In addition, it was aimed to obtain the metabolome profiles of rats which were administered orally by tamsulosin, silodosin and solifenacin succinate.

Materials and Methods: In the UV-Visible Spectrophotometry method, the absorbances of the samples prepared with %1 TFA solution were measured by UV-Visible, 1D- and 2D-derivative spectrophotometric methods. In HPLC study; Samples prepared with phase were analyzed by using mobile phase containing 10 mM ammonium formate buffer (pH: 4): acetonitrile: methanol (55: 32.5: 12.5 v / v), C18 column at 30 ° C, 1 mL / min flow rate and 210 nm wavelength. Validation tests of the four developed methods were performed and the methods were applied to commercial pharmaceutical preparations. Furthermore, a new procedure for plasma extraction of three active substances was developed. In the metabolomix study, extracts obtained from rat plasma samples were dissolved in mobile phase and analyzed in positive ion mode by LC/QTOF-MS. The results of the analysis were evaluated using multivariate data analysis methods.

Results: When the methods we developed were applied to real samples of the three active substances, recovery of %93.2-103.2 was achieved. Intra-day and inter-day accuracy and precision of the methods were found to be less than %8 for each method. The recovery of the active substances from plasma is %92.9-99.4, 93.9-100.4 and 93.1-98.1 for silodosin, tamsulosin and solifenacin, respectively. The results obtained by LC/QTOF-MS of the drug groups were compared with results of the control groups, and statistically significant 41, 35 and 43 metabolites were identified for the silodosin, tamsulosin and solifenacin succinate groups, respectively. The pathways to which metabolites are related were found to be significantly associated with glycerophospholipid, arachidonic acid, sphingolipid, glutamate, retinol, thiamine metabolism and aminoacyl-tRNA biosynthesis.

Conclusion: Using the methods developed and validation tests, quantification of three active substances in the pharmaceutical preparations and the plasma which were spiked was performed. As a result of the study, it was concluded that analytical methods can be used in quality control studies and the proposed extraction procedure can be applied successfully in clinical studies. We believe that metabolites defined for each substance in metabolomics and changes in glycerophospholipid, arachidonic acid, sphingolipid, glutamate, retinol, thiamine metabolism and aminoacyl-tRNA biosynthesis in rat metabolism will lead to further researches.

Keywords: Metabolomics, silodosin, solifenacin succinate, tamsulosin, LC/QTOF-MS, validation.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

λ	: Dalga Boyu
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat Derece
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
1D-	: Birinci Türev
2D-	: İkinci Türev
5ARI	: 5 Alfa-Redüktaz İnhibitörleri
A	: Absorbans
AAM	: Aşırı Aktif Mesane
AUC	: Eğri Altında Kalan Alan
AÜSS	: Alt Üriner Sistem Semptomları
BH	: Bağlı Hata
BPH	: Benign Prostat Hiperplazisi
BSS	: Bağlı Standart Sapma
CE-MS	: Kapiller Elektforez-Kütle Spektroskopisi
CI	: Kimyasal İyonizasyon
cm	: Santimetre
C_{max}	: Maksimum Plazma Derişimi
DA	: Doğrusal Aralık
DAD	: Diyod Array Dedektör
dak	: Dakika
ESI	: Elektro Sprey İyonizasyon
FDA	: Gıda ve İlaç İdaresi

g	: Gram
GC	: Gaz Kromatografisi
GC-MS	: Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
GK	: Geri Kazanım
h	: Hacim
HMDB	: İnsan Metabolom Veri Tabanı
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPLC-MS	: Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi-Kütle Spekt.
HPTLC	: Yüksek Performans İnce Tabaka Kromatografisi
ICH	: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı
IM	: İntramüsküler
IR	: İnfrared
IS	: İç standart
kV	: Kilo-Volt
L	: Litre
LC	: Sıvı Kromatografisi
LC/QTOF-MS	: Sıvı Kromatografisi Dört Kutuplu Uçuş Zamanı Kütle Spekt.
LC-MS	: Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografisi-Ardışık Kütle Spektrometresi
LLOQ	: Alt Ölçme Limiti
LOD	: Teşhis Limiti
LOQ	: Miktar Tayin Limiti
M	: Molarite
m/z	: Kütle/Yük
MEKC	: Kombine Miyellar Elektrokinetik Kromatografi

mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
mmol	: Milimol
MRA	: Muskarinik Reseptör Antagonistleri
MRM	: Çoklu Reaksiyon İzlemesi
MS	: Kütle Spektrometresi
MTBE	: Metil Tersiyer Butil Eter
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
OPLS-DA	: Ortogonal Kısmi En Küçük Kareler Diskriminant Analizi
PCA	: Temel Bileşen Analizi
PDE5	: Fosfodiesteraz 5 İnhibitörleri
PLS-DA	: Kısmi En Küçük Kareler Diskriminant Analizi
PSA	: Prostat Spesifik Antijen
QC	: Kalite Kontrol
R	: Korelasyon Katsayısı
RMSEC	: Çapraz Doğrulamanın Karekök Ortalama Hatası
RMSECV	: Çapraz Validasyonun Karekök Ortalama Hatası
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
S/G	: Sinyal/Gürültü Oranı
S_a	: Kaymanın Standart Sapması
S_b	: Eğimin Standart Sapması

SS	: Standart Sapma
T	: Geçirgenlik
t_{1/2}	: Yarılanma Ömrü
TFA	: Trifloro Asetik Asit
TIS	: Turbo Ion Spray
TLC	: İnce Tabaka Kromatografisi
T_{max}	: Doruk Plazma Derişiminine Ulaştığı Süre
UHPLC	: Ultra Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
UV	: Ultra Viyole
UV/ VIS	: Ultra Viyole/ Görünür Bölge
V	: Volt

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. AÜSS patogenezinde rol oynayabilen faktörler ⁴	5
Şekil 2.2. BPH tedavi algoritması	9
Şekil 2.3. Silodosinin molekül yapısı	13
Şekil 2.4. Tamsulosin'in molekül yapısı	14
Şekil 2.5. Solifenasin süksinatın molekül yapısı	16
Şekil 2.6. Elektromanyetik ışınların sistematik olarak tanımlanması	46
Şekil 2.7. Elektronik enerji seviyeleri	47
Şekil 2.8. Elektromanyetik ışının ortamdan geçişi	48
Şekil 2.9. Spektrofotometrenin şematik gösterimi	49
Şekil 2.10. Yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazının şematik görünüşü	51
Şekil 2.11. HPLC cihazı	52
Şekil 2.12. Kütle analizörünün şematik gösterimi	56
Şekil 2.13. QTOF'un şematik gösterimi	58
Şekil 2.14. -Omiks teknolojileri	63
Şekil 2.15. Metabolomik yaklaşımlar	65
Şekil 3.1. Metabolomiks genel deneysel prosedürü	82
Şekil 4.1. UV-Görünür Bölge spektroskopisi spektrumları	87
Şekil 4.2. UV-Görünür Bölge Spektroskopi yöntemiyle elde edilen kalibrasyon eğrileri	88
Şekil 4.3. Kalite kontrol çözeltilerinin UV-Görünür Bölge Spektroskopi spektrumları	89
Şekil 4.4. 1D-Türev Spektroskopi spektrumları	93
Şekil 4.5. 2D-Türev Spektroskopi spektrumları	94
Şekil 4.6. 1D-Türev ve 2D-Türev Spektroskopi yöntemi ile elde edilen silodosin	

standart çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrileri	95
Şekil 4.7. 1D-Türev ve 2D-Türev Spektroskopi yöntemi ile elde edilen tamsulosin	
standart çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrileri	96
Şekil 4.8. 1D-Türev Spektroskopi yöntemi ile elde edilen solifenasin süksinat standart	
çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrileri	96
Şekil 4.9. Kalite kontrol çözeltilerinin 1D-Türev ve 2D-Türev spektrumları	99
Şekil 4.10. Standart çalışma çözeltilerinin HPLC kromatogramları	106
Şekil 4.11. Plazma çözeltilerinin HPLC kromatogramları	107
Şekil 4.12. Standart çalışma çözeltilerinin HPLC yöntemi ile elde edilen kalibrasyon	
eğrileri.....	108
Şekil 4.13. Karışım halindeki çözeltilerin HPLC yöntemi ile elde edilen kalibrasyon	
eğrileri.....	108
Şekil 4.14. Plazma çözeltilerinin HPLC yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrileri .	110
Şekil 4.15. Karışım halindeki etken maddelerin plazma çözeltilerinin HPLC yöntemi ile	
elde edilen kalibrasyon eğrileri.....	110
Şekil 4.16. Standart maddelerin kalite kontrol çözeltilerinin HPLC kromatogramları.	112
Şekil 4.17. Plazma kalite kontrol çözeltilerinin HPLC kromatogramları.....	112
Şekil 4.18. Urorec® kapsül çözeltilerinin spektroskopi yöntemlerinin spektrumları....	122
Şekil 4.19. Urorec® kapsül çözeltilerinin HPLC kromatogramları.....	123
Şekil 4.20. Flomax MR® kapsül çözeltilerinin spektroskopi yöntemlerinden elde edilen	
spektrumları	124
Şekil 4.21. Flomax MR® 0.4 mg kapsül çözeltilerinin HPLC kromatogramı	124
Şekil 4.22. Kinzy® 5 mg Tablet çözeltilerinin Spektroskopi yöntemlerinden elde edilen	
spektrumları	126
Şekil 4.23. Kinzy® 5mg Tablet çözeltilerinin HPLC kromatogramları.....	126

Şekil 4.24. İlaç ve kontrol gruplarının OPLS-DA skor grafiği	133
Şekil 4.25. Silodosin ve kontrol gruplarına ait ROC eğileri.....	135
Şekil 4.26. Tamsulosin ve kontrol gruplarına ait ROC eğileri	135
Şekil 4.27. Solifenasin süksinat ve kontrol gruplarına ait ROC eğileri.....	136
Şekil 4.28. Silodosin plazma örneklerinde tanımlanan metabolitlerin anlamlı derecede ilişkili oldukları yolların etki değerleri	138
Şekil 4.29. Silodosin uygulanan rat grubunda Gliserofosfolipit Metabolizmasında etkili metabolitler	139
Şekil 4.30. Silodosin uygulanan rat grubunda Sistein ve Metionin Metabolizmasında etkili metabolitler	140
Şekil 4.31. Silodosin uygulanan rat grubunda Araşidonik Asit Metabolizmasında etkili metabolitler	141
Şekil 4.32. Silodosin uygulanan rat grubunda Sfingolipit Metabolizmasında etkili metabolitler	142
Şekil 4.33. Tamsulosin uygulanan ratların plazma örneklerinde tanımlanan metabolitlerin yollar etki değerleri	144
Şekil 4.34. Tamsulosin uygulanan ratlarda Retinol Metabolizmasında etkili metabolitler	145
Şekil 4.35. Tamsulosin uygulanan ratlarda Aminoasit-tRNA Biyosentezinde etkili metabolitler	147
Şekil 4.36. Tamsulosin uygulanan ratlarda Tiamin Metabolizmasında etkili metabolit	148
Şekil 4.37. Tamsulosin uygulanan ratlarda Sfingolipit Metabolizmasında etkili metabolitler C00836 (Sfinganin), C06124 (Sfngozin 1-fosfat)	149
Şekil 4.38. Tamsulosin uygulanan ratlarda Triptofan Metabolizmasında etkili metabolit	

.....	150
Şekil 4.39. Tamsulosin uygulanan ratlarda Alanin, Aspartat ve Glutamat Metabolizmasında etkili metabolitler	151
Şekil 4.40. Solifenasin süksinat plazma örneklerinin yolak etki değerleri.....	154
Şekil 4.41. Solifenasin süksinat uygulanan ratlarda Valin, Lösin ve İzolösin Biyosentezinde rol alan metabolitler	155
Şekil 4.42. Solifenasin süksinat uygulanan ratlarda Aminoasıl-tRNA Biyosentezinde rol alan metabolitler	157
Şekil 4.43. Solifenasin süksinat uygulanan ratlarda Gliserofosfolipit Metabolizmasında rol alan metabolitler	158
Şekil 4.44. Solifenasin süksinat uygulanan ratlarda Araşidonik Asit Metabolizmasında rol alan metabolitler	159

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. İyonlaştırma kaynakları	55
Tablo 3.1. UV-Görünür Bölge Spektroskopi yöntem şartları	73
Tablo 3.2. Birinci Derece-Türev (1D-Türev) Spektroskopi yöntem şartları	73
Tablo 3.3. İkinci Derece-Türev (2D-Türev) Spektroskopi yöntem şartları	74
Tablo 3.4. HPLC Yöntem Şartları.....	77
Tablo 3.5. İlaç uygulanan ratların ağırlıkları	83
Tablo 3.6. LC-QTOF/MS Yöntem Şartları	85
Tablo 3.7 Gradient Elüsyon Zaman Çizelgesi	86
Tablo 4.1. Silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat için UV-Görünür Bölge Spektroskopi yöntemiyle elde edilen kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz sonuçları	88
Tablo 4.2. Silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat standart çözeltilerin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik sonuçları	90
Tablo 4.3. Silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat standart çözeltilerin teşhis limiti ve miktar tayin limiti değerleri.....	91
Tablo 4.4. UV-Görünür Bölge Spektroskopi Yönteminin analitik eri kazanım değerleri	92
Tablo 4.5. Silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat standart çalışma çözeltilerinin 1D-Türev Spektroskopi yöntem ile elde edilen kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz sonuçları	97
Tablo 4.6. Silodosin ve tamsulosin standart çalışma çözeltilerinin 2D-Türev Spektroskopi yöntem ile elde edilen kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz sonuçları	97

Tablo 4.7. 1D-Türev Spektroskopi yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik sonuçları	100
Tablo 4.8. 2D-Türev Spektroskopi yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik sonuçları	101
Tablo 4.9. 1D-Türev Spektroskopi yönteminin silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat standart çözeltilerine ait teşhis limiti ve miktar tayin limiti değerleri	102
Tablo 4.10. 2D-Türev Spektroskopi yönteminin silodosin ve tamsulosin standart çözeltilerine ait teşhis limiti ve miktar tayin limiti değerleri.....	102
Tablo 4.11. Farmasötik preparatlarda 1D-Türev Spektroskopi yönteminin analitik geri kazanım değerleri.....	104
Tablo 4.12. Farmasötik preparatlarda 2D-Türev Spektroskopi yönteminin analitik geri kazanım değerleri.....	105
Tablo 4.13. HPLC yönteminin silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat standart çalışma çözeltilerine ait kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz sonuçları	109
Tablo 4.14. HPLC yöntemiyle elde edilen silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat plazma çözeltilerine ait kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz sonuçları	111
Tablo 4.15. Silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat standart çözeltilerinde HPLC yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)..	113
Tablo 4.16. Silodosin+solifenasin süksinat standart çözeltilerinde HPLC yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri.....	113
Tablo 4.17. Tamsulosin+ solifenasin süksinat standart çözeltilerinde HPLC yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri.....	114

Tablo 4.18. Silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat plazma çözeltilerinin HPLC yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri.....	114
Tablo 4.19. Silodosin + solifenasin süksinat plazma çözeltilerinde HPLC yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri.....	115
Tablo 4.20. Tamsulosin + solifenasin süksinat plazma çözeltilerinde HPLC yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri.....	115
Tablo 4.21. Silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat standart çalışma çözeltilerinin HPLC yöntemine ait teşhis limiti ve miktar tayin limiti.....	116
Tablo 4.22. Silodosin + solifenasin süksinat standart çalışma çözeltilerinin HPLC yöntemine ait teşhis limiti ve miktar tayin limiti.....	116
Tablo 4.23. Tamsulosin + solifenasin süksinat standart çalışma çözeltilerinin HPLC yöntemine ait teşhis limiti ve miktar tayin limiti.....	116
Tablo 4.24. Silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat plazma çözeltilerinin HPLC yöntemine ait teşhis limiti ve miktar tayin limiti.....	117
Tablo 4.25. Silodosin + solifenasin süksinat plazma çözeltilerinin HPLC yöntemine ait teşhis limiti ve miktar tayin limiti.....	117
Tablo 4.26. Tamsulosin + solifenasin süksinat plazma çözeltilerinin HPLC yöntemine ait teşhis limiti ve miktar tayin limiti.....	117
Tablo 4.27. HPLC yönteminin farmasötik preparatlarda analitik geri kazanım değerleri	119
Tablo 4.28. HPLC yöntemi ile elde edilen günüçi ve günler arası plazmadan geri kazanım değerleri.....	120
Tablo 4.29. HPLC yöntemi ile elde edilen silodosin+solifenasin süksinatın günüçi ve günler arası plazmadan geri kazanım değerleri	121
Tablo 4.30. HPLC yöntemi ile elde edilen tamsulosin + solifenasin süksinatın günüçi ve	

günler arası plazmadan geri kazanım değerleri	121
Tablo 4.31. Urorec® (8 mg) kapsülde silodosin etken madde miktar tayini	123
Tablo 4.32. Flomax MR® 0.4 mg kapsülde tamsulosin etken madde miktar tayini	125
Tablo 4.33. Kinzy® 5mg Tablette solifenasin süksinat etken madde miktar tayini	127
Tablo 4.34. Silodosin grubu rat plazmalarında tanımlanan metabolitler	129
Tablo 4.35. Tamsulosin grubu rat plazmalarında tanımlanan metabolitler	131
Tablo 4.36. Solifenasin süksinat grubu rat plazmalarında tanımlanan metabolitler	132
Tablo 4.37. Model gruplarının OPLS-DA analizinden elde edilen verilerin istatistiksel analiz sonuçlar	136
Tablo 4.38. Metabolom analizinde silodosin plazma örneklerinin yolak analizi	137
Tablo 4.39. Metabolom analizinde tamsulosin plazma örneklerinin yolak analizi.....	143
Tablo 4.40. Metabolom analizinde solifenasin süksinat plazma örneklerinin yolak analizi.....	152

1. GİRİŞ

Boşaltım sisteminin insan vücudunda pH, su ve elektrolit dengesinin korunması, hücrelerde gerçekleşen metabolik olaylar sonucu oluşan atıkların uzaklaştırılması, kan basıncının düzenlenmesi gibi görevleri alt üriner sisteminin miksiyon (işeme) işleviyle yerine getirilir. Yaşam kalitesini olumsuz etkileyen, idrarın depolama, boşaltma ve miksiyon sonrası aşamalarında görülen fonksiyonel bozukluklar, alt üriner sistem semptomları (AÜSS) başlığı altında bir araya getirilmiştir. İlerleyen yaşlarda şiddeti ve sıklığı artış gösteren bu semptomlar birçok faktöre bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Prostat ile ilgili hastalıklar, yaş ile değişiklik gösteren alt üriner sistem fizyolojisi, farklı hastalıklar ve kullanılan ilaçlar, AÜSS'nin ortaya çıkmasına neden olan başlıca faktörlerdir.

Mesanede idrarın depolanması esnasında gelişen idrarın sıkıştırılması, idrar kaçırma ve sık idrara çıkma isteği gibi semptomlar aşırı aktif mesane (AAM) sendromu olarak ifade edilir. Bu semptomlar mesane kası, periferik duyuşal ve motor nöronlarının fonksiyonel bozukluğu sonucu mesanenin ani ve kontrolsüz kasılmaları sebebiyle görülür. Bu kasılmalar ve semptomlar, antimuskarinik ilaçların tedaviye eklenmesiyle ortadan kaldırılabılır.

AÜSS'ye sebep olan prostat hastalıklarına ait faktörlerden en önemlisi, prostat dokusunun epitel ve stromal hücrelerinin kontrolsüz büyümesi ve çoğalması ile gelişen, benign prostat hiperplazisi (BPH) hastalığıdır. Yaşın ilerlemesi ve androjenlerin artması ile büyüme gösteren prostat idrarı başlatırken yaşanan zorluklardan nadiren ölüme kadar farklı derecelerde yaşamı olumsuz etkilemektedir. Prostatın büyüklüğüne ve BPH'nin derecesine bağlı olarak farklı tedavi yöntemleri tercih edilmektedir. Bitkisel ilaçlar, 5-alfa-redüktaz inhibitörleri, fosfodiesteraz-5 inhibitörleri, antimuskarinik ajanlar, alfa-blokerler ve kombine ilaçlar BPH tedavisinde kullanılmaktadır.

Son dönemlerde organizmalara, hastalıklara ve ilaçlara ait metabolizmaların daha iyi aydınlatılması, hücre içinde gelişen yapısal ve fonksiyonel değişikliklerin belirlenmesi, hastalıkların erken teşhisi, daha etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi, yeni terapötik etkilerin ortaya çıkarılması ve toksik etkilerin en aza indirilmesi amacı ile –omiks teknolojileri kullanılmaya başlanmıştır. Omiks teknolojileri organizmaya ait moleküllerin metabolizmadaki görevlerini, moleküllerin birbiri ile ilişkilerini ve bu moleküllerin organizmayı oluşturan hücrelere etkilerini incelemeyi amaçlayan yöntemsel yaklaşımlardır. Bu yaklaşımlardan biri olan “farmakometabolomiks”; farmasötik bileşiklerin farklı organizmalardaki metabolizmasını aydınlatmak ve değerlendirmek, bir ilacın farmakokinetik profilini çıkararak ilaç yanıtlarındaki bireysel farklılıkları belirlemek, tedavi etkinliğini izleyebilmek için kan, idrar ve doku gibi biyolojik ortamlarda bulunan metabolitleri inceler.

Bu çalışmada, alfa bloker ilaçlardan silodosin ve tamsulosin ile antimuskarinik ajan olan solfenasin süksinat etken maddelerinin farklı ortamlarda (farmasötik preparat ve plazma) miktar analizi için farklı analitik yöntemler geliştirip yöntem geçerlilik (validasyon) testlerinin yapılması amaçlandı.

Silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinatın standart çözeltiler ve farmasötik preparatlarda miktar analizi için UV-Görünür Bölge, Birinci-Türev ve İkinci- Türev Spektroskopi yöntemleri geliştirildi ve yöntem geçerlilik testleri yapıldı. Spektroskopi çalışmalarda her üç etken madde %1.0 TFA içeren su ortamında yarım saat su banyosunda bekletildikten sonra UV-Görünür Bölge, Birinci-Türev ve İkinci-Türev spektrumları alınarak analizleri gerçekleştirildi. Literatür taramasında spektroskopi yöntemlerle her üç etken maddenin farmasötik preparatlarda ve standart çözeltilerde miktar analizleriyle ilgili çalışmalara ulaşılmıştır. Çalışmamızda uyguladığımız yöntem

literatürdeki çalışmalardan %1.0 TFA'da su banyosunda bekletilme yönüyle farklılık göstermektedir.

Silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinatın standart çözeltiler, farmasötik preparatlar ve insan plazmasında tek tek ve ikili (silodosin-solifenasin süksinat ve tamsulosin-solifenasin süksinat eş zamanlı) olarak miktar analizleri için HPLC yöntemi geliştirildi ve yöntem geçerlilik testleri (validasyon) yapıldı. Literatürde HPLC yöntemiyle silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat etken maddelerinin standart çözeltilerde ve farmasötk preparatlarda miktar analizi ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Ancak, literatür taramasında HPLC yöntemiyle insan plazmasında silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinatın miktar analizi ile ilgili herhangi bir çalışmaya ulaşılamadı. Literatürde solifenasin süksinatın tamsulosin ile eşzamanlı miktar analizi için iki adet HPLC çalışması mevcuttken solifenasin süksinatın silodosin ile eşzamanlı miktar analizi için herhangi bir çalışmaya ulaşılamadı. Solifenasin süksinat-tamsulosin eş zamanlı miktar analizi için mevcut olan iki çalışmada analiz süreleri (yaklaşık 30 dakika) oldukça uzundur.

Ayrıca bu çalışmada silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat verilmiş ratlarda metabolik profillerinin belirlenmesi de amaçlandı. Literatürde, alternatif tedavide ve çin geleneksel tıbbında kullanılan bitkilerin metabolik profillerini belirleyen birçok çalışma mevcuttur, ilaçların farklı ortamlarda metabolom profillerinin rapor edildiği çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Çalışmamızda silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinatın oral olarak 5 gün ratlara uygulandıktan sonra, rat plazmalarında anlamlı değişiklik gösteren metabolitler tanımlandı. Tanımlanan metabolitler ilaçların rat metabolizmasında yüksek etki gösterdiği metabolik yolların belirlenmesi için kullanıldı. Yapılan bu çalışmalar sonucunda silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinatın rat metabolizmasında meydana getirebileceği olası yeni terapötik ve yan etkiler

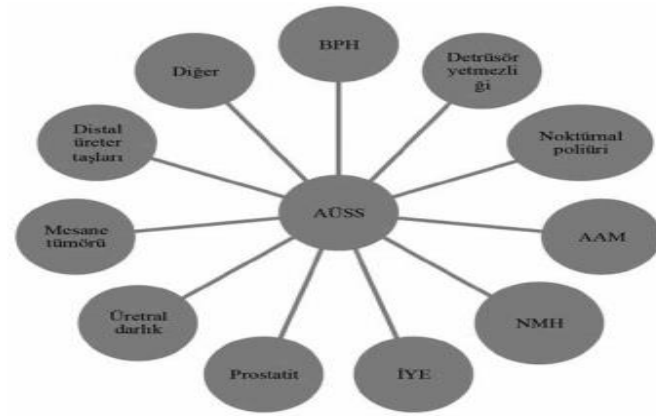
literatüre sunuldu. Bu çalışmanın farmasötik bileşiklerin insan metabolizması ile ilişkisini aydınlatmak için yeni çalışmalara yön vereceği düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alt Üriner Sistem Semptomları

Alt üriner sistem semptomları (AÜSS), erkeklerin ilerleyen yaşlarında en sık karşılaştığı sağlık sorunudur. AÜSS; nokturnal poliüri, mesane tümörleri gibi mesane hastalıklarına, üretra hastalıklarına, distal üreter taşları gibi üreter alt uç hastalıklarına, AAM, BPH gibi prostat hastalıklarına, sinir sistemi hastalıklarına ve yaşlanmaya bağlı meydana gelebilir. Bu semptomlara sahip erkek hastaların durumlarını daha iyi değerlendirebilmek amacıyla, prostatizm, semptomatik veya klinik BPH gibi terimler AÜSS başlığı altında toplanmıştır.

AÜSS depolama, miksiyon ve miksiyon sonrası olmak üzere üç alt gruba sahip miksiyon semptomları göstermektedir.¹ 50 yaş üstü hastalar üzerinde yapılan çalışmalar, erkeklerin yaklaşık %30'unun orta ila şiddetli miksiyon belirtileri yaşadığını göstermiştir. AÜSS görülme sıklığı, 20 yaşından itibaren her on yılda bir %7 oranında arttığı belirtilmektedir.² Görüldüğü üzere yaşlı erkeklerin yaşam kalitelerini ciddi şekilde etkileyen AÜSS; BPH sonucu meydana gelen büyümüş bir prostatın sebep olduğu mesane çıkım tıkanıklığı (MÇT), AAM veya yaşa bağlı olarak görülen detrusör işlev bozuklukları gibi birçok sebepten dolayı ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.1).³



Şekil 2.1. AÜSS patogenezinde rol oynayabilen faktörler⁴

Uluslararası Kontinans Derneği'ne göre AÜSS; idrar depolanması ile ilgili semptomlar, idrar boşalması ile ilgili semptomlar ve miksiyon sonrası görülen semptomlar olmak üzere üç farklı grupta sınıflandırıldığı rapor edilmiştir.

Depolama sürecine ait semptomlar; mesanede idrarın depolanması esnasında görülen, tüm gün boyunca hastanın idrar yapma sıklığını etkileyen semptomlardır. Artmış gündüz miksiyon sıklığı, nokturi (gece miksiyon sıklığı), sıkışma (urgency) ve idrar kaçırmaya semptomları depolama belirtileridir.^{1,5}

Boşaltım sürecine ait semptomlar; idrarın atımı sırasında görülen belirtilerdir. Zayıf idrar akımı, çatalı/dağınık idrar akımı, kesintili idrar akımı, gecikmeli idrar başlatma, zorlanarak idrar boşaltma ve terminal damlama boşaltma sürecine ait semptomlardır.⁶

Miksiyon sonrası görülen semptomlar, miksiyonun bitiminden sonra karşılaşılan semptomlardır. İdrar boşaltımının tam olmaması hissi, miksiyon sonrası damlama idrar boşaltmadan sonra gözlenen belirtilerdir.^{1, 5} En sık gözlenen semptomlar nokturi (gece miksiyonu) (%66.1), sık idrara çıkma (%44.1) ve idrar akımında azalma (%40.1) iken, en seyrek gözlemlenen şikayet ise gecikmeli idrar başlatma (%17.5) olarak rapor edilmiştir.⁷

2.2. Aşırı Aktif Mesane

AÜSS'ye yol açan faktörlerden biri de aşırı aktif mesane sendromu (AAM)'dur. AAM ani ve şiddetli idrar yapma isteği ve buna bağlı olarak altına kaçırmaya, sık idrar yapma (günde iki-sekiz defa), gece uykudan uyandıran idrar yapma isteği (gece bir defadan fazla) gibi semptomların birlikte gözlemlendiği sendromdur.¹ AAM hastaların günlük aktivitelerinde, iş hayatlarında, uyku düzenlerinde ve cinsel hayatlarında birçok düzensizliklere yol açarak hastayı psikolojik, fiziksel ve ekonomik olarak olumsuz etkiler.

AAM patofizyolojisi tam olarak belirlenememesine rağmen, AAM oluşmasında; genellikle mesane doldurma sırasındaki istemsiz detrusor kasılmaları ile karakterize bir durum olan detrusor aşırı aktivitesi sonucu, detrusorun görevini tam yapamaması, periferik duysal ve periferik motor sinirlerinde meydana gelen değişiklikler gibi faktörlerin rol aldığı tahmin edilmektedir.^{8, 9} Mesane kasında meydana gelen işlevsel değişiklikler; kolinerjik reseptörlerin duyarlılığında, mesanenin kasılma sayısında ve detrusorun hücreler arası iletişimini etkileyen birçok proteinin miktarında artışa sebep olur.¹²⁻¹⁴ Bu değişiklikler mesanede asetilkoline karşı hassasiyeti artırır ve mesanenin sürekli kasılması sonucu AAM gelişmektedir.¹⁵

Bu çalışmalar sonucunda AAM sendromunun prostat büyümesi ile birlikte görüldüğü, BPH'nin depolama semptomlarının AAM ile birebir örtüştüğü ortaya çıkmaktadır. Hastalarda BPH tek başına görülebildiği gibi, BPH kaynaklı MÇT ve AAM'nin hastalarda aynı anda teşhis edildiği görülmüştür.¹⁶ Bu sebeple; BPH ve AAM tanısı almış hastalarda, alfa blokerler antimuskarinik ajanlar ile birlikte tedavide tercih edilir, Böylece $\alpha 1$ -adrenoreseptörleri ve muskarinik reseptörlerin aynı anda inhibe edilmesiyle klinikte daha iyi sonuçlar alınmasını sağlamıştır.¹⁷

2.3. Benign Prostat Hiperplazisi

Benign prostat hiperplazisi (BPH), prostatik geçiş bölgesinde bulunan epitel ve düz kas hücrelerinin anormal çoğalmasına bağlı olarak, non malign prostat büyümesiyle karakterize, erkeklerde en sık görülen bir histolojik tanıdır.¹⁹⁻²¹

BPH, AÜSS'ye yol açarak, yaşlı erkeklerin günlük aktivite ve uyku düzenlerinde meydana getirdikleri bozulmaya bağlı olarak, yaşam kalitesini düşüren bir hastalıktır. AÜSS ile ilişkilendirilen, histopatolojik bir oluşum olan BPH, yaşlı erkeklerde gözlenen AÜSS'na tek başına sebep olmaz, ama semptomların görülmesine önemli derecede katkıda bulunur.²³ Kesin sebebi tam olarak aydınlatılamayan BPH; başta en büyük iki risk

faktörü yaşlılık ve androjenlerdir.²⁴⁻²⁶ Prostat bezinin yapısını oluşturan transizyonel zonunda, epitelyal glandüler yapılarda, bağ dokusunda ve düz kasta bulunan hücreler çeşitli faktörlerden dolayı 60 yaş üzeri erkeklerde sayıca hızlı artış gösterirler.²⁷ Bu duruma eş zamanlı olarak stromal düz kas hücrelerinin sayısının artmasına bağlı olarak, prostat hacminde artış meydana gelir. Normal prostat bezinde 1:2 olan stroma:glandüler doku oranı, BPH’de 5:1 oranına yükselir.²⁶ Sonuç olarak BPH’ne; prostatik büyüme (statik komponent), prostatik düz kas hipertrofisi (dinamik komponent) ve yaşlanmaya paralel gelişen detrüsör fonksiyonundaki bozulmanın yol açtığı kabul edilmektedir.²⁸

İdrar yolunu çevreleyen prostatın hacmi arttıkça, idrar yolu daralmakta ve mesaneden idrarın çıkışı zor olmaktadır. Meydana gelen tıkanıklık hissi ile idrar boşaltması rahat bir şekilde gerçekleşmemektedir. Bunun sonucu olarak da, başta gece sık idrara çıkma isteği, yanma gibi semptomlar olmak üzere, mesaneyi tam boşaltamama hissi ve idrar yapma ihtiyacında erteleyememe gibi farklı belirtilerde gözlenecektir. Zayıf idrar akımı, idrarı başlatmada zorlanma, miksiyon sonrası damlama ve kesik kesik idrar yapma gibi durumlar BPH’den kaynaklanmaktadır.²⁹

Prostat dışında kalan farklı faktörler yukarıda belirtilen idrar semptomlarına yol açabileceği için, hastaların tıbbi öyküleri ayrıntılı olarak alınmalıdır. Hastalara ait tıbbi öyküler Avrupa Üroloji Derneği tarafından belirlenen Uluslararası Prostat Semptom Skoru (IPSS) sistemi ile derecelendirilerek BPH tanısı için kullanılmaktadır.³⁰

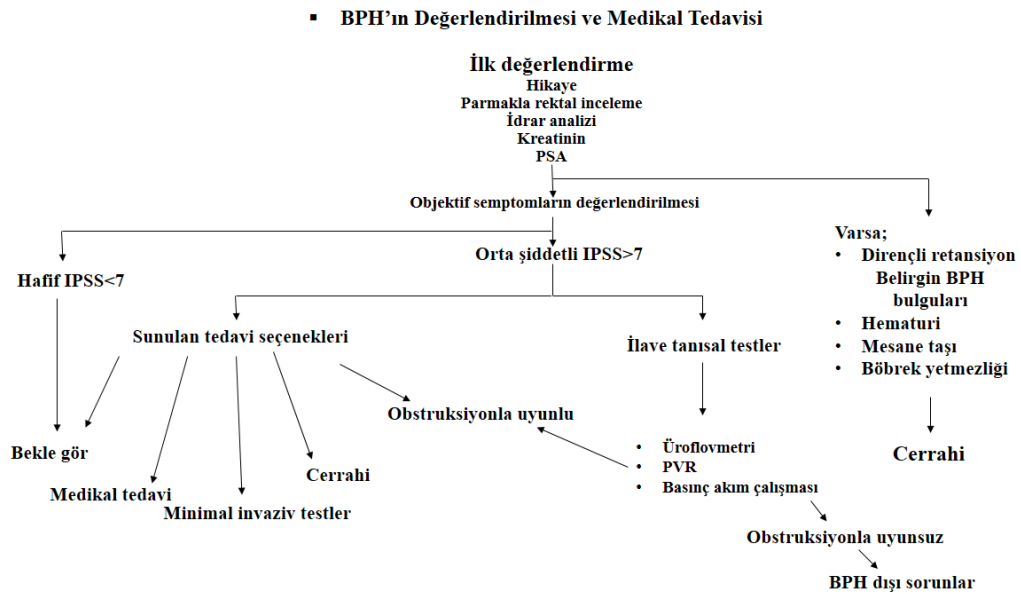
Farklı dil ve kültürlere göre standardize edilerek, yedi tane sorudan oluşan IPSS, 0’dan 35’e kadar derecelendirme sisteminden oluşur. IPSS 0-7 arasında hafif, 8-19 arasında orta, 20-35 arasında ise şiddetli derecede semptomatik kabul edilmektedir. IPSS, BPH’li hastalarda tedavinin etkinliğini ve hastalığın seyrini takip etmek amacıyla geliştirilmiştir.³¹

Avrupa Üroloji Birliği (EAU)'ya göre Uluslar arası Prostat Semptom Skoru 7'den yüksek olan, 15 mL/sn'nin altında maksimal akım hızı (MAH), rezidüel miktarı fazla ve 20 mL'nin üzerinde prostat volümüne sahip, alt üriner sistem semptomları gözlenen kişilere BPH tanısı konmaktadır.²²

2.3.1. BPH Tedavisi

BPH'lı hastaların tedavisine başlamadan önce, hastalığa, hastaya ve hekime ait bazı faktörler göz önüne alınarak tedavi şekline karar vermek gerekmektedir.

Hastalığa ait semptom düzeyi, akut üriner retansiyon ve cerrahi riski, BPH ile ilgili komplikasyonların varlığı, hastanın hemen tedavi olmak, cinsel fonksiyonlarının bozulmaması ve maliyetinin düşük olmasını istemesi, hekimin tecrübesi ve sahip olduğu teknolojik imkan gibi faktörler tedavi şekline yön vermektedir (Şekil 2.2).³²



Şekil 2.2. BPH tedavi algoritması

2.3.2. Medikal Tedavi

Orta şiddette belirtileri olan hastalarda en çok tercih edilen tedavi yöntemidir. Bu amaçla birkaç grup ilaç kullanılmaktadır. İlaçların etkinliği sürekli kullanımına bağlı olarak artmaktadır. Bu ilaç grupları;

- Bitkisel ilaçlar (Cucurbita pepo, Hypoxis rooperi, Pygeum africanum, Secale cereale, Saw Palmetto ve Urtica dioica)
- 5 Alfa-redüktaz inhibitörleri (5ARI) (Finasterid, Dutasterid)
- Fosfodiesteraz 5 inhibitörleri (PDE5) (Sildenafil, Tadalafil, Vardenafil)
- Muskarinik reseptör antagonistleri (MRA) (Oksibutinin, Tolterodin, Darifenasin, Solifenasin, Trospiyum ve Propiverin)
- Alfa-blokerler
 - Selektif olmayan alfa-blokerler (Fenoksibenzamin)
 - Selektif alfa 1-blokerler (Prazosin, IR Alfuzosin, _ndoramin)
 - Uzun etkili alfa 1-blokerler (Terazosin, Doksazosin, Alfuzosin SR)
 - Alt tip selektif alfa 1-bloker (Tamsulosin, Silodosin)
- Kombine ilaç tedavisi (alfa bloker + 5ARI, alfa bloker + antimuskarinik, alfa bloker + PDE5, alfa bloker + 5-ARI + antimuskarinik)

2.3.2.1. Muskarinik reseptör antagonistleri (MRA)

M₁, M₂, M₃, M₄ ve M₅ olarak 5 tip bulunan muskarinik reseptörlerden insan mesane düz kasında en çok M₂ (%70-80) ve M₃ (%20-30) bulunmaktadır.^{33,34} Muskarinik reseptörlerin inhibe edilmesi ile mesane dolum aşamasında oluşan kas aktivitesi durdurulmakta, böylece detrusörün kasılma sıklığı ve aşırı kontraksiyonları önlenmektedir. Bu özellikleriyle aşırı aktif mesane tedavisinde etkin rol oynayan muskarinik reseptör antagonistlerinden darifenasin, oksibutinin, solifenasin, tolterodin, propiverin ve trospium ABD’de ve birçok ülkede onay almıştır.³⁵ Propantelin, flavoksat,

methanthelin, emepronium, dicyclomin, terodilin ve atropin/hiyosiyamin gibi ilk antimuskarinik ajanlar sistemik yan etkilerinin olması, etkisi için yüksek ilaç dozu gerektirmesi, yarı ömrünün kısa olması vb. gibi dezavantajlar sebebiyle pek tercih edilmemektedir.³⁶ Avrupa Üroloji Derneği tarafından orta ve şiddetli AÜSS olan hastalarda muskarinik reseptör antagonistlerinin kullanılabileceği belirtilmiştir.³⁷

2.3.2.2. Alfa-blokerler

BPH ve AÜSS tedavisinin tek başına veya kombine kullanımı ile temel taşı olan alfa blokerlerin yaygınlığı ve önemi gün geçtikçe artmaktadır. Geçmişte yapılan çalışmalarda; α 1-adrenerjik reseptörler aracılığıyla kasılan prostatik düz kasların MÇT'ye yol açtığı ve bunun sonucunda BPH'a bağlı AÜSS geliştiği ortaya konulmuştur.³⁸ MÇT ve miksiyon semptomlarının, prostat ve mesane bölgesindeki α -1-adrenerjik reseptör yoğunluğuyla ilişkisi, dolayısıyla bu reseptörlerin blokajının prostatik düz kasının yanı sıra ürotelyum, mesane düz kasları, kan damarları ve afferent sinirlerin gevşemesine yol açarak MÇT'nin azalmasında rol aldığı kanıtlanmıştır.³⁹

Geçmişte yapılan çalışmalarda, α reseptörlerinin α -1a, 1b, 1d, 2a, 2b, 2c olmak üzere 6 adet alt tipinin olduğu belirtilmiştir.⁴⁰ Yeni nesil alfa bloker olarak bilinen, α -1b alt tipi reseptörlerine kıyasla α -1a alt tipine affinitesi daha yüksek olan tamsulosin (40 kat) ve silodosin (583 kat) süperselektif ajanlar olarak tanımlanmaktadır.^{41, 42} Alfa blokerleri BPH ve AÜSS'ye karşı uygun dozlarda benzer etkinlikler gösterirken, yarılanma ömürleri ve seçiciliklerinden kaynaklı olarak farklı yan etki ve tolerabilite profilleri çizmektedirler.⁴³ Son zamanlarda ideal alfa bloker profiline yakın olan tamsulosin ve silodosin BPH ve AÜSS tedavisinde daha çok tercih edilmektedir. Günümüzde yapılan çalışmalar; ideal bir alfa blokerden beklenen alt tip seçici olması, BPH semptomlarına ve akut idrar retansiyonuna karşı etkinliğinin hızlı ve yüksek olması, cerrahi tedaviye duyulan ihtiyacı ortadan kaldırması ve bu özelliklerinin yanında

minimum düzeyde yan etki göstermesi gibi kriterlere sahip yeni ilaçların keşfini amaçlamaktadır.⁴⁴

2.3.2.3. Kombine İlaç Tedavisi

İlaç tedavisi uygulanan bazı hastalarda birden fazla ilaç kombinasyonlarına da ihtiyaç duyulabilir. Günümüzde AÜSS/BPH tedavisi için cerrahi müdahale yerine farmakolojik tedavinin tercih edilmetedir. Tedavi de tek ilacın yeterli olmadığı durumlarda daha etkin bir sonuç elde etmek amacıyla monoterapi tedavinin yerine artık kombine tedavi tercih edilmektedir. Alfa bloker+5ARİ ilaçlar, alfa bloker+antimuskarinik ilaçlar, alfa bloker+fosfodiesteraz 5 enzim inhibitörleri, alfa bloker+5-ARİ ilaçlar+antimuskarinik ilaç kombinasyonları AÜSS/BPH tedavisinde kullanılmaktadır.^{45, 46} Yapılan çalışmalar ışığında kombinasyon tedavisinin etkinliği ve güvenilirliği hakkındaki verilerin son zamanlardaki artışı göz önüne alındığında farklı endikasyonlar için farklı kombinasyonlar önerilmektedir. Örneğin, orta ve şiddetli AÜSS olan hastalarda depolama semptomlarının giderilmesi isteniyorsa ve her iki ilacın monoterapi tedavisi yetersiz kalıyorsa a-bloker/antimuskarinik kombinasyon terapisi tercih edilmektedir veya orta ve şiddetli AÜSS olan, büyük ölçüde genişlemiş prostata sahip olan erkeklerde alfa blokeri/5-alfa redüktaz inhibitörü kombinasyonu uygulanmaktadır.⁴⁷

Son yıllarda alfa-blokerleri ve antimuskarinik ajanların kombinasyon tedavisi hakkında bir dizi çalışma bildirilmiştir.⁴⁷⁻⁵¹ Görüldüğü üzere günümüzde alfa bloker-antimuskarinik kombinasyon terapisi etkin bir tedavi için daha çok tercih edilmeye başlandığı, tedavilerde daha olumlu sonuç alındığı, bu nedenle 6. Uluslararası Prostat Kanseri ve Prostat Hastalığında Yeni Gelişmeler Danışmanlığı tarafından tavsiye edildiği görülmektedir.⁵² Ancak yapılan klinik çalışmalarda; AÜSS/BPH semptomlarındaki

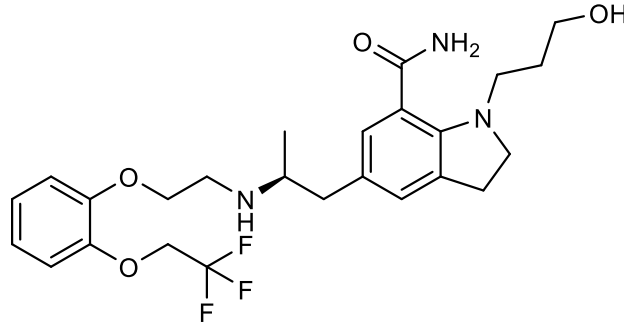
iyileşmelere rağmen, tedavi sürekliliği (yani tedavinin kesilmesine kadar geçen süre) ve tedaviye bağlılık AÜSS/BPH'li erkeklerde düşük olarak bildirilmiştir.⁵³

2.4. İlaçlar

2.4.1. Silodosin

2.4.1.1. Silodosinin Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

Kaba formülü $C_{25}H_{32}F_3N_3O_4$, açık kimyasal formülü “1-(3-Hidrosipropil)-5-[(2R)-2-({2-[2-(2.2.2trifloroetoksi)fenoksi]etilamino)propil]-2.3-dihidro-1H-indole-7-carboxamide” şeklindedir. Molekül ağırlığı 495.534 g/mol olan ve beyaz toz fiziksel yapıya sahip silodosin, suda çok az çözünür, asetik asit, metanol, asetonitril, etanol ve N,N-dimetilformadid’de çözünür. Erime noktası 105-109 °C arasındadır (Şekil 2.3).⁵⁴



Şekil 2.3. Silodosinin molekül yapısı

2.4.1.2. Silodosinin Farmakodinamik Özellikleri

Silodosin, prostat, mesane, mesane boynu ve prostatik üretrada yüksek oranda bulunan α -1a reseptörlerine karşı yüksek seçicilik göstermektedir. Bu reseptörlerin bloke edilmesi sonucu bu dokularda bulunan düz kaslar gevşer, mesane çıkış direnci azaltılır. Böylece BPH’ne bağlı AÜSS ortadan kaldırılır. Ayrıca silodosinin α -1b’ye daha az seçicilik göstermesi ilacın yan etkisini azaltmaktadır.⁴²

2.4.1.3. Silodosinin Farmakokinetik Özellikleri

Oral uygulanan silodosin iyi emilir ve yarılanma ömrü 7-17 saat arasındadır. Terapötik dozu (8 mg/gün) uygulanan silodosinin biyoyararlanımı %32 iken, yemekle alındığında C_{max}'ı 61.6 ± 27.54 ng/mL, T_{max}'ı 2.6 ± 0.90 saat, AUC (0s-24s) = 373 ng saat/mL olarak bulunmuştur. Plazma proteinlerine yaklaşık %97 oranında bağlanan silodosinin, plazmada bulunan ana metaboliti glukuronid konjugatıdır. Silodosin, %54.9 oranında feçes, %33.5 oranında idrar yoluyla vücuttan atılır.⁵⁴

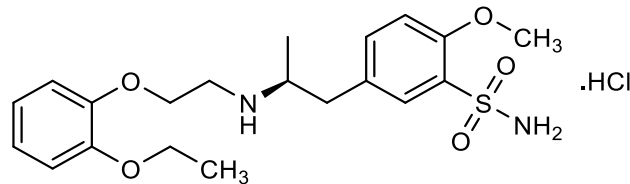
2.4.1.4. Silodosinin Uygulanışı

BPH tedavisi için doktor tavsiyesine göre, yemekten sonra günde 1 doz 4 veya 8 mg'lık kapsüller bol su ile kullanılır. Sadece erkek hastalar için önerilen silodosin, her gün aynı saatte kullanılmalıdır.⁵⁵

2.4.2. Tamsulosin

2.4.2.1. Tamsulosin'in Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

Açık kimyasal formülü; 5-[(2R)-2-[[2-(2-Etoksifenoksi)etil]amino]propil]-2-metoksibenzensulfonamid hidroklorit, molekül ağırlığı 444.971 g/mol, bir sülfonamid Türevi olan tamsulosin beyaz topaksı yapıya sahip bir tozdur. Erime noktası 226-228 °C'dir. Tamsulosin suda az çözünürken, metanol, asetonitril, etanol ve dimetilsülfoksitde çözünür (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Tamsulosin'in molekül yapısı

2.4.2.2. Tamsulosin'in Farmakodinamik Özellikleri

Tamsulosin, insan prostatında bulunan α -1 reseptörlerinden en baskın olanı α -1a reseptörlerine yüksek afinite gösterir. Prostatik kasılmada en büyük rolü oynayan α -1a alt tip reseptörlerini bloke ederek, prostat ve üretra düz kaslarının gevşemesine yol açar. Böylece BPH'lı hastalarda hem mesane dayanıklılığını hem de idrar akış hızını artırarak AÜSS'ye ait idrar yapma ve idrar depolama semptomlarında ciddi anlamda düzelmeler meydana getirir.⁵⁶

2.4.2.3. Tamsulosin'in Farmakokinetik Özellikleri

Kontrollü salınlı tabletlerle oral alınan tamsulosin bağırsaklardan iyi emilir ve biyoyararlanımı %100'dür. Absorbsiyonu yemeklerle azalmakta olan tamsulosin günde bir defa 0.4 mg verildiğinde, 4.1 ± 1.1 saatte maksimum plazma derişimine (C_{max}) ulaşılmış, C_{max} 17 ng/L, AUC 66.6 ± 10.0 ng h/mL ve yarılanma ömrü 9.3 ± 2.8 saat bulunmuştur. %99 oranında plazma proteinlerine bağlanan tamsulosin'in kendisi ve metabolitleri vücuttan idrarla atılır.⁵⁷

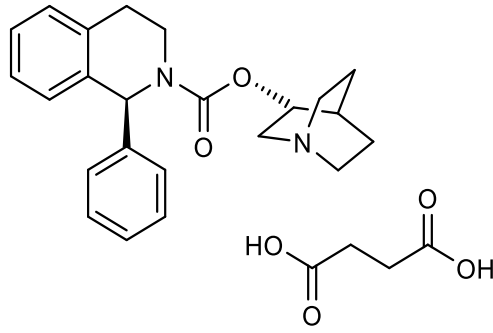
2.4.2.4. Tamsulosin'in Uygulanışı

0.4 mg tamsulosin içeren kontrollü salım tableti günde 1 defa aç karnına, bol su ile oral yoldan alınması önerilmektedir.⁵⁶

2.4.3. Solifenasin Süksinat

2.4.3.1. Solifenasin Süksinat'ın Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

Antimuskarinik ilaçlar sınıfına giren solifenasin süksinat $C_{23}H_{26}N_2O_2 \cdot C_4H_6O_4$ kapalı kimyasal formüle, 480.561 g/mol ağırlığa sahiptir. Azabisiklofenil-isokinolinkarboksilat'ın süksinat tuzudur. Fiziksel olarak beyaz toz bir yapıya sahip olan madde, çok yüksek lipofilik yapıya sahip olduğu için suda ve metanolde az çözünürken glasiyal asetik asit, dimetilsülfoksit and dimetil formamitte çözünmektedir (Şekil 2.5).⁵⁸



Şekil 2.5. Solifenasin süksinatın molekül yapısı

2.4.3.2. Solifenasin Süksinat'ın Farmakodinamik Özellikleri

Farklı iyon kanalları ve diğer reseptörler için çok düşük etkinlik göstermesi sebebi ile spesifik antimuskarinik özelliklere sahip, bir tersiyer amin olan solifenasinin süksinat tuzu, aşırı aktif mesanenin semptomatik tedavisinde kullanılır. Muskarinik M3 alt-tip reseptörü blokeri solifenasin süksinat; asetilkolin aracılığıyla mesane kasılmasını sağlayan nöromusküler bölgeleri inhibe ederek, detrusor ve periferik kas liflerinin sık ve kontrolsüz kasılmalarını engeller. Böylece aşırı aktif mesanede gözlenen, inkontinans (idrar tutamama), sık idrara çıkma ve bu semptomlardan ötürü yaşam kalitesinde meydana gelen ruhsal, sosyal ve fiziksel kısıtlıklar ortadan kaldırılır.⁵⁹

2.4.3.3. Solifenasin Süksinat'ın Farmakokinetik Özellikleri

Solifenasin'in 5 veya 10 mg dozunun uzun süreli oral kullanımı sonucunda, 3-8 saat içinde maksimum plazma derişimine ulaşılır. Cmax 5 mg için 24.0 ve 10 mg için 40.6 ng/mL'dir. Solifenasin yaklaşık %88'lik bir biyoyararlanıma ve 33-85 saat arasında yarılanma ömrüne sahip olup besin alımı ile azalmadığı tespit edilmiştir.⁵⁸⁻⁶⁰ Kan-beyin bariyerini geçebilen solifenasin, %93-96 plazma proteinlerine bağlıdır. Karaciğerde sitokrom P450 (CYP) 3A4 ile hepatik metabolizma yoluyla elimine edilir ve idrar ile % 3-13'ü değişmeden atılır. Sağlıklı yetişkinlerde, solifenasinin toplam klirensi 7-14 L/s ve böbrek klirensi 0.67–1.51 L/s'dir.⁶⁰

2.4.3.4. Solifenasin Süksinat'ın Uygulanışı

Yarılanma ömrü çok uzun olan solifenasin süksinat doktor tavsiyesine göre 5 veya 10 mg'lık tabletler halinde, günde 1 defa oral yolla alınır.⁶⁰

2.5. Litaratür Özetleri

2.5.1. Tamsulosin, Silodosin ve Solifenasin Süksinat ile İlgili Analiz Çalışmaları

2.5.1.1. Silodosin

Boltia ve ark⁶¹ silodosinin asit ve oksidasyon kaynaklı bozunma ürünleri varlığında tayini için beş farklı UV-Görünür Bölge Spektroskopi yöntemini geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Çalışma, belirlenen koşullar altında çift dalga boyu yöntemi, indüklenmiş çift dalga boyu teorisi yöntemi, oran farkı yöntemi, absorbsiyon ve 1D-Türev Spektroskopi yöntemlerinden oluşmaktadır. Önerilen tüm yöntemler 5.0-70.0 µg/mL derişim aralığında doğrusallık gösterdiği tespit edilmiştir. Çift dalga boyu yöntemi, indüklenmiş çift dalga boyu teorisi yöntemi, oran farkı yöntemi, absorbsiyon ve 1D-Türev Spektroskopi Yöntemlerinin LOD değerleri sırasıyla; 1.45, 1.18, 1.59, 1.41 ve 1.42 µg/mL; geri kazanım değerleri ise sırasıyla %100.67±1.348, 99.06-0.94, 98.90-1.09, 99.37-0.63 ve 100.16±0.16 olarak belirlenmiştir. Önerilen yöntemler, farmasötik dozaj formlarında silodosinin analizine uygulanmıştır.

Mounika ve ark⁶² silodosin tayini için saf ve farmasötik formülasyonlarda üç basit spektroskopi yöntemi (A, B, C) önermişlerdir. Yöntem A: silodosinin demir (III) ile oksidasyonuna, ve ardından demir (II) 'nin λ_{max} 479 nm dalga boyunda absorbands verecek kırmızı renkli kompleksi oluşturmak için 10 fenantrolin (PTL) ile şelatlanması ve Yöntem B'de ise λ_{max} 732 nm dalga boyunda absorbands verecek mavi renkli bir kromojen oluşturmak amacıyla silodosin ve folik ciocalteu (FC) reaktifi arasındaki oksidasyon veya redüksiyon esasına dayanmaktadır. Ayrıca, yöntem C'de de silodosinin demir (III) ile oksidasyonu ve demirin 620 nm dalga boyunda absorbands verecek yeşil

renkli kompleksi oluşturmak için 3 metil-2-benzotiozolin hidrazon hidroklorür (MBTH) ile şelatlanması esasına dayanmaktadır. Yöntem A, B ve C için sırasıyla; çalışma aralığı 10.0-50.0, 300.0-500.0 ve 10.0-50.0 µg/mL, %BSS 0.60, 0.87 ve 3.76, yüzde geri kazanımları %102.37, 128, 102.9 olarak belirlenmiştir.

PrachiBhamre ve ark⁶³ silodosinin saf ve farmasötik dozaj formunda analizi için bir spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Silodosin, 272 nm'de eksitasyon dalga boyuna ve 450 nm'de emisyon dalga boyuna sahip metanolde güçlü doğal floresans göstermiştir. Kalibrasyon grafiğinin 0.01 – 1.0 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu tespit edilmiştir. Önerilen yöntemin teşhis sınırı ve miktar tayin limiti sırasıyla 0.003 µg/mL ve 0.0091 µg/mL olarak ve yüzde geri kazanım değeri %98.53 ± %0.53 ve %99.27 ± 0.49 arasında belirlenmiştir.

Rasheed ve ark⁶⁴ saf ve farmasötik formülasyonlarda silodosin miktar tayini için üç farklı spektroskopi yöntemi (I, II, III) tanımlamışlardır. Yöntem I'de, silodosin stok çözeltisinin 0.1 N HCl ile seyreltilmesi sonucu hazırlanan numuneler 273 nm dalga boyunda absorbanları okunarak analizleri yapılmıştır. Yöntem II'de, numunelerin 265 nm dalga boyunda 1D-Türev spektrumlarının alınması ile analizleri yapılmıştır. Yöntem III'de ise, 268-278 nm dalga boyları arasında alınan eğri altında kalan alanın ölçülmesi ile analizlerinin yapılması esasına dayanmaktadır. Yöntem I, II ve III için sırasıyla; çalışma aralığı 2.0-120.0, 2.0-120.0 ve 10.0-120.0 µg/mL, LOD değerleri 0.46, 0.46 ve 0.47 ve LOQ değerleri 1.435, 1.432, 1.436 olarak belirlenmiştir.

Vishnuvardhan ve ark⁶⁵ silodosini, ICH kılavuzlarına göre hidroliz (asidik, alkalın ve nötr), oksidatif, fotoliz ve termal stres içeren zorlanmış degradasyon çalışmasını gerçekleştirmişlerdir. Silodosin, hidrolitik (asidik, alkalın ve nötr) ve oksidatif stres koşullarında belirgin bir bozulmaya uğradığı, diğer stres koşullarında ise stabil olduğu tespit edilmiştir. İlacın ve bozunma ürünlerin analizi için LC-ESI-TOF-MS/MS

yönteminini kullanmışlardır. Çalışmada, bir C18 analitik kolon (150 x 4.6 mm, 5 µm) ve 1.0 mL/dk akış hızı, %0.1 formik asit ve asetonitrilden oluşan hareketli faz ve gradient elüsyondan oluşan kromatografik şartları kullanmışlardır. Mevcut yöntem ile 5 adet bozunma ürününü (DP 1 ila DP 5) tespit etmişlerdir. Yöntemin, kalibrasyon eğrisinin 0.999 korelasyon katsayısı ile 100.0-150.0 µg/mL derişimleri arasında doğrusal olduğu, LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.10 ve 0.32 µg/mL, yüzde geri kazanım değerini ise %99.0-101.0 olarak belirlemişlerdir.

Belal ve ark⁶⁶ terazosin, alfuzosin, tamsulosin, doksazosin ve silodosin miktar tayinleri için basit bir alanla yükseltilmiş numune enjeksiyonu (FASI) ile kombine edilmiş miyellar elektrokinetik kromatografi (MEKC) yöntemini geliştirmişlerdir. Ayırmayı, 30mM sodyum dodesil sülfat ve %8.0 bütanol içeren tris tamponu (30 mM, pH 9.2) ile 25 ° C'de 28kV voltaj uygulayarak gerçekleştirmişlerdir. Yöntemin, silodosin için 50.0-2000.0 ng/mL ve tamsulosin için 40.0–1200.0 ng/mL derişim aralığında doğrusal olduğu, LOD ve LOQ değerlerinin sırasıyla silodosin için 5.21 ve 16.41 ng/mL, tamsulosin için 8.29 ve 25.12 ng/mL, farmasötik preparattan yüzde geri kazanımları silodosin için, %99.24-100.76, tamsulosin için %99.24-100.75 olarak tespit etmişlerdir.

Shah ve ark⁶⁷ insan plazmasında silodosin ve aktif metaboliti silodosin β-d-glukuronid'in (KMD-3213G) eşzamanlı olarak belirlenmesi için bir LC-MS/MS yöntemini geliştirmişlerdir. Silodosin ve aktif metaboliti 300.0 µL plazmadan etil asetat ve metil tersiyer-butil eter çözücü karışımı kullanılarak ekstrakte edilmiş ve ekstarksiyon geri kazanım değerleri sırasıyla %90.8-93.4 ve %87.6-89.9 olarak tespit edilmiştir. Ekstraktlar, 10 mm amonyum format tamponu:metanol-asetonitril (40:60, h/h) hareketli fazı ve gradent elüsyon yöntemi kullanılarak bir Simetri C18 (50 x 4.6 mm, 5 µm) kolonun da analizler gerçekleştirilmiştir. MS/MS ölçümleri için, analitlerin iyonlaştırılması pozitif iyonizasyon modunda gerçekleştirilmiştir ve izlenen geçişler

silodosin için m/z 496.1 → 261.2 olarak kullanılmıştır. Yöntemin silodosin için 0.10-80.0 ng/mL derişim aralığında doğrusal olduğu, korelasyon katsayısının 0.9974, LLOQ değerinin ise 0.1 ng/mL olduğu belirlenmiştir.

Nair ve ark⁶⁸ silodosin ve silodosin β-D-Glukuronid'in insan plazmasında analizi için LC-MS/MS yöntemini geliştirmişlerdir. Yöntemin, 0.5-207.3 ng/mL derişim aralığında doğrusal olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada, ZORBAX SB-C8 (100 mm × 4.6 mm, 3.5 μm) kolon, 0.8 mL/dk akış hızı, 5 mM amonyum asetat tamponu (pH:9) :asetonitrilden (80:20 h/h) oluşan hareketli faz kromatografik şartları kullanılmıştır. Ayrıca silodosin ve silodosin β-D-Glukuronid plazmadan katı faz ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edilmiştir ve silodosinin geri kazanım değeri %59.93 olarak belirlenmiştir.

Wang ve ark⁶⁹ gönüllü hastaların plazma örneklerinde silodosin miktar tayini için LC-MS/MS yöntemini geliştirmişlerdir. Çalışmada, A MP C18 (4.6 mm x 15 mm x 5 μm) kolon ve amonyum asetat tamponu:asetonitril (60:40, h/h) oluşan hareketli faz kromatografik parametreler kullanılmıştır. Yöntemin, LOD değeri 0.1 ng/mL, gün içi ve günler arası %BSS değeri 7.5'den az olarak belirlenmiştir. Silodosin plazma örneklerinden bütıl hidroksi anisol kullanılarak ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir.

Zhao ve ark⁷⁰ insan plazmasındaki silodosin tayini için LC-MS/MS yöntemini geliştirip valide etmişlerdir. Silodosin ve iç standart 500.0 μL insan plazmasından metil tersiyer-butıl eter kullanarak %85.9 verimle ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Asetonitril-10 mM amonyum asetat (pH:4.5) (40:60, h/h) oluşan hareketli faz kullanılarak Agilent C8 kolonunda ayrımı gerçekleştirmişlerdir. Analiz, pozitif iyon modunda Turbo Ion Spray (TIS) iyonlaşması ve çoklu reaksiyon izlemesi (MRM) kullanılarak MS/MS ile yapılmıştır. İzlenen kütle geçişleri silodosin ve IS için sırasıyla m/z 496.3 → 261.4 ve m/z 440.4 → 259.3 olarak belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrisinin 0.50-50.0 ng/mL arasında

doğrusal olduğu ve yöntemin LLOQ değerini 0.50 ng/mL olarak belirlemişlerdir. Bu yöntem ile sağlıklı gönüllülerde farmakokinetik çalışması da yapılmıştır.

Aneesh ve ark⁷¹ silodosin'in saf ve tablet dozaj formunda tayini için bir RP-HPLC yöntemini geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Ortam sıcaklığında bir C18 kolon (250 mm x 4.6 mm, 5µm), 269 nm dalga boyu, 1 mL/dk akış hızı, metanol:asetonitril:su (40:40:20, h/h/h) hareketli fazı ve izokratik elüsyon çalışma parametreleri kullanılmıştır. Alı konma süresi 2.5 dakika ve korelasyon katsayısı 0.9997 olarak tespit edilmiştir. Yöntemin 10-60.0 µg/mL derişim aralığında doğrusal, yüzde geri kazanım %98.9-100.2, gün içi ve günler arası BSS sırasıyla %0.56 ve %0.73 olarak belirlenmiştir.

Harischandran ve ark⁷² silodosin miktar tayini için HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Çalışmada, ters faz Phenomenex C18 kolon, 25 ° C sıcaklık, 0.1 mL/dk akış hızı, metanol:su:asetonitril:glasiyal asetik asit (pH:3.2, 60:27:10:3 h/h/h/h) karışımından oluşan bir hareketli faz ve 270 nm dalga boyundan oluşan kromatografik parametreleri kullanılmıştır. Yöntemin çalışma aralığı 10.0-100.0 µg/mL, silodosinin alıkonma zamanı 2.2 dk, LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.003 µg/mL ve 0.010 µg/mL, farmasötik preparattan yüzde geri kazanım %94.79-95.37 olarak belirlenmiştir. Yöntem silodosinin farklı koşullarda meydana gelen bozunma ürünlerinden ayrılmasında uygulanmıştır.

Er ve Erk⁷³ silodosin miktar tayini için ters faz HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Çalışmada, 1.3 mL/dk akış hızı, metanol:asetonitril:amonyum asetat (pH 4.0; 0.015 M; 40:30:30, h/h/h) hareketli faz, izokratik elüsyon, 270 nm dalga boyu, Agilent ZORBAX CN kolonundan oluşan kromatografik parametreleri kullanmışlardır. Önerilen yöntem, optimize edilmiş koşullar altında 85.0 nM'lik teşhis limitine ve 4.0-600.0 µM derişim aralığında doğrusal olduğu belirlenmiştir. Uygulanan HPLC yöntem sonuçları önceden geliştirilmiş olan spektrofotometrik yöntemle istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve HPLC

yönteminin performans sonuçlarının oldukça tatmin edici olduğu tespit edilmiştir. Yöntemin geri kazanım değeri ortalama olarak %99.5 belirlenmiştir.

Shaik ve ark⁷⁴ silodosini hidroliz (asit ve baz), oksidasyon, fotoliz ve termal bozulma gibi stres koşullarına maruz bırakarak kararlılık testlerini yapmak için ters faz HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Çalışmada, bir Agilent Poroshell 120 EC-C18 kolonu (50 x 4.6 mm x 2.7 µm), 273 nm dalga boyu, asetonitril ve %0.1 trietil amin içeren (pH 6.0'a ayarlanmış) 10 mM amonyum asetat tamponundan oluşan bir hareketli faz ve doğrusal gradient elüsyonundan oluşan kromatografik parametreler kullanılmıştır. Silodosin için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 80.0 ve 250.0 ng/mL, yüzde geri kazanımı %98.6-102.7 ve çalışma aralığı 0.25-1.5 µg/mL olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntem silodosinin kararlılık testlerinde başarı ile uygulanmıştır.

Toker ve ark⁷⁵ farmasötik formülasyonlarda silodosinin miktar tayini için elektrokimyasal ve spektroskopi yöntemlerini geliştirmişlerdir. Silodosinin elektrokimyasal oksidasyonu camı karbon elektrot (GCE), siklik voltametri ve diferansiyel puls voltametrisi incelenmiştir. Tarama hızı, pH ve derişimin pik akımlar üzerindeki etkisi, silodosinin kantitatif tespiti için optimize edilmiştir. Silodosinin maksimum oksidasyonu GCE'de, pH 2.0 BRT'de 696.0 mV'de, diferansiyel darbe voltametrisi kullanılarak gözlemlenmiştir. Oksidasyon işleminin geri dönüşümsüz ve difüzyon kontrollü olduğu saptanmıştır. Doğrusal derişim aralığı ve teşhis limitinin 0.001-1.0 mM ve 11.6 µM (S/N=3) olduğu belirlenmiştir. Metanolle seyreltilen silodosin numunelerinin 1D-Türev spektrumu 260.40 nm dalga boyunda alınmıştır. Yöntemin teşhis limiti 6.51 µM ve 18.2-182.0 µM derişim aralığına doğrusal olduğu belirlenmiştir.

Goud ve ark⁷⁶ silodosinin saf ve kapsül dozaj formunda miktar tayini için HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Çalışmada, ortofosforik asit ile pH 3.0'e ayarlanmış fosfat tamponu-asetonitril (%40:60, h/h) hareketli fazı, fenomenax Luna C18 (150 mm x 4.6

mm, 5 µm) kolonu, 219 nm dalga boyu ve 0.8 mL/dk akış hızı çalışma parametrelerini kullanmışlardır. Alıkonma süresi 2.32 dakika, yöntemin 50-90 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu, LOD ve LOQ değerlerini ise sırasıyla 2.93 ve 9.91 µg/mL olarak belirlemişlerdir.

2.5.1.2. Tamsulosin

Walash ve ark⁷⁷ iyi huylu prostat hiperplazisi ve erektil disfonksiyon semptomlarını tedavi etmek için birlikte kullanılan alfuzosin, tamsulosin ve vardenafil'in miktar tayinleri için HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Çalışmada, izokratik elüsyon, pH:3.0'de fenil-heksil kolonu (250 x 4.6 mm, 3 µm), asetronitril/ %0.25 fosforik asitten (30:70, h/h) oluşan bir hareketli faz, floresans dedektör, 226 nm eksitasyon dalga boyu 450 nm emisyon dalga boyu ve 1.2 mL/dk akış hızı kromatografik parametreler kullanılmıştır. Tamsulosin alıkonma süresi 7.0 dakika ve teşhis limiti 2.81 ng/mL olarak tespit edilmiştir.

Pashaei ve ark⁷⁸ insan plazmasında tamsulosin miktar tayini için bir HPLC-UV yöntemini geliştirmişlerdir. Yöntem 0.9988 korelasyon katsayılı 0.5-50.0 ng/mL derişim aralığında doğrusal olduğu, 0.17 ng/mL teşhis limiti, 0.48 ng/mL miktar tayin limiti, gün içi ve günler arası kesinlik sırasıyla %5.6–7.2, %2.9–4.2 ve geri kazanım değeri %98.1–101.4 arasında tespit edilmiştir. Tamsulosin süperparamanyetik grafen oksit-Fe₃O₄ nanokompozitler yardımı ile modifiye edilerek ve manyetik-dispersif katı faz ekstraksiyon yöntemiyle plazmadan tamsulosin ekstrakte edilmiştir.

Macek ve ark⁷⁹ tamsulosinin plazmada miktar tayini için HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. İnsan plazmasından tamsulosin ekstraksiyonunda butil asetat kullanarak sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemini kullanmışlardır. Çalışmada, oktadesilsilika kolon (55 mm x 4 mm, 3 µm), asetronitril:30 mM dihidrojenpotasyum fosfat tamponundan (25:75 h/h) oluşan hareketli faz ve florometrik dedektör (228/326 nm) parametrelerini

kullanmışlardır. Çalışma süresi 3.5 dakika olarak belirlenmiştir. Geliştirdikleri HPLC yönteminde floresans dedektörü yardımı ile çok düşük seviyelerdeki (0.4 ng/mL) tamsulosini ölçebilmişlerdir.

Kumari ve ark⁸⁰ tarafından HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Yöntemde; 50:50 h/h oranında asetonitril ve sudan oluşan hareketli faz, ters faz C18 kolonu, 214 nm dalga boyu ve 1.5 mL/dk akış hızı çalışma parametrelerini kullanmışlardır. Tamsulosin hidroklorür alıkonma süresi 1.7 dakika ve yöntemin 5.0-100.0 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu tespit edilmiştir.

Chandorkar ve ark⁸¹ içerisinde safsızlıkları da bulunan tamsulosin numunesinin analizi için HPLC-UV yöntemini geliştirmişlerdir. Tamsulosini safsızlıklardan C8 kolonu yardımı ile ayrılmış ve 280 nm dalga boyunda analiz edilmiştir. Geliştirdikleri HPLC yönteminin geçerlilik testlerini de yapmışlardır.

Kumar ve ark⁸² tamsulosinin farmasötik preparatlarda miktar tayini ve kararlılık testlerini gerçekleştirmek için HPLC-UV yöntemini geliştirmişlerdir. Tamsulosinin ayırımı için C18 kolon kullanmışlar ve 275 nm dalga boyunda analizi gerçekleştirmişlerdir. Geliştirilen yöntemin geçerlilik testleri yapıldıktan sonra farmasötik preparatlarda tamsulosin miktar tayini yapılmıştır.

Nithiyananthan ve ark⁸³ farmasötik preparatlarda tamsulosin miktar tayini için geliştirdikleri HPLC yönteminde ters faz C18 kolon, sodyum dihidrojen ortofosfat tamponundan oluşan hareketli faz, UV dedektör ve 280 nm dalga boyunu kullanmışlardır.

Laha ve ark⁸⁴ farmasötik preparatlarda tamsulosin miktar tayini ve zorlanmış degradasyon için HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Tamsulosin, asit ve alkali hidrolizine, oksidasyona, ısıya ve foto bozulmasına maruz bırakılmıştır. C18 kolon ve fosfat tamponundan oluşan hareketli faz yardımı ile tamsulosin bozunma ürünlerinden

ayrılmıştır. Zorlanmış degradasyon çalışmasında, tamsulosin asidik ve bazik koşullar altında ve oksidasyonda bozulmaya uğradığı tespit edilmiştir.

Jain ve ark⁸⁵, Ace5 C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm) kolonu ve 10 mmol/L metanol ve su (70:30 h/h) oluşan hareketli fazı kullanılarak tamsulosin hidroklorürü bozunma ürünlerinden ayırmak için izokratik, ters fazlı bir HPLC yöntemini geliştirilmiştir. Tamsulosin hidroklorür, hidroliz (asit, baz), oksidasyon, fotoliz ve termal bozunma stres koşullarına tabi tutulmuştur. Bazda, asitte ve %30.0 H₂O₂'de tamsulosin hidroklorürün bozunduğu gözlemlenmiştir. Diğer zorlanmış degradasyon şartlarında stabil olduğu tespit edilmiştir. Tamsulosin hidroklorürün geri kazanım yüzdesi %98.65 ve %100.01 arasında belirlenmiştir.

Thimmaraju ve ark⁸⁶ finasterid ve tamsulosin miktar tayini için HPLC yöntemini geliştirip geçerlilik testlerini yapmışlardır. Yöntemde, 10-At detergil hipersil ODS C18 kolon, 1.8 mL/dk akış hızı ve asetonitril: 0.05 M KH₂PO₄ tamponu (45:55, h/h) oluşan hareketli faz çalışma parametrelerini kullanmışlardır. Yöntemin finasterid için 125.0-625.0 µg/mL ve tamsulosin için 10.0-50.0 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu tespit edilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla finasteride için 1.25 µg/mL ve 4.166 µg/mL, tamsulosin için ise 0.495 µg/mL ve 1.635 µg/mL olarak belirlenmiştir. Geri kazanım değerleri finasteride için %100.76 ve tamsulosin için %99.06 olarak bulunmuştur.

Patel ve ark⁸⁷ BPH tedavisinde birlikte kullanılan dutaserid ve tamsulosin ilaçlarının eş zamanlı miktar tayini için HPLC ve HPTLC yöntemlerini geliştirmişlerdir. HPLC yönteminde, metanol-0.02 M amonyum asetat tamponu (pH 9.5, trietilamin ile ayarlanmış, 85:15, h/h) içeren hareketli faz, C18 kolonu, 274 nm dalga boyu ve foto diyot dizisi (PDA) detektörden oluşan çalışma parametrelerini kullanmışlardır. HPLC yönteminin her iki madde için 1.0-20.0 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu tespit

edilmiştir. Tamsulosin ve dutaseridin geri kazanım değerleri sırasıyla 98.18 ± 0.698 ve 99.94 ± 0.611 olarak belirlenmiştir.

Zhang ve ark⁸⁸ tamsulosinin R ve S izomerlerini birbirlerinden ayırıp miktar tayini için HPLC-UV yöntemini geliştirmişlerdir. İzomerlerin bazal ayrılması, hareketli faz olarak 50.0 mmol / 1 KPF6-asetonitril (h/h (70:30), pH 5.0) ikili çözücü karışımıyla bir Chiralcel OD-RH kolonunda 35 dakika içerisinde gerçekleştirilmiştir. Hem R-izomer hem de S-izomerin teşhis limiti ve miktar tayin limiti sırasıyla 0.11 ve 0.44 ng/mL ve bağıl standart sapması R-izomeri için %0.42 ve S-izomer için %0.64 olarak tespit edilmiştir. Kantor-Boruta ve ark⁸⁹ amiloz tris (3.5-dimetilfenilkarbammat) durağan fazı yardımı ile (R, S)-tamsulosin enantiyomerlerinin ayrımı ve (R)- ve (S)-tamsulosin tayini için yeni bir kromatografik yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemi ticari preparatlara uygulamışlardır.

Basaveswara ve ark⁹⁰ tamsulosinin çözünme testleri için, yeni bir kromatografik yöntem geliştirip geçerlilik testlerini yapmışlardır. Geliştirdikleri yöntemi kullanarak tamsulosinin çözünme testlerine başarıyla uygulamışlardır.

Krishna ve ark⁹¹ fotodiyot array dedektör vasıtası ile tamsulosin ve bozunma ürünlerini ayıracak ve tamsulosin miktar tayinini gerçekleştirecek bir kromatografik yöntem geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri yöntemle tamsulosinin kararlılık testlerini uygulamışlardır.

Cheng ve ark⁹² sürekli salınım kapsüllerinde tamsulosin hidroklorür ve ilgili yardımcı maddelerin belirlenmesi için bir HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Çalışmada, 30°C sıcaklık, ODS(150 mm×4.6 mm, 5 µm) kolon, 1.0 mL/dk akış hızı, metanol:0.2 mmol/L Na₂HPO₄-KH₂PO₄ (pH 5.9; 6:4, h/h) hareketli fazı ve 275 nm dalga boyu parametrelerini kullanmışlardır. Bu yöntemi tamsulosin içeren ticari kapsüle uygulamışlardır.

Nanda ve ark⁹³ farmasötik dozaj formunda tamsulosinin miktar tayini için üç farklı spektroskopi yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntem A: tamsulosinin maksimum absorbands verdiği 281 nm dalga boyunda analizleri gerçekleştirmişlerdir. Yöntem B: 234.5 nm dalga boyunda 1D-Türev spektrumları alınarak analiz gerçekleştirilmiştir. Yöntem C: 286.0-276.0 nm dalga boyu aralığında alınan spektrumun eğri altındaki alan (AUC) alınarak analiz gerçekleştirilmiştir. Her üç yöntemin 5.0-25.0 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu tespit edilmiştir. Önerilen yöntemler, ticari farmasötik preparatlarda tamsulosinin eş zamanlı tayini için başarıyla uygulandığı belirtilmektedir.

Gadhve ve ark⁹⁴, tamsulosinin tablet dozaj formunda analizini gerçekleştirmek için, su ile seyreltikleri tamsulosin çözeltilerini spektroskopi yöntemile analiz etmişlerdir. 279 nm'de maksimum absorbands ve birinci Türev spektrumlarında 298 nm'de keskin tepe noktaları ve eğri altındaki alanı (AUC) 263-298 nm dalga boyu aralığında elde etmişlerdir. Yöntemler 1.0-6.0 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu gözlenmiştir.

Bari ve ark⁹⁵, tabletlerde tamsulosin hidroklorür tayini için iki adet UV-Görünür Bölge Spektroskopi ve Birinci Derece- Türev yöntemlerini geliştirmişlerdir. Çözücü olarak metanol:su (2:8) karışımı kullanılmıştır. UV-Görünür Bölge Spektroskopi yönteminde tamsulosinin maksimum absorbands gösterdiği 280 nm dalga boyunda, 298 nm dalga boyunda birinci dereceden Türev spektrumları alınarak analizler gerçekleştirilmiştir. Yöntemler 10.0-90.0 µg/mL derişim aralığında doğrusallık göstermiştir.

Shrivastava ve ark⁹⁶, farmasötik dozaj formlarında tamsulosin hidrokloridin miktar tayini için spektroskopi yöntemi geliştirmiş ve yöntem geçerlilik testlerini yapmışlardır. Yöntem tampon varlığında kinonoid formuna (mor renk) iyonize edilmiş boya bromofenol mavisinin ilaç formuyla 1:1 reaksiyona girerek ve bir iyon çifti

kompleksi (sarı renk) oluşturmasına dayanmaktadır. Oluşan kompleks 421 nm dalga boyunda absorbans ı olülmüştür. Eğim, keşişme ve korelasyon katsayısı sırasıyla 0.054, -0.020 ve 0.999 olarak bulunmuştur.

Chaudhari ve ark⁹⁷ tamsulosine, asidik ortamda bilinen fazla miktarda Bromat-bromür karışımı ile brominasyon işlemi uygulamışlardır. Oluşan kompleks yapı metil turuncu ile reaksiyona sokularak fazla brominin miktarı belirlenmektedir. Böylece tamsulosinin tayini türevlendirme yapılarak spektroskopi yöntemiyle 513 nm dalga boyunda absorbansları okunarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma aralığı 2.0-12.0 µg/mL, LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.57 ve 1.74 µg/mL olarak bulunmuştur.

Patel ve ark⁹⁸ tablet formülasyonlarında tamsulosinin miktar tayini için spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Tamsulosin için eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 226 ve 322 nm, çalışma aralığı 5.0-30.0 µg/mL, LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 1.36 ve 4.92 µg/mL bulunmuştur.

Raghubabu ve ark⁹⁹ tamsulosin hidroklorürün saf ve katı dozaj formlarında miktar tayini için iki spektroskopi yöntemi geliştirmişlerdir. İlk yöntemde, folin reaktifinin tamsulosin ile sarımsı kahverengi renkli türlerin oluşturmasına dayanır ve 440 nm'de maksimum absorbans göstermektedir. Diğer yöntemde ise, sodyum nitroprussid-asetaldehit reaktifi ile tamsulosinin 560 nm'de maksimum absorbsiyon sergileyen mor kırmızı renkli türleri oluşturmasına dayanmaktadır. Lambert-Beer grafiklerinin regresyon analizleri, 1 ve 2. yöntemler için sırasıyla 16-48 ve 8.0-24 µg/mL derişim aralıklarında iyi bir korelasyon gösterirken, sonuçlar ise sırasıyla %1.11 ve 0.92 bağıl standart sapma değerleriyle yüksek kesinlik gösterdiği tespit edilmiştir. Önerilen yöntemler ticari olarak temin edilebilir tabletlere uygulanmıştır ve sonuçlar UV referans yöntemi ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. 1. ve 2. Yöntemin geri kazanım değerleri sırasıyla, %99.54±0.73 ve 99.406±0.389 olarak bulunmuştur.

Saradhi ve ark¹⁰⁰ tamsulosinin saf ve tablet dozaj formlarında tayini için dört spektroskopi yöntemi (A, B, C ve D) geliştirilmiştir. A, B ve C yöntemleri, ilacın, sırasıyla alkalın ortamda 4 amino antipirin, orsinol ve resorsinol ile reaksiyon esasına dayanmaktadır. Elde edilen renkli kompleksler, sırasıyla 4 amino antipirin, orsinol ve resorsinol için 400, 440 ve 430 nm dalga boyunda maksimum absorbans gösterdiği tespit edilmiştir. D yönteminde ise tamsulosin ve eriokrom siyahı T'nin mor renkli iyon çifti kompleksinin oluşumuna ve kloroformla ekstrakte edilmesine dayanır. Oluşan kompleks, 520 nm'de maksimum absorbans verdiği gözlemlenmiştir. Önerilen tüm yöntemlerin 4.0-20.0 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu, farmasötik preparatlardan geri kazanım değerleri A, B, C ve D yöntemleri için sırasıyla %96.0, 96.0, 98.0 ve 92.0 olarak bulunmuştur.

Thimmaraju ve ark¹⁰¹ standart çözeltiler ve tabletlerde finasterid ve tamsulosinin eşzamanlı olarak belirlenmesi için UV-Görünür Bölge Spektroskopi yöntemi geliştirip ve geçerlilik testlerini yapmışlardır. Metanolde finasterid ve tamsulosin sırasıyla 219 ve 224 nm dalga boylarında maksimum absorbans gösterdiği tespit edilmiştir. Eşleşen kuvars hücreli bir Elico UV - Görünür spektrofotometre (model SL - 159) kullanarak geliştirilen yöntemin 1.0-5.0 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu, 0.9989 korelasyon katsayısı ve 0.4096 standart sapma değeri bulunmuştur.

Kategaonkar ve ark¹⁰² kombine tablet dozaj formunda tamsulosin ve finasteride'in eşzamanlı olarak tayin edilmesi için 1D-Türev Spektroskopi yöntemi geliştirmiş ve geçerlilik testlerini yapmışlardır. Tamsulosin 229.91 nm dalga boyunda 1D-Türev spektrumlarını almışlardır. Beer yasası, tamsulosin için 2.0-10.0 µg/mL derişim aralığında uygun görülmüştür. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.19 ve 0.54 µg/mL bulunmuştur.

Nanda ve ark¹⁰³ tamsulosin ve tolterodinin farmasötik dozaj formunda tayini için iki farklı yöntem geliştirmişlerdir. İlk yöntem, eğri yönteminin altındaki kalan alandır; tamsulosin ve tolterodinin analizi için sırasıyla, 220.5-230.5 nm ve 279.0-289.0 nm dalga boyları arasında oluşan eğrilerin altındaki alanlar seçilmiştir. İkinci yöntem, 1D-Türev spektroskopi yöntemi olup, tamsulosin ve tolterodinin analizi için sırasıyla 221.5 nm ve 234.0 nm dalga boylarında spektrumları alınmıştır. Her iki yöntemin tamsulosin ve tolterodin için sırasıyla 5.0-25.0 µg/mL ve 10.0-50.0 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu gözlemlenmiştir.

Choudhari ve ark¹⁰⁴ tamsulosin ve dutaseridin farmasötik dozaj formunda tayini için iki farklı yöntem geliştirmişlerdir. İlk yöntem, eğri altındaki alan spektroskopi yöntemi olup tamsulosinin analizi için 222.50-223.62 nm dalga boyları arasında oluşan eğrinin altındaki alanlar tayinde kullanılmıştır. İkinci yöntemde ise 232.60 nm dalga boyunda 1D-Türev spektrumları alınarak analizler gerçekleştirilmiştir. 1D-Türev Spektroskopi yönteminde tamsulosin için çalışma aralığı ve farmasötik preparattan geri kazanım değerleri sırasıyla, 8.0-40.0 µg/mL ve %100.02–101.09 olarak belirlenmiştir. Eğri altındaki alan spektroskopi yönteminde ise çalışma aralığı ve farmasötik preparattan geri kazanım değerleri sırasıyla, 4.0-20.0 µg/mL ve %99.52-101.25 olarak bulunmuştur.

Fan ve ark¹⁰⁵ tarafından tamsulosin hidroklorürün kontrollü salınımlı tabletinin oral olarak uygulanmasından sonra köpek plazmasında tamsulosin tayini için bir sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrik (LC-MS/MS) yöntemi geliştirilmiş ve geçerlilik testleri yapılmıştır. n-heksan-diklorometan (2:1) ile köpek plazmasından tamsulosin ve iç standart ekstrakte edilmiştir. Çalışmada metanol-asetonitril-amonyum format (10 mmol/L; 30:40:30, h/h/h) içeren bir hareketli faz, 0.4 mL/dk akış hızı ve Bonchrom XBP-C18 kolonundan oluşan çalışma parametreleri kullanılmıştır. Kütle spektrometrik algılama, pozitif modda atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon (APCI)

kaynağı ile donatılmış üçlü dört kutuplu bir tandem kütle spektrometresi üzerinde gerçekleştirilmiştir. Tamsülosin için m/z 409 $\rightarrow$ 228 geçişlerinin seçilen reaksiyon izleme (SRM) ve iç standart için sırasıyla m/z 256 $\rightarrow$ 167 kullanılarak ölçüm yapılmıştır. Yöntemin 0.02-50.0 ng/mL derişim aralığında doğrusal olduğu ve LOQ değeri ise 0.02 ng/mL olarak tespit edilmiştir. Doğruluk bağıl hata (RE) ile verilmiş ve %-2.61 ile %8.82 arasında değiştiği belirlenmiştir.

Matsushima ve ark¹⁰⁶ plazma ve idrarda tamsulosin hidroklorürün belirlenmesi için sıvı kromatografi-elektrosprey tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) yöntemini geliştirmişlerdir. Plazma, plazma diyalizat ve idrar örnekleri sıvı faz ekstraksiyonu yöntemi ile ekstre edilip ve bir elektrosprey iyonizasyon ara yüzü vasıtasıyla bir kütle spektrometresine bağlanmış bir HPLC sistemi kullanılarak analiz edilmiştir. Bu yöntem, plazma diyalizatta 10.0-1000.0 ng/mL, plazma içinde 0.5-50.0 ng/mL ve idrarda 1.0 ila 100.0 ng/mL derişim aralığında analizleri gerçekleştirilmiştir.

Ding ve ark¹⁰⁷ insan plazmasında tamsulosin miktar tayini için sıvı kromatografi-elektrosprey iyonizasyon-kütle spektrometresi (LC-ESI-MS) yöntemini geliştirmişlerdir. Doymuş sodyum bikarbonat ile alkalileştirmeden sonra, plazma etil asetat ile ekstre edilmiş ve tamsulosin bir metanol-su-asetik asit-trietilamin (620: 380; 1.5: 1.5, h/h) hareketli fazı kullanılarak bir C18 ters faz çalışma parametreleri kullanılmıştır. Hedef iyonlar tamsulosin için m/z 228'de ve seçilen iyon izleme (SIM) modunda LC-ESI-MS ile analiz gerçekleştirilmiştir. 0.2-30.0 ng/mL derişim aralığında lineer olan kalibrasyon eğrileri türetilmiştir. Kalite kontrol örnekleri gün içi ve günler arası ölçümlerde düşük (0.5 ng/mL), orta (3 ng/mL) ve yüksek (30 ng/mL) kalite kontrol numuneleri için %2.14 ile 8.87 arasında değişmiştir. Tamsulosinin plazmadan geri kazanımı %84.2-94.5 arasında belirlenmiştir.

Keski-Rahkonen ve ark¹⁰⁸ tamsulosinin gözle ilgili advers etkilerini incelemek için insan göz içi sıvısında ve serumunda tamsulosin tayini için bir LC-MS/MS yöntemini geliştirmişlerdir. Göz içi sıvı örnekleri, iç standart labetalol eklendikten sonra doğrudan enjeksiyonla analiz edilmiştir. Serum numunesi hazırlanmasında etil asetat ile sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Kromatografik ayrıştırma, 0.2 mL/dk akış hızında asetonitril-%0.1 formik asit ile gradient elüsyonuyla ters fazlı bir C8 kolon üzerinde gerçekleştirilmiştir. Analitlerin tespiti ve ölçümü, pozitif elektrosprey iyonizasyonu (ESI) ve çoklu reaksiyon izleme (MRM) kullanılarak doğrusal bir iyon tuzağı kütle spektrometresi ile gerçekleştirilmiştir. Teşhis limiti hem göz içi sıvısı hem de serum numuneleri için 0.1 ng/mL idi ve göz içi sıvısı ve serum numuneleri için sırasıyla 0.1-4.7 ng/mL ve 0.1-19.3 ng/mL derişim aralığında doğrusallık elde edilmiştir.

Choi ve ark⁵⁷ insan plazmasında tamsulosin miktar tayini için tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) yöntemini geliştirmiş ve yöntem geçerlilik testlerini yapmışlardır. Metil tert-bütül eterle sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi, 10 mM amonyum format tamponlu (pH 3.5)-metanol (25:75, h/h) oluşan hareketli faz, 200.0 µL/dk akış hızı ve ters faz Luna C18 kolondan (2.0 mm x 50 mm, 5 µm) oluşan çalışma parametrelerini kullanmışlardır. Tamsulosin ve iç standardın (IS, difenhidramin) alıkonma süreleri sırasıyla 0.8 ve 0.9 dk, tayin limiti 0.01 ng/mL ve doğrusal çalışma aralığı 0.01-20 ng/mL ($r > 0.999$) bulunmuştur.

Ksycińska ve Rudzki¹⁰⁹ geliştirdikleri LC-MS yönteminde tamsulosin için pozitif modda m/z 409.05'te bulunan hedef iyonlar kullanmışlardır. Numune hazırlama için, 0.5 mL plazmaya doymuş sodyum bikarbonat çözeltisinin eklenmesinden sonra heksan-etil asetat (1:1) ile sıvı-sıvı ekstraksiyon yönteminini kullanmışlardır. Endojen bileşiklerden ayrılma, 40 °C ve 0.5 mL/dk akış hızında metanol ve 0.05 M amonyum asetat tamponundan (pH 3.7; 6:4, h/h,) oluşan hareketli faz kullanılarak bir Nucleosil C18, 5

mm (125 mm x 4.0 mm x 5µm) kolonunda yapılmıştır. Yöntemin LOD ve LOQ değerleri sırası ile 0.1 ve 0.7 ng/mL, çalışma aralığı ise 0.7-35.0 ng/mL olarak bulunmuştur.

Ramakrishna ve ark¹¹⁰ çalışmalarında tamsulosini plazmadan dietil eter-diklorometan (70:30, h/h) ile sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi ile ekstraksiyonu gerçekleştirmişlerdir. Kromatografik ayırma, %0.03 formik asit-asetonitril (30:70, v v) hareketli faz ve bir ters faz Waters simetri C18 kolonunda gerçekleştirildi. Protonlanmış analit, kütle spektrometresiyle çoklu reaksiyon izlemesi ile pozitif iyonlaşmada ölçülmüştür. m/z 409.1→228.1 kütle geçişi tamsulosini ölçmek için kullanılmıştır. Deney, insan plazmasında tamsulosin için 0.1-50.0 ng/mL'lik bir doğrusal aralık sergilemiştir. LOQ değeri 100.0 pg/mL bulunmuştur. Her numune için 2.0 dakikalık bir çalışma süresi, günde 400'den fazla insan plazması numunesinin verimini analiz etmeyi mümkün kılmıştır.

Nguyen ve ark¹¹¹ insan plazmasında tamsulosin miktar tayini için LC-MS-IT-TOF yöntemini geliştirmişlerdir. Tamsulosin standart Gemini C18 (150 mm x 4.6 mm, 5 µm) kolonunda metanol:%5 formik asit tamponu (50:50, h/h) çözücülerinden oluşan bir hareketli faz yardımı ile ayrılmıştır. Yöntemin, 4 dakikalık çalışma süresine ve 0.5-50.0 ng/mL derişim aralığında doğrusallık olduğu gösterilmiştir. LOQ değeri 0.5 ng/mL olarak tespit edilmiştir.

Agarwal ve ark¹¹² insan plazmasında tamsulosin ve dutasteridin eşzamanlı miktar tayini için LC-MS/MS yöntemini geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırım; sıvı-sıvı ekstraksiyonunun peşine bir Gemini C-18 (50 mm x 2.0 mm, 3 µm) kolonu ve metanol:amonyum format (97:3, h/h) bileşenlerinden oluşan hareketli fazın kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bir turbo iyon spreysi tarafından pozitif modda oluşturulan proton iyonları analitleri ve iç standardı tespit etmek için kullanılmıştır. MS-MS tespiti,

tamsulosin için 409.1→228.1 (m/z) fragmentasyonunu izleyerek yapılmıştır. Tamsulosin için miktar tayin limiti 1.0 ng/mL idi.

2.5.1.3. Solifenasin Süksinat

Singh ve Nanda¹¹³ yaptıkları çalışmada tablet dozaj formlarında solifenasin süksinatın tayini için iki farklı spektroskopi yöntemi geliştirmişlerdir. Her iki yöntem 10.0–60.0 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu tespit edilmiştir. Doğrusal olduğu her derişimdeki numunenin üzerlerine yöntem I için 5.0 mL bromo timol mavisi ve yöntem II için 5.0 mL bromo fenol mavisi reaktifleri eklenmiştir. Daha sonra 5.0 mL kloroform ilave edilip, reaksiyon karışımı beş dakika boyunca çalkalandıktan sonra, sulu ve kloroform katmanları ayırma hunisi kullanılarak ayrılmıştır. Yöntem I ve II için sırasıyla maksimum absorbans verdiği 415.6 nm ve 412 nm dalga boylarında ölçümler alınmıştır ve geri kazanım değerleri sırasıyla %99.64-99.86 ve 99.82-99.97 arasında, bağıl standart sapma 0.29 ve 0.28, korelasyon katsayıları 0.9994 ve 0.9999 olarak bulunmuştur.

Saiyed ve ark¹¹⁴ yaptıkları çalışmada kombine dozaj formunda alfuzosin hidroklorür ve solifenasin süksinatın belirlenmesi için Birinci-derece Türev Spektroskopi yöntemi geliştirmişlerdir. Birinci Derece- Türev spektrumları metanol ortamında solifenasin süksinat için 223 nm dalga boyunda spektrumları alınmıştır. Doğrusallık, 0.9992 korelasyon katsayısı (R^2) ile solifenasin süksinat için 3.0-18.0 µg/mL derişim aralığında, LOD değeri 0.45 µg/mL ve LOQ değeri 1.53 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Madhu Kiran ve Rambabu¹¹⁵ solifenasin süksinatın saf ve oral dozaj formlarında tayini için iki spektroskopi yöntemi (Yöntem-I ve II) geliştirmişlerdir. Önerilen yöntemler solifenasin süksinatın (yöntem I ve II) pH 9.8'de sırasıyla bazik boyalar (metilen mavisi ve metilen menekşe) ile arasındaki kompleks reaksiyonlarına dayanmaktadır. Beer-Lambert grafikleri, yöntem I ve II için 2.0-10.0 µg/mL derişim aralığında iyi korelasyon göstermiştir. Yöntem I ve II için maksimum absorbans 615 ve

620 nm dalga boyunda gözlemlenmiştir. Ayrıca yöntem I ve II için sırasıyla LOD değerleri 0.407 ve 0.364 µg/mL, LOQ değerleri 1.35 ve 1.18 µg/mL, yüzde bağıl standart sapma %1.067 ve %1.165, yüzde geri kazanım değerleri %99.49-100 aralığında tespit edilmiştir.

Rakesh ve ark¹¹⁶ solifenasin süksinatın tablet formlarında miktar tayini için spektroskopi yöntemi geliştirilmiş ve yöntem geçerlilik testleri yapılmıştır. Solifenasin süksinat numuneleri %100 trietilamonyum fosfat tamponu (pH 2.5) kullanılarak hazırlanmış ve 215 nm dalga boyunda analizleri gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen yöntem, 5.0-15.0 µg/mL derişim aralığında doğrusallık, %1.27 standart sapmaya sahip kesinlik ve %98-102 arasında geri kazanım göstermiştir. Teşhis limiti (LOD) ve miktar limiti (LOQ) sırasıyla 1.106 µg/mL ve 3.35 µg/mL olarak bulunmuştur.

Teja ve ark¹¹⁷ geliştirdikleri spektroskopi yönteminde solifenasin süksinatın 220 nm dalga boyunda maksimum absorbans gösterdiği tespit edilmiştir. Geliştirilen yöntemin 2.0-10.0 µg/mL derişim aralığında Beer'in yasasına uyduğu belirlenmiştir. Yöntemin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.301786 µg/mL ve 0.914505 µg/mL, geri kazanım değeri ise %99.174 - %101.012 aralığında hesaplanmıştır.

Shaik ve ark¹¹⁸ solifenasin süksinatın tablet dozaj formunda miktar tayini için ters faz HPLC yöntemini geliştirmişler ve yöntem geçerlilik testlerini yapmışlardır. Kromatografik ayırma, %0.1 trietilamin içeren monobazik potasyum fosfat (pH 3.5) ve metanolden (gradient elüsyon) oluşan bir hareketli faz kombinasyonu ile çevre sıcaklığında tutulan bir Inertsil ODS 3V C18 (150 mm x 4.6 mm, 5 µm) kolon varlığında 1.5 mL/dk akış hızı ve 220 nm'de UV detektörü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Solifenasin süksinatın alıkonma zamanı 5.12 dk olarak belirlenmiştir. Yöntemin doğrusal çalışma aralığı 10.0-100.0 µg/mL, LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.02 ve 10.0 µg/mL, yüzde geri kazanım değeri ise ortalama %95.38 olarak bulunmuştur.

Annapurna ve ark¹¹⁹ tablet dozaj formlarında solifenasin süksinat miktar tayini için izokratik ters faz sıvı kromatografik yöntemini geliştirmişler ve yöntem geçerlilik testlerini yapmışlardır. Yöntemde, tetra bütıl amonyum hidrojen sülfat (10 mM): asetonitril (40:60, h/h) hareketli fazı, 0.8 mL/dk akış hızı, C18 kolonunu, UV dedektörü ve 254 nm dalga boyu çalışma parametrelerini kullanmışlardır. Doğrusallık, 20.0-200.0 µg/mL derişim aralığında gözlenmiştir ($R^2 = 0.999$). Miktar tayin limiti 0.845 µg/mL, teşhis limiti ise 0.0269 µg/mL olarak bulunmuştur.

Yanagihara ve ark¹²⁰ solifenasin süksinatın rat plazmasında tayini için yarı mikro HPLC-UV yöntemi geliştirmişler ve yöntem geçerlilik testlerini yapmışlardır. Solifenasin süksinatın 1.0 mL rat plazmasından ekstraksiyonu için tert butil metil eterin kullanılmıştır. Ekstraktın, 0.1 M fosfat tamponu (pH 3.0): asetonitrilden (71:29, h/h) oluşan bir hareketli faz ve TSKgel ODS-80T (5 µm, 150 mm x 2.0 mm id) ters faz kolonu kullanılarak kromatografik ayrımı gerçekleştirilmiştir. Gün içi kesinlik için varyasyon katsayısı %0.4 ile %1.7 arasında, bağıl hata %5-5 ile %2.0 arasında tespit edilmiştir. 1.0 mL plazma kullanıldığında, solifenasin için LLOQ 2 ng/mL, çalışma aralığı 2.0-1000.0 ng/mL, alıkonma zamanı 18.2 dk ve ekstraksiyon geri kazanım değeri %83.2-88.1 olarak bulunmuştur.

Attia ve ark¹²¹ saf ve farmasötik dozaj formlarında solifenasin süksinat, flavoxate HCl ve toltoridin tartaratin miktar tayini için ters faz HPLC yöntemi geliştirilmişlerdir. Önerilen RP-HPLC yöntemde XterraRP-18 kolonu (5 µm x 25 cm x 4.6 mm) , 1.0 µL/dk, akış hızı, 20.0 µL enjeksiyon hacmi, 200 nm dalga boyu, 0.05 M pentan sülfonik asit sodyum tuzu (pH 3.0±0.05) ve asetonitrilden (50:50 h/h) oluşan hareketli faz çalışma parametrelerini kullanmışlardır. Solifenasinin alıkonma zamanı 4.1±0.1 dk, kalibrasyon eğrisin 0.1-100.0 µg/µL derişim aralığında doğrusal ($R^2: 0.9993$), LOD ve LOQ

değerlerinin sırasıyla 0.018 ve 0.054 µg/µL ve ortalama geri kazanım değerinin ise %99.80 olduğu belirlenmiştir.

Krishna ve ark¹²² tarafından aşırı aktif mesanenin tedavisinde kullanılan solifenasin süksinatın miktar tayini için sıvı kromatografik yöntem geliştirmişlerdir. Solifenasin süksinat ile bozunma ürünlerinin kromatografik ayrılması, bir Shimpack XR-ODS-II kolonu ve suda 10 mM potasyum dihidrojen ortofosfat ve asetonitril içeren hareketli faz sistemi 0.5 mL/dk akış hızında bir ikili-gradient elüsyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Solifenasin süksinatın LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.2 ve 0.6 µg/µL, geri kazanım değeri %95- %104 arasında tespit edilmiştir.

Reddy ve ark¹²³ solifenasin süksinat ve safsızlık olan solifenasin N-oksidin miktar tayini için geliştirilen ters faz kromatografik yöntemde, C18 (5 µm x 150 mm x 4.6 mm) kolon ve ortofosforik asitle pH'ı 3.5'e ayarlanmış 0.01 M fosfat tamponu:asetonitrilden (90:10, h/h) oluşan hareketli faz gradient elüsyon mod, 1.0 mL/dk akış hızı, 35 °C kolon sıcaklığı ve 220 nm çalışma parametreleri kullanılmıştır. İlaç, hidroliz, oksidasyon, fotoliz ve termal bozulma gibi stres koşullarına maruz bırakılmıştır. Sadece oksidatif stres koşulunda önemli ölçüde bozunma olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca solifenasin süksinat ve safsızlıkların belirlenmesi ve tanımlanması için LC-MS/MS yöntemi de geliştirilmiştir. Doğrusal kalibrasyon grafiği 0.08-0.12 mg/mL arasında korelasyon katsayısı, 0.999'dan büyük ve bağıl standart sapma ise %2.0 olarak bulunmuştur.

Mistri ve ark¹²⁴ tarafından insan plazmasında alfuzosin ve solifenasinin eşzamanlı olarak ölçülmesi için doğru, seçici ve hassas bir biyoanalitik yöntem geliştirilmiş ve yöntem geçerlilik testleri yapılmıştır. 0.5 mL plazmada bulunan analitler ve IS, metil tert-butil eter kullanarak ekstre edilmiş Hypurity C8 kolonunda ayrılmıştır ve bir turbo iyon sprej arayüzü ile tandem kütle spektrometrisi ile tespit edilmiştir. Yöntem, 3.0 dakikalık kromatografik çalışma süresine ve alfuzosin için 0.25-25.0 ng/mL ve solifenasin için 0.6-

60.0 ng/mL (R^2 :0.9996) derişim aralığında doğrusal kalibrasyon eğrilerine sahip olduğu belirlenmiştir. Solifenasin süksinat için dört kalite kontrol seviyesinde değerlendirilen gün içi ve günler arası doğruluk (%BH) ve kesinlik (%CV) değerleri sırasıyla %88.2-106.4 ve %0.9-7.7 olarak bulunmuştur. Plazma örneklerinden mutlak geri kazanım değeri alfuzosin için %71.8 ve solifenasin için %93.1 olarak tespit edilmiştir. Alfuzosin ve solifenasinin stabilitesi farklı saklama koşulları altında değerlendirilmiştir. Doğrulanmış yöntem, belirlenen koşullar altında sekiz sağlıklı gönüllüde 10 mg alfuzosin hidroklorür ve 5 mg solifenasin süksinat tablet formülasyonunun oral olarak uygulanmasından sonra biyoyararlanım çalışmasında yapılmıştır.

Macek ve ark¹²⁵ tarafından insan plazmasında solifenasin süksinatın miktar tayini için bir sıvı kromatografi-elektrosprey tandem kütle spektrometresi yöntemi geliştirilmiş ve yöntem geçerlilik testleri yapılmıştır. Ekstraksiyon yöntemi; 0.25 mL plazmanın metanol vasıtasıyla proteinlerinin çöktürülmesi esasına dayanmaktadır. Kromatografik ayırım, bir pentaflorofenilpropilsilika kolon (50 mm x 4 mm, 3 µm) üzerinde metanol - %1.0 formik asit içeren 100 mM amonyum asetattan (90:10, h/h) oluşan hareketli faz yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Miktar tayini pozitif iyon modu ile yapılmış, solifenasin süksinat ve iç standart olarak kullanılan solifenasin-D5 için m/z değerleri sırasıyla 363→193 ve 368→198 olarak kullanılmıştır. Ekstraksiyon geri kazanım değeri %70, LLOQ değeri 0.47 ng/mL ve çalışma aralığı 0.47-42.0 ng/mL olarak belirlenmiştir. Bağlı standart sapma ile ifade edilen gün içi ve günler arası kesinlik %11'den düşük bulunmuştur.

2.5.1.4. Tamsulosin, Silodosin ve Solifenasin Süksinat

Ganthi ve ark¹²⁶ tablet dozaj formlarında solifenasin süksinat, tamsulosin ve yabancı maddelerin eşzamanlı olarak belirlenmesi için RP-HPLC yöntemi geliştirilmiş ve yöntem geçerlilik testlerini yapmışlardır. Yöntemde, 30 °C sıcaklık, Capcell Pak C18

kolon, %0.5 trietilamin içeren pH'ı fosforik asitle 6.6'ya ayarlanmış 20 mM potasyum fosfat tamponlu su:asetonitril (10:90, h/h) oluşan hareketli faz, gradient elüsyon, 0.9 mL/dk akış hızı, foto diyot array dedektör ve 225 nm dalga boyu çalışma parametrelerini kullanmışlardır. İki madde oksidatif, asit, baz, hidrolitik, termal ve fotolitik stres koşullarına maruz bırakılıp, yöntemle kararlılık testleri gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon grafiklerinin doğrusal olduğu derişim aralıkları solifenasin süksinat için 0.135-0.221 µg/mL ve tamsulosin hidroklorür için 0.043-0.090 µg/mL, LOD ve LOQ değerleri sırasıyla solifenasin süksinat için 0.075 ve 0.2211 µg/mL, tamsulosin hidroklorür için 0.0135 ve 0.0432 µg/mL olarak belirlenmiştir. Farmasötik preparatlarda geri kazanım değerleri solifenasin süksinat ve tamsulosin için sırasıyla %98.7±3.1 ve 98.8±2.5 olarak tespit edilmiştir.

Israel ve ark¹²⁷ tarafından farmasötik dozaj formlarında solifenasin süksinat ve tamsulosin hidroklorür miktar tayini için sıvı kromatografik yöntem geliştirilmiş ve yöntem geçerlilik testleri yapılmıştır. Yöntemde, izokratik elüsyon, eclipse XDB-C18 (4.6 mm x 150 mm, 5 µm) kolonu, aseto nitril: (pH'ı 3.0, %0.2 trietilaminli) 20Mm sodyum fosfat tamponundan (30:70, h/h) oluşan hareketli faz çalışma parametrleri kullanılmıştır. Solifenasin için 15.0-75.0 µg/mL ($R^2 = 0.999$) ve tamsulosin için 1.0-5.0 µg/mL ($R^2 = 0.999$) derişim aralığında doğrusallık gözlenmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla solifenasin için 0.04 ve 0.14 µg/mL ve tamsulosin için ise 0.05 ve 0.1 µg/mL, gün içi ve günler arası bağıl standart sapma değerleri solifenacin için %1.5'ten, tamsulosin için %1.0'den az olduğu bulunmuştur. Geri kazanım değeri ise %98.0'den büyük olduğu tespit edilmiştir.

Naraparaju ve ark¹²⁸ tamsulosin ve solifenasin süksinatın eşzamanlı miktar tayini için 1D-Türev senkronize spektrofiorimetrik yöntemini geliştirmişler ve yöntem geçerlilik testlerini yapmışlardır. 322 nm dalga boyunda (solifenasin süksinat için sıfır

noktası) tamsulosine verilen yanıtların, 0.9996'lık korelasyon katsayısı ile 2.0-10.0 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu; benzer şekilde 570 nm dalga boyunda (tamsulosin hidroklorür için sıfır noktası) solifenasin süksinata verilen yanıtlar, 0.9992'lik bir korelasyon katsayısı ile 30.0-150.0 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu tespit edilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla solifenasin için 2.640 ve 8.0 µg/mL ve tamsulosin için ise 0.210 ve 0.639 µg/mL, ticari formülasyonlarda geri kazanım değerleri ise tamsulosin için %95.0 ve solifenasin süksinat için %103.5 olarak belirlenmiştir.

El-Kimary ve ark¹²⁹ BPH tedavisi için küçük bir bileşen olarak toterodin tartrat veya solifenasin süksinat ile birlikte tamsulosin hidroklorür içeren iki yeni ilaç kombinasyonunda bu etken maddelerin miktar tayini için spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. Tamsulosin ve solifenasin karışımının analizinde, her iki ilaç arasında başarılı bir çözünürlüğün yanı sıra, hem tamsulosin hem de solifenasin için sırasıyla 0.75–3.50 ve 2.5-15.0 µg/mL aralığında doğrusal kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla tamsulosin için 0.15 ve 0.46 µg/mL, solifenasin için ise 0.59 ve 1.79 µg/mL olarak bulunmuştur. Üç ilacın floresan yoğunluğunu etkileyen çeşitli deney parametrelerinin optimizasyonu yapılmıştır.

El-Kimary ve ark¹³⁰ tek ilaçta ve kombine dozaj formlarında tamsulosin hidroklorür ile tolterodin tartarat ya da solifenasin süksinat karışımlarının analizi için HPTLC yöntemini geliştirmişlerdir. Önerilen yöntem, üç ilacın HPTLC ayrışmasından sonra 224 nm'de noktalarının dansitometrik ölçümleri üzerine kurulmuştur. Ayırma, hareketli faz olarak etil asetat-metanol-amonyak (6:4:0.05, h/h/h) kullanılarak Merck HPTLC alüminyum silika jel 60 F254 alüminyum levhalarında gerçekleştirilmiştir. Doğrusal regresyon analizi verileri, tamsulosin hidroklorür, tolterodin tartarat ve solifenasin süksinat için sırasıyla 0.1-0.7, 0.4–4.0 ve 1.0–6.0 bandg/bant aralığında regresyon çizgisi için kullanılmıştır.

2.5.2. İlaçlar Üzerinde Yapılan Metabolomiks Çalışmaları

Vargas ve ark¹³¹ kutanöz layşmanyazis'in meglumin antimoniat ile tedavisi sırasında terapötik yanıtın daha iyi tanımlanması için biyobelirteçlerin tanımlanmasını amaçlamışlardır. Kutanöz layşmanyazis tanısı konulan 39 hastanın plazma örneklerinin hedeflenmemiş metabolomik profili ortaya konulmuştur. Meglumin antimoniat kullanımının ortaya çıkardığı metabolik bozulmalar, uzun zincirli β -yağ asidi oksidasyonundaki ve enerji üretimindeki değişiklikleri yansıtır. Tedaviye cevap veren hastalardan alınan numunelerde allantoin, *N*-asetilglutamin, taurin ve piruvat anlamlı olarak daha fazla bulunmuş ve bu hasta grubundaki tedavi sonucunu gözlemlemek için biyobelirteç olarak tercih edilebilirliği (AUC>0.7) gösterilmiştir. Sonuçlar, antioksidan ve yara iyileşmesine aracılık eden metabolitlerin kutanöz layşmanyazis'in klinik tedavisine katılımını desteklediği, antileishmanial tedavi sonunda ortaya çıkan metabolizma ve immün yanıtlar arasındaki ilişkileri ortaya koymuştur.

Rotroff ve ark¹³² tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan metforminin etki mekanizmasını aydınlatmak ve bireylerin tedaviye verdiği farklılıkları açıklamak için 33 Afro-amerikan denekten alınan plazma örneklerini farmakometabolomiks yaklaşımla karşılaştırmışlardır. Sonuçları doğrulamak için metformin verilen ratlar üzerinde de aynı çalışmaları yapmışlardır. 54 metabolitte anlamlı farklılık tespit etmişlerdir. İndol-3-asetat ve 4-hidroksiprolin hem insanlarda hem ratlarda anlamlı değişiklik göstermiştir. İnsülin direnci ile ilişkili bir metabolit ve tip 2 diyabetin erken teşhis biyobelirteci olan 2-hidroksibutanoik asit açlık glikoz ve tokluk glikoz seviyeleri ile ilişkilendirilmiştir. Metabolik yolak analizlerinde ise üre ve pürin döngüsünde bir dizi metabolitlerdeki değişikliklerle ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Yao ve ark¹³³ bir antikanser ajanı olan irinotekanın klinik kullanımı sonucu görülen yan etkileri ve doku toksisitesini incelemek istemişlerdir. Bu amaçla hedef toksik

dokuları ayırt etmek ve ratlarda irinotekan uygulamasından sonra hedef dokuların tepkisini ortaya koymak için farmakometabolomiks çalışması yapmışlardır. İrinotekanın etki ettiği dokuz dokunun metabolik profilleri temel bileşen analiz ve küme analizi ile sınıflandırılmıştır. Çalışma sonucuna göre, irinotekanın hedef toksik dokuları olarak ileum, jejunum ve karaciğer kabul edilmiş ve bu dokulardaki kontrol grubuna göre anlamlı farklılık gösteren spesifik metabolitler tanımlanmıştır. Hedef toksik dokularda krebs siklusu, amino asit, pürin ve safra asidi metabolizmasına ait bozulmalar gözlemlenmiştir.

Bordag ve ark¹³⁴ 20 erkek gönüllü insandan tek bir doz 4 mg deksametazon uygulamasından önce ve sonra alınan plazma örneklerinden 214 metabolit kaydedilmiştir. Bu 214 metabolitten 10'u önemli ölçüde azalma gösterirken 58'i ise artış göstermiştir. Toplamda ise 150 metabolit deksametazon uygulamasından sonra anlamlı derecede değişiklik göstermiştir. TAG'ler, sfingozinler, yağ asitleri ve kompleks lipit toplamı parametreleri gibi lipidik metabolitlerin artışı, katekolamin artışına bağlı olarak tirozin, triptofan seviyelerinde, TCA ve üre döngülerinde, kas katabolizması, hepatik glukoneogenez ve lipoliz olaylarında artışlar görülmüştür. Buna bağlı olarak enerji metabolizmasında bozukluklar tespit edilmiştir. Sonuçlar tek dozlu, kısa süreli deksametazon uygulaması ile indüklenen ciddi metabolik düzensizliğe genel bir bakış açısı sağlamıştır. Gözlenen metabolik değişiklikler, ciddi yan etkilerin erken saptanması, yaşam kalitesini artırma ve sağlık bakım maliyetlerini azalmak için olanak sağlamıştır.

Amin ve ark¹³⁵ tarafından klopidoğrelin terapötik etkisini tahmin etmek, terapötik yanıtın getirdiği metabolik yollar hakkında ve yanıtla ilişkili bilinmeyen genetik ve genetik olmayan faktörler hakkında geniş bilgi sağlama ve toksisite biyobelirteçlerini tanımlamak için bir yaklaşım olan farmakometabolomiks çalışması yapılmıştır. Bu çalışmayla, klopidoğrel tedavisinin kişiselleştirilmesine yönelik güncel yöntemlerin yanı

sıra, klopidoğrelın değişkenlik gösterdiği trombosit reaktivitesi ile ilişkili faktörler hakkındaki literatrlar derlenmiştir.

Lewis ve ark¹³⁶ 32 haftalık bronkopulmoner gelişen erken doğmuş bebeklere uygulanan deksametazon tedavisinde bebeklerden tedaviden önce ve sonra alınan serum ve idrar örneklerinin metabolit profilleri değerlendirilmiştir. Steroid tedavisiyle serum glukonik asit seviyesi 140 kat azalmıştır. Hem serum hem de idrarda üre döngüsü, amonyaklı geri dönüşümü ve malat-aspartat mekik yolaklarında değişiklik gözlenmiştir. Regresyon analizlerinde 6 serum ve 28 idrar metaboliti solunum şiddeti skoru ile anlamlı olarak ilişkilendirilmiştir.

Malkawi ve ark¹³⁷ sıçanlarda deksametazon tedavisinin yan etkilerini incelemek için sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometresi temelli hedefli metabolomik profilleme, biyokimyasal parametreleri inceleme ve radyografik görüntüleme teknikleri kullanmışlardır. Ayrıca, kontrollere kıyaslanadığında deksametazon ile tedavi edilen ratlar, farklı bir metabolomik profil göstermiştir. Özellikle, serum amino asit metabolizması, fenilalanin, lizin ve arginin seviyelerinde altı kat azalma, glukoneogenez ve protein katabolizmasındaki pertürbasyonları yansıtan ve birlikte kilo kaybına, anormal kemik metabolizmasına yol açan tirozin ve hidroksiprolinde azalma göstermiştir. Sksinilasetonun (4.6-dioksoheptanoik asit) ařırđ ekspresyonu, deksametazonun hepatik fumarilasetoasetat hidrolaz üzerinde yeni bir inhibe edici etkisi olduğunu ortaya koymuştur. Adipoz dokunun bozulmasına yol açan asilkarnitinlerin, özellikle de çok uzun zincirli trlar (C12, C14: 1, C18: 1), deksametazon tedavisinden sonra önemli ölçüde miktarđ artmıştır. Sonuç olarak, ratlarda uzun süreli deksametazon tedavisi, yan etkileri ile ilişkili olan farklı bir metabolik profil ortaya koyulmuştur.

Kaddurah-Daouk ve ark¹³⁸ karboksilesteraz 1'in inhibe ettiği metilfenidatın farmakokinetik profilini belirlemek amacıyla farmakometabolomiks çalışması

yapmışlardır. 44 gönüllüden alınan plazma örneklerinin metabolom profillerinde pozitif modda 153 lipit, negatif modda 61 lipit, 13 safra asidi ve 32 amin metaboliti tanımlanmıştır. Metilfenidat metabolizmasının; TG(56:6), TG(56:5), çoklu doymamış yağ asitleri, alelin, kolik asit, glikolik asit, taurokenodeoksikolik asit, glikokenodeoksikolik asit, chenodeoksikolat, taurokolat ve tauroşenodeoksikolik asit gibi safra asitleri ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur.

Gao ve ark¹³⁹ irinotekanın indüklediği gastrointestinal toksisite olan miyelosupresyonun ve geç başlangıçlı ishalin erken teşhisi için serumlarda biyobelirteçlerin bulunmasına yönelik farmakometabolomik çalışma yapılmıştır. Geç başlangıçlı ishal ve miyelosupresyondaki bireysel farklılıklar için hedeflenmiş metabolomiks temeline dayanarak iki metabolit grubu taranmıştır. Glukronid, kamptotesin, 7-etil-10-hidroksi kamptotesin, ketojenik amino asitlerde (fenilalanin, lizin, triptofan) anlamlı değişiklikler gözlenmiştir. Ketojenik amino asitlerde görülen değişiklikler sitrik asit döngüsü ve hepatosteatoz etkinliğini bozarak myelosupresyona sebep olduğu öngörülmüştür. Sonuç olarak myelosupresyonun öngörülmesi için ketojenik amino asitlerin, geç başlangıçlı ishalin öngörülebilmesi için safra asitleri ve fenilalaninin kullanılabileceğini önermişlerdir.

Kim ve ark¹⁴⁰ aşırı kilolu/obez ve normal kişiler arasındaki metabolom profillerindeki farklılığı ortaya koymuşlardır. Aşırı kilolu/obez kişilerin serum fosfolipitlerinde daha yüksek stearik asit ve düşük oleik asit, plazmasında üç adet LysoPC belirlenmiştir. Aşırı kilolu/obez kişilerde daha önce tanımlanan 8 metaboliti de doğrulamışlardır. Sonuçlar aşırı kilolu/obez kişilerde iki dallı zincirli amino asidi, iki aromatik amino asidi, yağ asidi sentezinin ve oksidasyonunun anormal metabolizmasını doğrulamışlardır.

Martínez-Ávila ve ark¹⁴¹ zonisamid kullanımının etkinliği ve toksisitesi ile ilişkili olabilecek metabolitlerinin saptanması amacıyla farmakometabolomik çalışması yapmışlardır. Sağlıklı gönüllülerin oluşturduğu kontrol ve ilaç gruplarından alınan plazma örneklerinin metabolom profilleri değerlendirilmiştir. Sonuç olarak dallı zincirli amino asitler, steroidler, triasilgliseroller, metilasyona duyarlı diasil gliserofosfoetanolin, gliserofosfolipitler, 20: 4 FA (araşidonik asit), kolesterol ester, lizolsitil ve fosfatidilkolin seviyelerinde anlamlı değişiklikler gözlemlenmiştir.

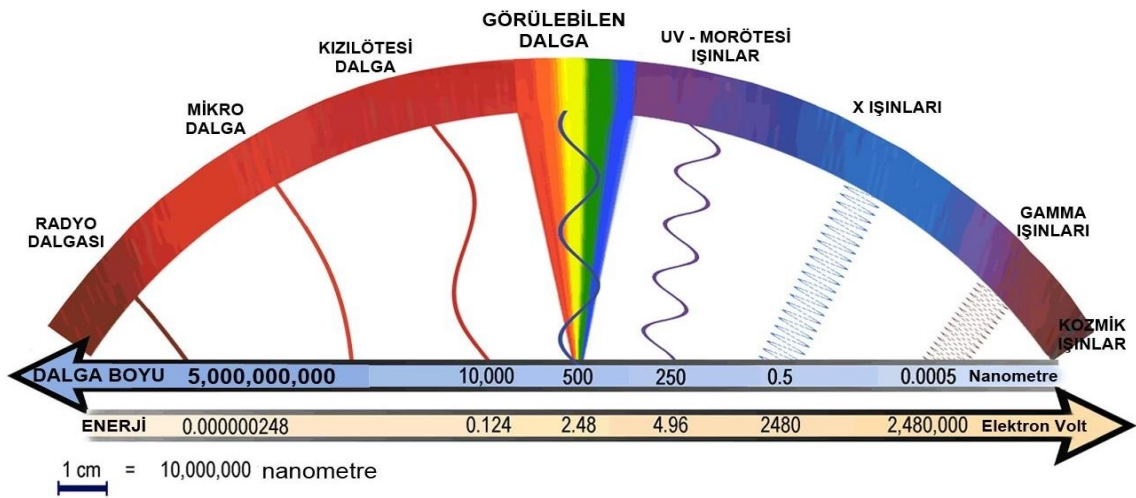
2.6. İlaç Miktar Tayininde ve Metabolomiks Çalışmalarında Kullanılan Analitik

Yöntemler

2.6.1. Spektroskopi Yöntemleri

Spektroskopi, elektromanyetik ışın ile maddenin etkileşmesini inceleyerek o maddenin yapısı, kararlılığı ve miktarı hakkında bilgi sağlayan bilim dalıdır. Bu yöntemler numunede bulunan atom, molekül veya iyonların enerji seviyeleri arasındaki hareketleri esnasında absorbladıkları veya yaydıkları elektromanyetik ışının ölçülmesi esasına dayanır. Dalga ve tanecik özelliği olan elektromanyetik ışın uzayda çok hızlı hareket edebilmektedir. Atom, molekül veya iyonlar tarafından soğurulan ışının incelenmesine absorpsiyon spektroskopisi, atom, molekül veya iyonlar tarafından yayılan ışının incelenmesine ise emisyon spektroskopisi denir. Spektroskopik analizlerde dalga boyu 110 nm'den 30000 nm'ye kadar olan çeşitli ışınlar kullanılmaktadır (Şekil 2.6). Bu geniş dalga boyu aralığında çalışan çeşitli cihazlar geliştirilmiştir. 110-1000 nm dalga boylarındaki ışınlarda Ultraviyole-Görünür Bölge (UV-Visible), 2500-30000 nm dalga boylarında infrared ve dalga boyları yüzlerce metreye kadar değişen radyo dalgalarında ise nükleer manyetik rezonans spektrofotometre cihazları kullanılır. Bu cihazların geçerli oldukları Ultraviyole-Görünür Bölge (UV-Visible), Infrared (IR titreşim) ve Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektroskopilerinin yanı sıra, floresans ve fosforesans

spektroskopisi, atomik emisyon spektroskopisi, atomik floresans spektroskopisi, atomik absorpsiyon spektroskopisi ve kütle spektroskopisi yöntemleride bulunmaktadır. Bu yöntemler hassas ve seçici oldukları için literatürde çok tercih edilmektedirler. Spektroskopi yöntemleri, organik ve inorganik bileşiklerin nitel ve nicel analizlerinde, maddelerin molekül yapılarının ve asit-baz denge sabitlerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır.¹⁴²



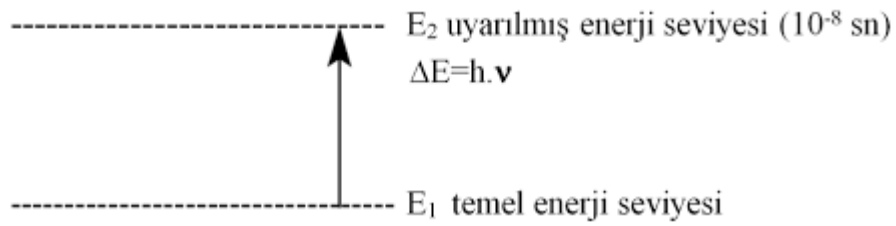
Şekil 2.6. Elektromanyetik ışınların sistematik olarak tanımlanması (Elektromanyetik spektrum)

2.6.1.1. Işının Absorplanması ve Lambert-Beer Yasası

Spektrofotometri; maddeye gönderilen ışın enerjisinin absorpsiyonu esasına dayanmaktadır ve maddeye ait tranmittans (geçirgenlik) / absorbans özelliklerini, dalga boyunun bir fonksiyonu olarak inceler. Elektromanyetik bir radyasyon olan ışın, frekans (ν) veya dalga boyu (λ) ile karakterize edilir ve enerjisi $E = h \cdot \nu$ veya $E = h \cdot c / \lambda$ bağıntısı ile verilir. (h ; Planck sabiti = $6.62 \cdot 10^{-27}$ erg.s, $c = 3 \cdot 10^{10}$ cm/s)

Atom, molekül veya iyonlara gönderilen ışın enerjisi, elektronların düşük enerjili orbitallerden (temel hal) daha yüksek enerjili orbitallere (uyarılmış hal) geçmesine yol

açar (Şekil 2.7). Bu iki enerji seviyesi arasındaki fark ışın enerjisine eşit ise, ışın madde tarafından absorplanır. Uyarılan atom, molekül veya iyon yaklaşık 10^{-8} saniye uyarılmış halde kaldıktan sonra, absorpladığı enerjiyi ısı halinde geri vererek temel hale geri döner. Uyarılan bazı maddeler ise, bu enerjiyi daha büyük dalga boylarına sahip ışın olarak geri verirler. Bu olaya ise fotolüminesans denir. Bu olay çok kısa sürerse floresans, daha uzun sürerse fosforesans olarak adlandırılır.¹⁴²⁻¹⁴⁴

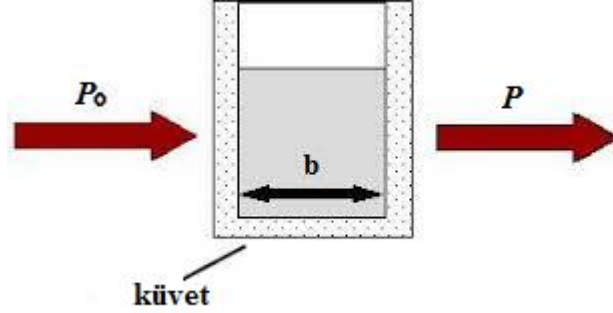


Şekil 2.7. Elektronik enerji seviyeleri

Herhangi bir dalga boyuna sahip ışının absorpsiyonu, enerjiyi absorbe edebilecek bir yapının varlığını gösterir. Absorbsiyon miktarı dalga boyunun bir fonksiyonu olarak kaydedilerek absorpsiyon spektrumu oluşturulur. UV ve görünür bölge spektrumunda, absorpsiyonlar dalga boyuna karşı grafiğe yerleştirilir. Absorpsiyonun en yüksek olduğu dalga boyunda bir maksimum görülür (λ_{max}). Absorpsiyon spektrumları; atomik absorpsiyon spektrumları ve moleküler absorpsiyon spektrumları olacak şekilde iki çeşittir.¹⁴²⁻¹⁴⁴

Kalınlığı b cm olan küvette çözelti halinde bulunan atom, molekül veya iyon üzerine gönderilen monokromatik (tek dalga boylu) ışın demetinin şiddeti (P_0) ile küvetten çıkan ışın şiddeti (P) arasındaki fark spektrofotometre cihazları yardımı ile ölçülerek ışının absorpsiyonu belirlenir. Işın demetinin çözelti ortamından geçme oranı %geçirgenlik ($\%T$) ile ifade edilir ve $\%T = P / P_0 \times 100$ bağıntısı ile belirlenir.

Absorbans (A) ise geçirgenliğin eksi logaritması ($A = -\log_{10} T = -\log P / P_0$) alınarak bulunur (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Elektromanyetik ışının ortamdaki geçişi

Atom, molekül veya iyon çözeltisinin absorbansı ile derişimi arasındaki ilişki ise, Lambert-Beer eşitliğiyle ifade edilir. $A = -\log P_0 / P = \epsilon \cdot b \cdot C$ (ϵ : molar absorbtivite, C: derişim mol/L) ¹⁴²⁻¹⁴⁴

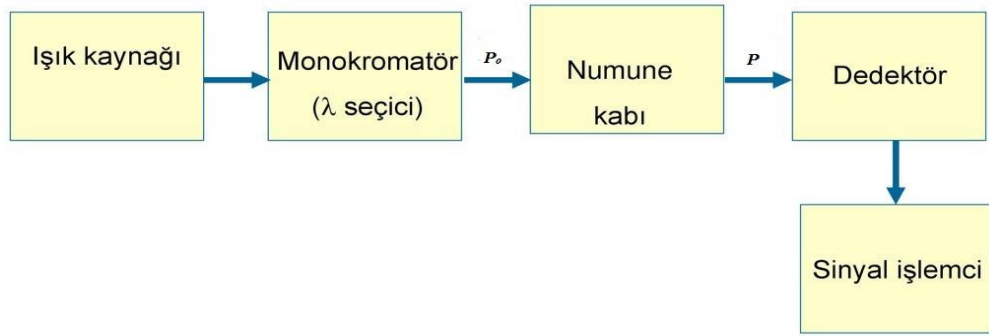
2.6.1.2. Lambert-Beer Yasasından Sapmalar

Lambert-Beer yasasının geçerli olması için, çözeltide bulunan taneciklerin elektriksel alan olarak birbirlerini etkilemesini engellemek için seyreltik çözeltilerle çalışılmalıdır. Bu sebeple numunenin derişimi 10^{-2} M'dan düşük olmalıdır. Çünkü yüklü tanecikler birbirlerinin yük dağılımını etkileyerek absorplama yeteneklerini etkileyebilirler. Bunun sonucunda derişim ile absorbans arasında olması gereken lineer ilişki bozulur. Ayrıca ortamda bulunan yüklü tanecikler veya yüksek derişime sahip maddeler analitin absorpsiyonunu etkileyerek yasadan sapmalara yol açar. Lambert-Beer yasasından sapmalar; cihazdan kaynaklanan, kimyasal maddelerden kaynaklanan ve analizci hatasından kaynaklanan sapmalar olmak üzere 3 çeşittir. ¹⁴²⁻¹⁴⁴

2.6.1.3. Ultraviyole-Görünür Bölge Spektrofotometreleri

Genel olarak ışık kaynağı, monokromatör, numune kabı ve dedektör olmak üzere 4 kısımdan oluşan spektrofotometre; 180-800 nm aralığında tarama yapabilen, ışık

kaynağından gelen ışına ait dalga boyunun bir fonksiyonu olarak, numuneye ait transmittans veya absorbansı ölçebilen, cihazlardır. Ayrıca spektrofotometrelerde ışının toplanmasını, bölünmesini, odaklanmasını, yansıtılmasını ve belirli bir şiddette numune üzerine gönderilmesini sağlayan aynalar, mercekler, giriş-çıkış (slit) aralıkları ve ışık bölücüleri bulunmaktadır (Şekil 2.9). UV-görünür bölge spektrofotometreleri kullanılan ışık kaynağına bağlı olarak 110-1000 nm dalga boyları arasında çalışabilmektedir. ¹⁴²⁻¹⁴⁴



Şekil 2.9. Spektrofotometrenin şematik gösterimi

UV-görünür bölge spektrofotometre cihazlarında, ışık kaynağı olarak 160-375 nm dalga boyu aralığında hidrojen ve döteryum lambaları kullanılırken, 350-2500 nm dalga boyu aralığında ışın yayabilen tungsten lambalar tercih edilmektedir. Dalga boyu seçici olarak prizma veya optik ağ bulunan UV-görünür bölge spektrofotometrelerde, numunenin özelliklerine veya kullanılan dalga boyuna bağlı olarak plastik, soft veya borosilikat cam ve kuartz küvetler olmak üzere farklı numune kapları kullanılmaktadır. Son olarak spektrofotometrelerde, ışık kaynağından gelen ve numune tarafından absorblanmayan ışığın şiddetini ölçebilen, gelen ışın şiddetine bağlı olarak elektriksel sinyal üreten ve bu sinyali devreler yardımıyla çoğaltabilen çeşitli dedektörler kullanılmaktadır. Fotovoltaik dedektörler, fototüpler ve foto çoğaltıcı tüpler ultraviyole ve görünür bölgede kullanılan detektörlerdir. ¹⁴²⁻¹⁴⁴

Spektrofotometreyi oluşturan bileşenlerinin aynı ışık yoluna yerleştirildiği cihazlara tek ışın yollu spektrofotometreler denir. Monokromatörden çıkan ışığı eşit şiddete sahip iki demete bölerek birini örneğe, diğerini sadece çözücünün bulunduğu kaba göndererek, her dalga boyunda sıfırlama işlemini tekrarlanmadan analiz imkanı sağlayan çift detektöre sahip spektrofotometrelerde bulunmaktadır. Bu cihazlar ise çift ışın yollu spektrofotometreler olarak adlandırılmaktadır.¹⁴²⁻¹⁴⁴

2.6.2. Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, bir karışımda bulunan maddelerin, sabit fazda farklı tutunma kuvvetlerine dayanarak hareketli faz yardımıyla birbirinden ayrılması, saflaştırılması, tanınması ve tayinine imkân sağlayan bir analitik yöntemdir. Karışımdaki bileşenlerin; sabit bir akış hızına sahip gaz veya sıvı hareketli fazla ile birlikte, sabit faz üzerinden geçerken yüzey adsorbsiyonu, boyut eleme, dağılma ve iyon değiştirme özelliklerine bağlı olarak birbirlerinden ayrılması esasına dayanır.¹⁴²

2.6.2.1. Yüksek Performans Sıvı Kromatografi (HPLC)

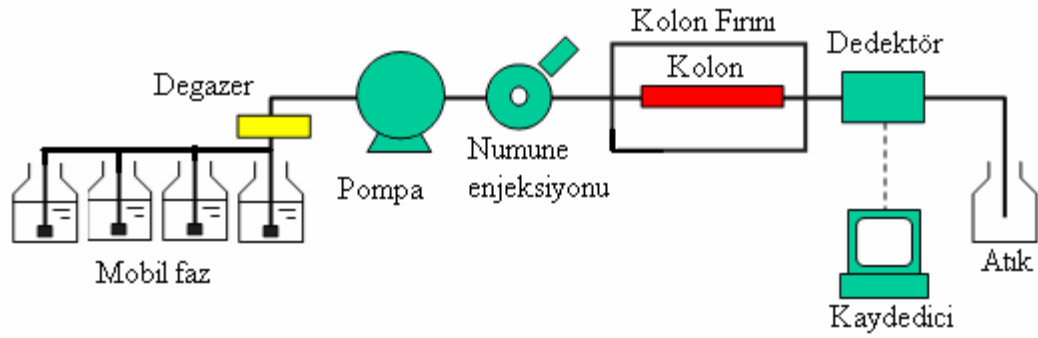
Bir karışımda bulunan maddeler bir çözücü veya çözücü karışımı yardımıyla uygun büyüklükte katı dolgu maddeleri ile doldurulmuş bir kolondan yüksek basınç altında geçirilerek farklı yürüme hızlarından yararlanarak ayrılmaları mümkündür. Yüksek performanslı sıvı kromatografisinde, hareketli faz sıvı, sabit faz katı veya sıvı tutturulmuş katı destek maddesinden oluşmaktadır. Daha kısa sürede, uygun akış hızı ile ideal bir ayırım gerçekleştirebilmek için, hareketli faz basınç yardımıyla kolonda yürütülmektedir.

HPLC; maddelerin yüksek hassasiyet ve doğrulukla kantitatif tayinine, sıcaklıkla bozulabilen veya uçucu olmayan türlerin ayrılmasına imkan sağlaması ve geniş uygulanabilir alanlara sahip olması sebebiyle analitik ayırma tekniklerinde en çok tercih edilen yöntemlerden biridir. Uygun hareketli faz, kolon ve dedektör kullanılarak ilaçlar,

karbonhidratlar, aminoasitler, pestisitler, nükleik asitler ve birçok organik bileşiklerin ayrılmasına ve analizine olanak sağlamaktadır.¹⁴²

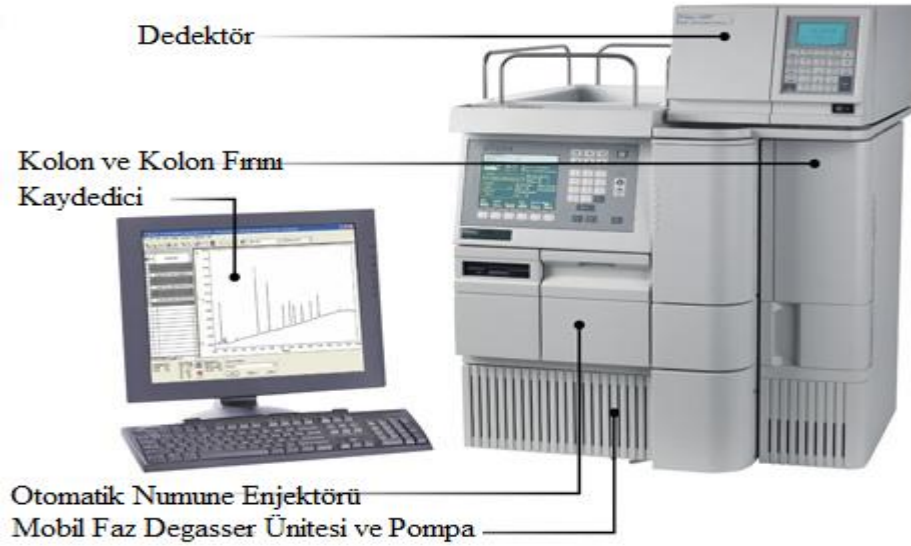
2.6.2.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Cihazı

HPLC cihazı; pompa, enjektör, kolon, dedektör ve kaydedici olmak üzere beş ana kısımdan oluşmaktadır (Şekil 2.10 ve 2.11).



Şekil 2.10. Yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazının şematik görünüşü

Hareketli faz; bir veya birden fazla, 200.0-1000.0 mL hacimlere sahip cam veya çelikten üretilmiş haznelerde bulunmaktadır. Hareketli faz, çoğu zaman kolon ve dedektörde bozucu etkilere sahip çözünmüş gazlar içermektedir. Bu çözünmüş gazlar degazer denilen bir sistemle ortadan kaldırılmaktadır.



Şekil 2.11. HPLC cihazı

Degazerdan çıkan hareketli fazın kolondan akışı pompa vasıtasıyla gerçekleştirilmektedir. Farklı özellik ve avantajlara sahip pistonlu, sürgülü ve pnömatik olmak üzere üç çeşit pompa bulunmaktadır. Pompalar; puls içermeyen basınç çıkışı, 6000 psi basınç üretimi, dakikada 0.1-10 mL akış hızı, en az %0.5 akış tekrarlanabilirliği ve korozyona karşı dayanıklılık gibi özelliklere sahip olursa iyi bir ayırmaya olanak sağlar.

HPLC sisteminde numune enjeksiyonu için genellikle sisteme 5 μ L'den 500 μ L'ye kadar numune verebilen otomatik enjeksiyonlar kullanılmaktadır. Yüksek basınç altında gerçekleştirilen numune enjeksiyonu sonucu, numune hareketli faza karışır ve çözünerek kolona ulaşır.

5–10 μ m çapında dolgu maddesi taneciklerine, 4–10 mm çapa, 5-150 cm uzunluğa sahip paslanmaz çelik veya plastikten yapılan bir HPLC kolonu cihazın en önemli kısmıdır. Kolonda gerçekleştirilen ayırım kromatografik yöntemin performansını belirler. Kolonun kararlı yapısı, hareketli faz ve numune çözeltilerine karşı inert olması ve yüksek akış hızı ve basınca dayanıklı olması kromatografik ayırımın ideal bir şekilde gerçekleşmesine olanak sağlar.

Işık enerjisini elektrik enerjisine dönüştürmeye yarayan dedektörler, kolondan çıkan maddelerin belirlenmesini sağlamaktadır. HPLC cihazında, analit ve çözücü ortamına ait özelliklere bağlı olarak UV-Görünür Bölge dedektörü, Diod-Array dedektörü, floresans dedektörü, elektrokimyasal dedektör, amperometrik dedektör, refraktifindeks (RI) dedektörü ve kütle dedektörü gibi çeşitli dedektörler kullanılmaktadır.^{142, 143, 145}

2.6.2.3. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (LC-MS)

Sıvı kromatografisi-Kütle Spektrometresi, bir karışımda bulunan maddelerin sıvı kromatografi yardımı ile fizikokimyasal özelliklerine göre birbirinden ayrılmasına ve kütle dedektörü ile elektriksel veya manyetik alanda kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayrıştırılarak kantitatif analizine imkan sağlayan analitik bir tekniktir. m/z ile gösterilen kütle/yük oranında m yüklü bir taneciğin kütlesini, z de bu taneciğin yükünü ifade eder.

HPLC'nin kütle spektrometri ile kombinasyonunun en büyük avantajı; kromatografi tekniği ile tam olarak ayrılamayan farklı kütlelere sahip analitlerin MS dedektörü sayesinde rahatlıkla analiz edilebilmesidir. Bu teşhis kabiliyeti LC-MS'in yüksek seçiciliğe sahip olduğunu göstermektedir.

Birçok molekül aynı m/z oranına sahip olmalarına rağmen, parçalanma iyonlarının birebir aynı olması çok düşük bir ihtimaldir. MS dedektörü, parçalanma iyonları dahi benzer olan analitlerin çok düşük derişimlerde miktar tayinlerine olanak sağlamaktadır. Bu sebeple LC-MS cihazı yüksek hassasiyete sahiptir. Hassasiyet ve seçiciliğin dışında, tek bir analizle birden fazla analiti aynı anda tarayabilmesi, hızlı analize olanak vermesi, güvenilir olması ve çok çeşitli alanlarda uygulanabilir olması Sıvı kromatografisi-Kütle Spektrometresi tekniğinin son yıllarda daha çok tercih edilmesine neden olmaktadır.^{146,147}

2.6.3. Kütle Spektrometrisi

Günümüzde yaygın olarak kullanılmakta ve her numune için sinyal verme yeteneği olan kütle spektrometri (MS) dedektörleri, elektriksel veya manyetik alanda hareket eden yüklü tanecikleri m/z oranlarına göre ayırıp, taneciklerin kantitatif analizine ve kimyasal yapısının aydınlatılmasına imkan tanımaktadır.

Kütle spektrometresi; organik, inorganik ve kimyasal moleküllerin yapı, elementel bileşimlerinin aydınlatmasında, numunedeki atomların izotop oranlarının bulunmasında, endüstriyel ve tıbbi karışımların kalitatif, ve kantitatif analizinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir.¹⁴⁶

Kütle spektrometresinin çalışma prensibi kısaca şu şekildedir; gaz haline getirilmiş numune, yüksek enerjiye sahip elektronlarla çarpışıp elektronlarını kaybederler. Böylece pozitif yüklü farklı iyonlara dönüşen iyonlar yüksek bir hızla manyetik ve/veya elektriksel alandan geçirilerek saptırılması sağlanır. Bu alanlardan geçen pozitif iyonlar kütle, yük ve hızlarına bağlı olarak sapmaları değişiklik gösterir. Yük, hız ve saptırıcı güç sabit olduğunda ağır parçacıklar hafif parçacıklara göre daha az saparak detektöre ulaşacaktır.¹⁴⁷

Kütle spektrometresi beş ana kısımdan oluşmaktadır.

1. Numune giriş sistemi
2. İyonlaştırıcı
3. Kütle analizörü
4. Dedektör
5. Vakum sistemleri

2.6.3.1. Numune Giriş Sistemi

Çok düşük miktardaki numuneyi sisteme almaya yarayan numune giriş sistemi vakum altında bulunur. Bu sistemde çok düşük miktardaki numuneler buharlaştırılarak, doğrudan ve kromatografi düzeneğinden geldiği gibi iyonizasyon kısmına girerler. ¹⁴⁸⁻¹⁵⁰

2.6.3.2. İyonlaştırıcı

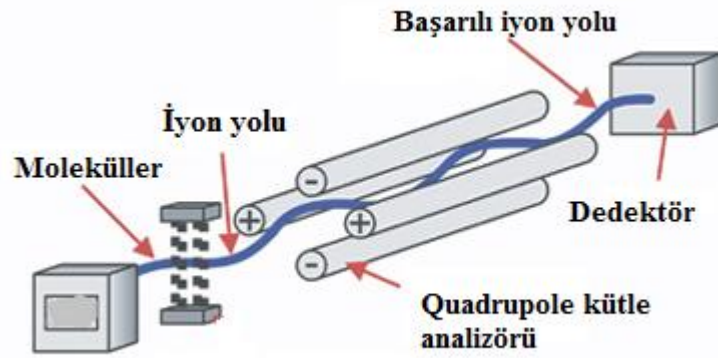
Bir atom, molekül veya iyondan bir elektronun uzaklaştırıldığı, moleküllerin uyarılarak iyonize hale dönüştürüldüğü, yani iyonizasyon olayının gerçekleştiği kısımdır. İyonizasyonda, numunelerin fiziksel durumuna ve ısısal kararlılığına bağlı olarak farklı teknikler kullanılsa da; iyonlaşma kaynakları genel olarak gaz faz iyon kaynakları ve desorbsiyon iyon kaynakları diye ikiye ayrılır (Tablo 2.1.).^{142, 148-150}

Tablo 2.1. İyonlaştırma kaynakları

Temel Tip	İyon kaynağı	İyonlaştırıcı
Gaz Fazı	- Elektron impact (EI) - Kimyasal iyonlaştırma (CI) - Alan iyonlaştırma (FI)	- Enerjik elektronlar - Reaktif gaz iyonları - Yüksek potansiyelli elektrot
Desorbsiyon	- Elektrosprey iyonlaştırma (ESI) - Alan desorpsiyonu (FD) - Matriks yardımcı desorpsiyon iyonlaştırma (MALDI) - Plazma desorpsiyonu (PD) - Hızlı atom bombardımanı (FAB) - İkincil iyon kütle spektrometri (SIMS) - Termosprey iyonlaştırma (TS)	- Yüksek elektrik akımı - Yüksek potansiyelli elektrot - Lazer demeti - Cl'nin fusyon ürünleri - Enerjik atom demeti - Enerjik iyon demeti - Yüksek sıcaklık

2.6.3.3. Kütle Analizörü

İyonizasyon kaynağında meydana gelen iyonlar, m/z oranlarına göre ayrıldığı analizöre geçerler. Kütle analizörlerinden en çok kullanılanı dört silindirik veya hiperbolik çubuk elektrottan oluşan quadropole kütle analizörüdür. İyonlar ile quadropole çubuklar arasında itme çekme etkileşimi oluşturmak için çubuklara doğru akım ve radyo frekansı uygulanır. Bu sebeple iyon zıt yüke sahip çubuğa doğru hareket eder. Uygulanan potansiyele bağlı olarak belirli m/z oranına sahip iyonlar farklı yönlerde sapmadan dedektöre ulaşırlar. İyonların çubuklara çarpmadan doğrudan dedektöre ulaşabilmesi için uygun voltajın seçilmesi gerekir (Şekil 2.12).¹⁵¹



Şekil 2.12. Kütle analizörünün şematik gösterimi

2.6.3.4. Dedektör

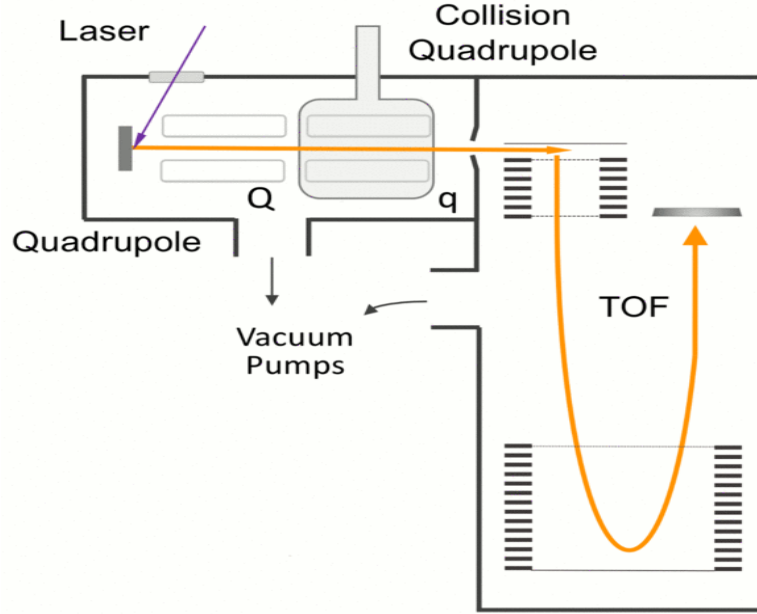
Kütle analizörü ile elektron çoğaltıcı dedektöre ulaşan iyonlar, burada elektron çoğaltıcıya çarparak bir akım oluşturur. Oluşan akım ilk başta analog voltaja, sonra da 10^7 değerine kadar artırılmış dijital sinyale dönüşür. MS'den gelen veriler bir bilgisayar yardımı ile kaydedilir.^{150,151}

2.6.3.5. Yüksek Vakum Sistemi

İyon kaynağından üretilen iyonlar yüksek vakum altında detektöre ulaşabilme imkânına sahip olurlar. Bu sebeple kütle spektrometre cihazı, ön pompa ve turbomoleküler veya difüzyon pompası olarak adlandırılan ikili vakum sistemi altında çalışmaktadır.¹⁵²

2.6.4. Sıvı Kromatografi Kuadrupole Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi

Kuadrupol uçuş zamanlı kütle spektrometresi (QTOF-MS), geniş spektrum analizi, yüksek kütle hassasiyeti ve çözünürlüğü, geniş bir molekül ağırlık aralığında veri toplama kabiliyeti gibi nedenlerden dolayı hedeflenmemiş metabolomiks çalışmalarında sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır (Şekil 2.13). QTOF, iyonların elektriksel bir alanda hızlandırılarak, bir uçuş tüpünün başından sonuna kadar hareket edebilmeleri için geçen sürenin ölçülmesi esasına göre çalışır. QTOF, yaklaşık 10000 ardışık taramayı 5 ppm'lik bir kütle hatası ve yüksek çözünürlük ile çok kısa sürede veri olarak üretebilir. Bu avantajlara sahip LC/QTOF-MS yöntemi, kan, tükürük, doku ve idrar gibi biyolojik ortamlarda çok düşük seviyelerde bulunan metabolitlerin teşhis edilmesine ve miktar tayinlerinin yapılmasına olanak sağladığı için metabolomiks çalışmalarında kullanılmaktadır.¹⁵³



Şekil 2.13. QTOF'un şematik gösterimi

2.7. Yöntem Geliştirme ve Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)

Analitik kimyada elde edilen veri doğru ve güvenilir olmalıdır. Geliştirilen yöntemin ve geçerlilik testlerinin başarılı olması, elde edilen analitik verinin özelliklerine bağlıdır. Yöntem geliştirme ve geçerlilik testlerinin kabul edilebilir olması için gerekli minimum kriterler belirlenmelidir.^{154, 155}

2.7.1. Yöntem Geliştirme

Yöntem geliştirme aşamaları aşağıdaki gibidir.^{154, 155}

1. Yönteme ait amaç, kapsam ve uygulama belirlenmelidir.
2. Yönteme ait performans parametreleri ve kabul kriterleri açıklanmalıdır.
3. Cihazın performans kriterleri ve kullanılan materyaller tanımlanmalıdır.
4. Yöntem geliştirildikten sonra belgelenmelidir.

2.7.2. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)

Analitik bir yöntemde görülen sıkıntıları en aza indirmek için geçerlilik testleri yapılır. Yöntem geçerlilik testi, ürünlerin değerlendirme prosesinde, geliştirilen analitik

yöntemin ve performans özelliklerinin belirlenen amaçlara uygun olduğunu kanıtlamak için yapılan testlerin tümüdür. Analitik yöntemin geçerliliğini göstermek için aşağıdaki parametreler kullanılır.^{154, 155}

1. Doğruluk (Accuracy)
2. Kesinlik (Precision) ve Tekrarlanabilirlik (Reproducibility)
3. Kararlılık/Stabilite (Stability)
4. Doğrusallık (Linearity) ve Çalışma aralığı (Range)
5. Duyarlılık (Sensitivity)
6. Seçicilik (Selectivity) / Belirleyicilik (Specificity)
7. Sağlamlık (Robustness)
8. Geri Kazanım

2.7.2.1. Doğruluk

Doğruluk; derişimleri bilinen bir seri örneğin analizi sonucu elde edilen değerin gerçek değere yakınlığı olarak ifade edilir. Bağlı hata, mutlak hata veya geri kazanım değerleriyle belirlenir.^{154, 155}

2.7.2.2. Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik

Belirli şartlar altında hazırlanmış bir homojen örnekten yapılan bir seri ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığı kesinliği verir. Kesinlik standart sapma, bağlı standart sapma, varyans veya varyasyon katsayısı ile belirlenir. Tekrarlanabilirlik ise; farklı koşullar altında aynı yöntemle hazırlanan numunenin analizinden elde edilen sonuçların birbiri ile uyumunu gösterir.^{154, 155}

- i) **Güniçi kesinlik:** Birbirinden bağımsız hazırlanan numunelerin aynı gün içerisinde yapılan analizlerinden elde edilen sonuçların birbirine yakınlığını ifade eder.

- ii) **Günler arası kesinlik:** Birbirinden bağımsız hazırlanan numunelerin farklı günlerde (en az altı gün) analizleri yapılır. Elde edilen sonuçların birbirine yakınlığı günler-arası kesinlikle ifade edilir. Sonuçlar yöntemin uygulanabilir olduğunun da bir göstergesidir.^{154, 155}

2.7.2.3. Kararlılık/Stabilite

Örneklerin saklanma süresi boyunca bozunmadan kararlı bir şekilde kaldığını göstermeye yarayan testlerdir. Saf analit, analit çözeltisi veya analit içeren biyolojik örneklerin normal laboratuvar koşullarında, buzdolabında ve derin dondurucuda sıcaklık, hava, nem ve örneklerin dondurulup eritilmesi gibi farklı koşullara maruz bırakıldıktan sonra bozunmadan kaldığı sürenin tespit edilmesi testleridir. Kararlı kaldığı sürelerle göre, örneklerle çalışma süreleri belirlenmektedir.^{154, 155}

2.7.2.4. Doğrusallık ve Çalışma aralığı

Örnek içinde bulunan analitin derişimi ile belirli aralıkta olmak üzere orantılı analiz sonuçlarının elde edilmesi yöntemin doğrusallığını gösterir. Düşük derişimlerden yüksek derişimlere doğru bir seri standart çözelti hazırlanır. Analiz sonucu elde edilen sonuçlar derişime karşı yöntem cevabının grafiğe geçirilmesi ile kalibrasyon eğrisi elde edilir. Kalibrasyon eğrisi yöntemin doğrusal olduğu çalışma aralığı gösterir. Ağırlıklı ve ağırlıksız en küçük kareler yöntemi kullanılarak kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi yapılır ve standart eğrinin doğru denklemi türetilir. Kalibrasyon eğrisinin eğimi, doğrusallığın matematiksel olarak bir göstergesidir.^{154, 155}

2.7.2.5. Duyarlılık

Duyarlılık; bir analitik yöntemin, düşük derişime sahip analitleri saptayabilme ölçüsüdür. Diğer bir ifade ile analit derişimindeki birim değişime karşı, gelen sinyal değişimini gösteren parametredir. Herhangi iki yöntemin kesinliği eşit ise, kalibrasyon

eğrisi daha dik olan yöntem daha hassastır. Benzer şekilde eğer iki yöntemde eğimler eşit ise, kesinliği yüksek olan yöntem daha hassastır.^{154, 155}

- i) **Teşhis Limiti (LOD):** Optimize edilen deney koşullarında saptanabilen en düşük analit derişimidir. Kromatografide sinyal/gürültü (S/G) oranının 3/1 olduğu analit derişimidir.
- ii) **Miktar Tayin Limiti (LOQ):** Optimize edilen deney koşullarında uygun doğruluk ve kesinlikle saptanabilen en düşük analit derişimidir. Kromatografik çalışmalarda sinyal/gürültü (S/G) oranının 10/1 olduğu analit derişimidir.

2.7.2.6. Seçicilik / Belirleyicilik

Seçicilik/belirleyicilik; FDA rehberine göre, numunede bulunması muhtemel kirlilikler, parçalanma ürünleri, diğer interferanslar gibi bileşenler varlığında, analitin doğru bir şekilde ölçülebilmesidir. ICH'e (International Conference on Harmonization) göre ise, tek bir analit için cevap veren yöntemde seçicilik, birden fazla analite cevap veren yöntem için ise belirleyicilik parametreleri kullanılır.^{154, 155}

2.7.2.7. Sağlamlık

Yönteme ait sıcaklık, akış hızı, pH, kolon gibi parametrelerde meydana gelebilecek küçük ama önemli değişikliklerde sonuçların etkilenmemesi yöntemin sağlamlığını, yani rutin kullanım sırasında güvenilirliğini gösterir. USP ise sağlamlığı, çeşitli koşullar altında elde edilmiş sonuçların, laboratuvarıdan laboratuvara ve analizciden analizciye göre yenilenebilirlik (reproducibility) derecesi olarak belirtmektedir. Sonuçlar üzerine etki göstermeyen değişikliklerin aralığı sağlamlık aralığı olarak ifade edilir.

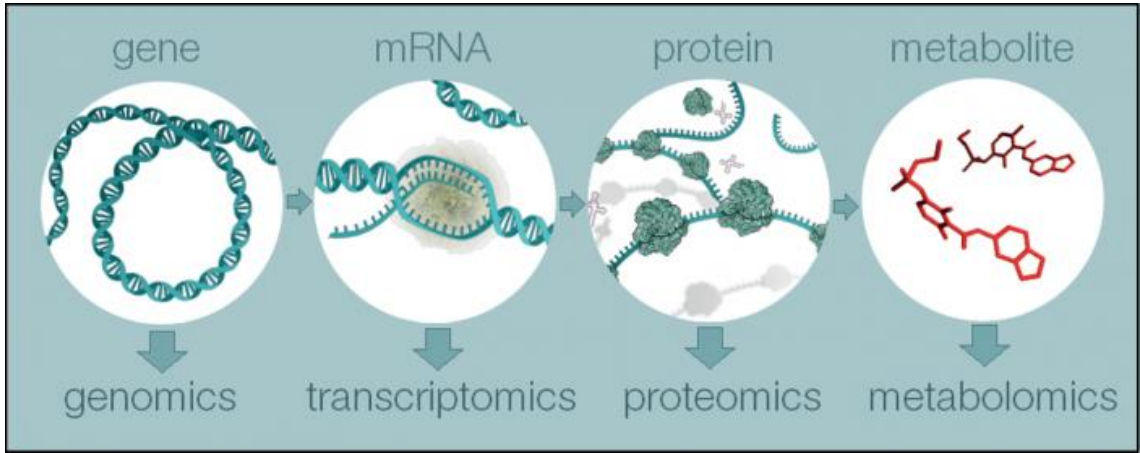
2.7.2.8. Geri Kazanım

Biyolojik numunelerde, numunenin analizi sonucu elde edilen değerin, gerçek değere oranı ile ifade edilir.^{154, 155}

2.8. Omiks Teknolojisi

Birçok teknolojinin bir araya gelerek, organizmada bulunan moleküllerin birbirleri arasındaki ilişkileri, bu moleküllerin metabolizmada üstlendiği görevleri ve organizmayı meydana getiren hücrelerin etkilerini detaylı bir şekilde incelenmesini sağlayan yöntemsel yaklaşımlar –omiks teknolojileri olarak tanımlanır. Omiks teknolojisi başta genomiks, epigenomiks, transkriptomiks, proteomiks ve metabolomiks olmak üzere birçok alandan oluşmaktadır (Şekil 2.14). Bir tür içinde veya farklı türler arasındaki DNA, RNA, protein ve hücresel moleküller düzeyindeki farklılıkların incelenmesi, hücre içinde gerçekleşen yapısal ve fonksiyonel değişikliklerin saptanması, metabolizmada gerçekleşen rutin fizyolojik olayların daha iyi aydınlatılması, ilaç etkinlik ve toksisitesinin incelenmesi, hastalık etiyolojisinin anlaşılması ve erken tanıya imkan sağlaması, omiks teknolojilerine olan ilgiyi gün geçtikçe artırmaktadır.¹⁵⁶

Metabolitler, biyokimyasal reaksiyonlar sonucunda ara ürün olarak ortaya çıkan, vücutta birikmeden farklı moleküllere dönüşen, organizmada hücre içerisinde meydana gelen metabolik yolların bağlanması rol alan küçük moleküllerdir. Amino asitler, peptitler, oligonükleotidler, nükleozidler, aldehytler, organik asitler, alkaloidler, aminler, lipidler, steroidler, ketonlar, şekerler metabolitlere başlıca örneklerdir. Bu metabolitlerin tamamına metabolom denir. Metabolitlerin saptanması, kimliklendirilmesi ve miktarlarının bulunması ile ilgilenen bilim dalı ise metabolomiks olarak adlandırılır. Metabolitlerin miktarları, organizmadaki hücresel fonksiyonların işleyiş hakkında bilgi sahibi olmamızı, dolayısı ile genetik veya çevresel faktörlere bağlı olan hücre veya doku fenotipini anlamamızı sağlar.^{156,157}



Şekil 2.14. -Omiks teknolojileri

2.8.1. Metabolomiks

Günümüzde organizmanın temel yapıtaşlarının incelenmesine olanak sağlayan genomiks, transkriptomiks, proteomiks ve metabolomiks gibi omiks teknolojilerine daha çok önem verilerek, insan metabolizmasının tam olarak aydınlatılması amaçlanmaktadır. Ancak bu amaçla geliştirilen İnsan Genom Projesiyle genlerin tanımlanması, proteomiks ve transkriptomiks ile gen fonksiyonlarının incelenmesi kişiden kişiye farklılık gösteren klinik fenotipleri açıklamaya yetmemiştir. Bunun sebebi ise klinik fenotipleri ortaya çıkaran bilginin metabolitlerde bulunmasıdır.¹⁵⁸

Çeşitli metabolik reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan ve vücutta birikmeden farklı moleküllere dönüşerek oluşan metabolitlerin saptanması, tanımlanması ve miktarının belirlenmesi metabolizma hakkında önemli bilgilere ulaşmamıza olanak sağlayacaktır. Belirlenen bir zaman aralığında, lipid, karbohidrat, hormon, vitamin ve diğer hücre bileşenlerinin parçalanmasıyla dokularda, hücrelerde ve fizyolojik sıvılarda oluşan ara ve son ürün olan metabolitlerin, yüksek teknolojik cihazlar kullanılarak saptanması, tanımlanması ve miktarının belirlenmesine metabolomiks denir. Metabolomiks ile, peptitler, oligonükleotidler, şekerler, alkaloidler, nükleozidler, organik asitler, ilaçlar,

ketonlar, aldehitler, aminler, amino asitler, insan bakteri ürünleri, lipidler ve steroidler gibi metabolitlerin kalitatif ve kantitatif analizi mümkündür.¹⁵⁹

Metabolitler, metabolik yollarla olan ilişkisi sayesinde genetik veya çevresel faktörlerin organizmadaki etkilerine ışık tutarlar. Metabolomiks, bu faktörlerle metabolit seviyeleri arasındaki ilişkiyi açıklamamızı sağlayan en yeni omik tekniklerinden biridir. Bu teknik sayesinde, hastalık, ilaç, cerrahi müdahale, genetik, diyet, yaş gibi faktörlerinin metabolom profillerinde meydana getirdiği değişiklikler ortaya konabilir. Bu faktörlerin etkisi altında alınan doku, tükürük, beyin omurilik sıvısı, idrar ve kan plazması gibi biyolojik örneklerde bulunan metabolitler tanımlanabilir, miktarları ölçülebilir ve bu şartlar altındaki metabolik yollar tanımlanabilir.^{160, 161}

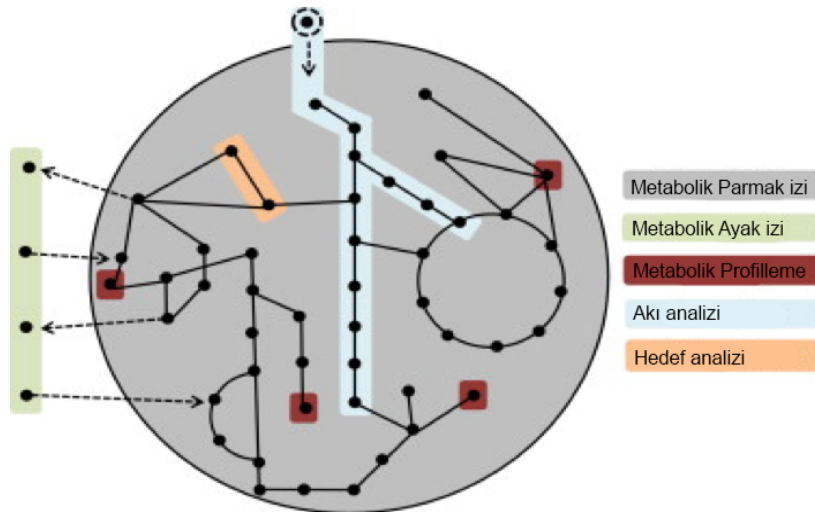
Metabolomiks çalışmaları, çalışmanın amacına bağlı olarak hedeflenmiş ve hedeflenmemiş metabolomiks olmak üzere 2 sınıfa ayrılmaktadır.

Bir amaç için belirlenmiş bir veya birden fazla metabolitin nitel ve nicel analizi, hedeflenmiş metabolomiks analizi olarak tanımlanır. Spesifik bir hastalık, biyolojik aktivite veya metabolik yolda bulunan metabolitlerin nicel olarak değişiklikleri incelenerek, metabolomun büyük bir kısmında bulunan diğer metabolitler dikkate alınmaz.

Hedeflenmemiş metabolomiks çalışmaları ise; kontrol ve örnek gruplarına ait metabolomların karşılaştırılması ve tüm metabolitlerin yüksek verimle analizi esasına dayanır. Hedeflenmemiş metabolomiksle; sağlıklı ve hasta, farklı derecelerde hastalığa sahip, ilaç kullanmış ve kullanmamış gibi örneklerden oluşan farklı gruplara ait metabolitlerin, nitel ve nicel analiz yapılmadan birçok istatistiksel yöntemler sayesinde kıyaslanarak sınıflandırılması amaçlanır. Ayrıca bu yöntem, aynı koşullar altında bulunan farklı biyolojik sistemlerin karşılaştırılmasına da olanak sağlar. Yeni metabolitlerin ve yeni metabolik yolların bulunmasına imkan tanıyan hedeflenmemiş metabolomiks

tekniki, son yıllarda hastalıklarda yeni biyobelirteç tespitinde, metabolik yolların aydınlatılmasında, çok çeşitli metabolik bozuklukların daha iyi karakterize edilip anlaşılmasında, ilaç aktivite ve toksisite çalışmalarında sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır.¹⁶³⁻¹⁶⁵

Metabolomiks çalışmalarında, belirlenen amaca uygun olarak farklı yaklaşımlar kullanılmaktadır (Şekil 2.15). Biyolojik sistem bünyesinde bulunan tüm metabolitlerin analiz edilmesini sağlayan, hedeflenmemiş metabolomiks analizlerinde sıklıkla kullanılan yaklaşıma metabolik parmak izi yaklaşımı denir. Hücre kültür ortamlarında bulunan metabolitler metabolik ayak izi yaklaşımı ile analiz edilir. Metabolik profillemeye, belirli sayıda metabolitin veya belirlenen bir yolağa ait metabolitlerin analiz edilmesidir. İlk uygulanan ve öncü yaklaşımlardan biri olan metabolik profillemeye, bir yolak üzerinden metabolizmayı genel olarak inceleme imkanı sağlar. Metabolitler kantitatif olarak analiz edilerek veriler yorumlanır. Akı analizinde ise, izotop işaretli karbon bileşiği kullanılarak, bileşiğin izlediği metabolik yolak veya yollar incelenir.¹⁶⁴⁻¹⁶⁶



Şekil 2.15. Metabolomik yaklaşımlar

2.8.2. İnsan Metabolom Projesi

Metabolomiks çalışmalarında daha iyi verim alınması için insan metabolomunun iyi şekilde tanımlandığı bir veri bankasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaç ile 2004 yılında, derişimi 1 mM'dan büyük olan ve saptanabilecek tüm insan metabolitlerini belirleyerek bir veri bankasında toplayabilmek için İnsan Metabolom Projesi (HMP) başlatılmıştır. Proje; geçmiş zamanda tanımlanmış metabolitlerin doğrulanması ve vücut sıvısı veya dokusu gibi farklı ortamlarda bulunabilecek sayısız metabolitin nitel ve nicel analiz sonuçlarının bir araya getirilmesini hedeflemektedir.

HMP ile oluşturulan İnsan Metabolom Veri Tabanı'nda (Human Metabolom Database-HMDB); insanlarda hem suda hem de lipitlerde çözünebilen 1 mM'dan büyük olan yaklaşık 114.005 adet metabolite ait kimyasal, klinik, moleküler biyoloji ve biyokimya verilerin yanısıra, bu metabolitlerin ilişkili olduğu hastalık, enzim, metabolik yolak diyagramları, ilaçlar, toksinler ve çevre kirleticiler hakkında detaylı bilgiler mevcuttur. Araştırmacıların bu veritabanına rahatça ulaşabilmesi için İnsan Metabolom Kütüphanesi (Human Metabolome Library-HML) oluşturulmuştur.¹⁶⁷

2.8.3. Metabolomiks Teknolojisinin Kullanım Alanları

Son yıllarda hızla gelişim gösteren metabolomiks teknolojisi, yüksek teknolojiye sahip analitik cihazlar yardımı ile en küçük canlılardan insan metabolizmasına kadar araştırmacıların cevap bulamadığı birçok problemin çözümüne ışık tutmaktadır.^{156, 157}

Metabolomiks çalışmaları ile bakteriyel genoma ait gen işlevlerinin aydınlatılması sağlanmıştır. Fare ve yenidoğan bağırsak floralarının karşılaştırılarak iyi ve dengeli bir mikroflora üretiminin bazı hastalıkları önleyebileceği belirlenmiştir. Bitki metabolomlarının bitkinin metabolizmasının, gelişiminin ve fizyolojisinin üzerindeki etkileri aydınlatılmıştır.¹⁵⁶⁻¹⁵⁸

Omiks alanında yapılan çalışmalar moleküler farmakolojideki ilerlemeleri değiştirmekte, çeşitli insan hastalıklarını tedavi etmek veya kontrol etmek için ilaçların geliştirilmesinde kayda değer gelişmelere yol açmaktadır. Ancak, bu süreçte bazı zorluklar görülmektedir. Birçok hasta tedavilere iyi cevap vermez ve/veya kombine ilaç tedavisi yaklaşımında ilaç-ilaç etkileşmelerine maruz kalır. İlaç metabolizmalarını aydınlatabilmek için tercih edilmeye başlanan “farmakometabolomiks”, bir bireyin biyolojik matrislerindeki metabolitleri, farmasötik bileşiklerin metabolizmasını tahmin etmek, değerlendirmek ve bir ilacın farmakokinetik profilini anlamak için yapılan çalışmaların tamamıdır. Farmakometabolomiks, hastalık patofizyolojisindeki değişkenlikleri, ilaç yanıtındaki bireysel farklılıkları ve ilacın sistem üzerindeki etkileri hakkında geniş bilgi sahibi olmamıza olanak sağlamaktadır. Farmakometabolomiks çalışmaları, bireyin çevre, genetik ve bağırsak mikrobiyomu gibi faktörlerden etkilenen metabolik durumunun aydınlatılmasını, tedavi sonuçlarını bildirebilecek tedavi öncesi ve sonrası biyobelirteçleri tanımlamayı içerir. Ayrıca, farmakometabolomiks ilaçların metabolizma üzerindeki etkilerini haritalandırmamıza ve ilaç yanıt fenotiplerine katkıda bulunan yolları belirlememize imkan tanır.¹⁶⁸

Metabolomiks, ilaç metabolizması ve toksisitesinin kişiden kişiye farklılık gösterdiğini açığa kavuşturabilir. Bu sebeple ilaç araştırma ve geliştirme de önemli bir rol üstlenmeye başlamıştır. Ayrıca son zamanlarda ilaç-ilaç, ilaç-besin etkileşimlerinin, kanser mekanizmalarının, metabolizmanın kanser tedavisindeki rolünün ve hastalıkların erken teşhisi ve tedavi etkinliğinin belirlenmesi amacıyla metabolomiks teknikleri sıklıkla kullanılmaya ve önemli sonuçlar elde edilmeye başlanmıştır.

Bu çalışmalar omiks teknolojileriyle aydınlatılmaya çalışılan metabolizmanın insan sağlığında kullanılabilecek çok önemli bilgiler taşıdığını göstermektedir.^{169, 170}

2.8.4. Metabolitleri Tanımlamada Kullanılan Analitiksel Yöntemler

Metabolomiks deneylerde kullanılan analitik yöntemler, yapılan çalışmanın amacına, biyolojik örneklerin farklılığına, incelenen türe ait metabolomun büyüklüğüne ve daha birçok faktöre bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Metabolik yaklaşımın türüne göre bir veya birden fazla farklı analitik yöntemden de faydalanılabilir. Bu sayede örneklerden elde edilen metabolit ve veri sayısında artış gözlenir.

Metabolitler yapılarında karbonhidratlar, amino ve yağ asitleri, lipitler, vitaminlerin yanısıra birçok elementel türleri de barındırırlar. Bu sebeple moleküler ağırlık, polarite, çözünürlük gibi kimyasal özellikleri ve uçuculuk gibi fiziksel özellikleri kullanılarak metabolitler birbirlerinden ayrılabilir, tanımlanabilir ve nicel olarak analiz edilebilir.

Omiks teknolojilerinde, metabolitleri objektif olarak kısa sürede kesin bir şekilde tanımlayabilmek, doğru ve kesin sonuçlarla miktar tayinlerini gerçekleştirebilmek, oluşturulan biyolojik çalışma grupları arasındaki ilişkiyi aydınlatabilmek, ilaç aktivite ve toksisitesini güvenilir bir şekilde belirleyebilmek için kullanılan analitik yöntemler aşağıda verilmiştir. ¹⁵⁶⁻¹⁵⁸

- Kütle spektrometrisi(MS)
- NMR spektroskopisi
- Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS), elektrosprey iyonizasyonu (ESI-MS) , atmosferik basınç kimyasal iyonizasyonu (APCI-MS)
- 4-Kutuplu Kütle Spektrometresi (Quadropole) ve Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresidir (TOF), hibrid dört kutuplu (QTOF) analizörlerine sahip LC-MS
- Sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrisi LC-MS/MS
- Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi-Kütle spektroskopisi,(UPLC-MS)
- Gaz kromatografisi- kütle spektrometresi (GC-MS)

- MALDI-TOF-MS
- Raman spektroskopisi
- Fourier dönüşümü iyon siklotron rezonansı (FTICR) –MS
- Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)
- Kapiller elektroforez-kütle spektrometresi (CE-MS)
- Kapiler elektroforez (CE)

2.8.5. Metabolomiks Çalışmalarında Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

Metabolomikste, metabolitlerin tanımlanması, metabolomlar arasındaki farklılıkların ortaya çıkarılması, spesifik fenotipik özelliklerin karakterize edilmesi gibi aşamaların ardından, elde edilen büyük ölçekli, karmaşık veri setlerinin anlamlı ve entegre hale getirilebilmek, biyolojik olarak alakalı bilgileri çıkarmak için, verileri tek bir test skoru altında birleştiren sabit matematiksel denklem veya bilgisayar algoritması sağlayan istatistiksel yöntemler kullanılır.¹⁷¹

2.8.6. Veri Analizi ve Algoritma Seçimi

a-) Tek Değişkenli Analiz

Metabolomiks deney sonuçları, içerisinde çok değişkenli veriler bulundurmasına rağmen, deney grupları arasında artan veya azalan metabolitleri tek başlarına değerlendirebilmek için tek değişkenli analiz yöntemleri kullanılmaktadır. Bu amaçla ANOVA, z ve t testleri gibi parametrik yöntemlerden faydalanılır. Elde edilen veriler normal dağılım göstermediklerinde ise veri setinin logaritması alınır ve verilerin normal dağılım göstermesi sağlanır.

b-) Çok Değişkenli Veri Analizi

Metabolomiks deneylerinde ortaya çıkan çok değişkenli veriler, birden fazla grupta bulunabilen tek bir metabolitten, tek moleküller arasındaki yapılara kadar bir çok

veriden faydalanır. Metabolomiks tekniklerinde çok değişkenli verileri işlemek amacıyla; kısmi en küçük kareler diskriminant analizi (PLS-DA), küme analizi ve temel bileşen analizi (PCA) teknikleri kullanılır.

Temel bileşen analizi (PCA); yüksek boyutlu bir veri kümesine ait değişkenlerin, birbiriyle ilişkili ana bileşenler ile anlamlı hale getirilmesini diğer bir ifadeyle veriyi en iyi tanımlayacak boyutları seçerek, birbiriyle ilişkisi olup olmadığını anlamak için kullanılan, çok değişkenli analizlerde en çok tercih edilen tekniktir. Metabolomiks çalışmalarında ana bileşen olan metabolit düzeylerinin, optimal parametreler ilişkisi en anlaşılır ve etkili şekilde PCA ile göz önüne konulabilir.

Küme analizi, gruplanmamış veri matrisindeki örnekleri benzerliklerine göre sınıflandırmak ve verileri bu sınıflandırmaya göre değerlendirmemizi sağlar. Kümeler kendi içlerinde homojen ancak kendi aralarında heterojen olmalıdırlar. Küme analizi, kümelerin tanımlanması olan toksonomide, verilerden ayrı olarak değişkenlerin sınıflandırılmasında, boyut indirgemedede ve p değişken açısından aşırı ve aykırı gözlemlerde kullanılır.

Kısmi en küçük kareler regresyonu açıklayıcı ve bağımlı değişkenler arasındaki lineer ilişkiyi modellemek için kullanılan yanlı bir yöntemdir. Kısmi en küçük kareler yeni açıklayıcı değişkenler olarak kullanılacak skor vektörlerini hesaplar ve daha sonra bu skor vektörlerini kullanarak bağımlı değişkene ilişkin regresyon denklemini kurar. Metabolomikste PLS'nin temel amacı; çok değişkenli bir veri kümesinden sınıf farklarını belirlemektir. PLS ile oldukça karmaşık veri setlerine sahip sınıflar arasında ayırım gerçekleştirilebilir.^{165, 172-174}

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kimyasal Maddeler ve Cam Malzemeler

- Solifenasin süksinat (Zentiva); KINZY® 5 mg tablet (Abdi İbrahim)
- Tamsulosin (Zentiva); FLOMAX MR® 0.4 mg kapsül (Boehringer Ingelheim)
- Silodosin (Zentiva); UROREC® 8 mg kapsül (Recordati İlaç)
- Asetonitril (HPLC saflık, Merck, Almanya)
- Metanol (Merck, Almanya)
- MTBE (Metil Tert-Butil-Eter) (Sigma-Aldrich)
- Trifloro asetik asit-TFA (Sigma-Aldrich)
- Dikloro metan(Merck, Almanya)
- Hekzan (Merck, Almanya)
- Sodyum karbonat (Merck, Almanya)
- Fosforik asit (Merck, Almanya)
- Formik asit (Merck, Almanya)
- Olanzapin (Sigma-Aldrich)
- Zolmitriptan (Astra-Zeneca)
- Deiyonize Su

Otomatik pipet (10.0-100.0 µL, 100.0-1000.0 µL ve 1000.0-5000.0 µL eppendorf otomatik pipet), pipet uçları, erlen, beher, mezür, balonjoje, vial, ependorf tüpler ve deney tüpleri Erzurum Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'ndan, biyolojik matriks olarak kullanılan sağlıklı insan plazması ise Atatürk Üniversitesi Yakutiye Araştırma Hastanesi Kan Bankası'ndan, metabolomik çalışmaları için kullanılan 48 adet albino whistar rat Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'den (ATADEM), hayvan deneyleri sırasında anestezi için kullanılan tiyopental sodyum 1.0 gr enjektabl solüsyon için toz ve cerrahi için

kullanılan malzemeler Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'ndan temin edildi.

3.2. Cihazlar

Çalışmalarda kullanılan cihazlar listesi:

- Santrifüj (Hettich, RPM x 100)
- Ultrasonik banyo (Elma LC 30)
- Terazı (Metler Toledo)
- pH metre (Schott)
- Karıştırıcı (Vorteks, IKA)
- Su banyosu (GFL)
- Etüv (Mettler)
- Vakum pompası (Phenomenex)
- Vakum konsantratör Eppendorf Concentrator Plus (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Santrifüj cihazı Micro 220R Hettich/Zentrifugen (Hettich, Germany)
- Spektrofotometre sistemi (Spektrofotometre (Thermospectronic, HeaIOS β) ve bilgisayar (Vestel))
- HPLC sistemi (Agilent 1200 Series, G1311A/Quat Pump, G1314B/VWD dedektör, Develosil® 5 µm ODS-HG 140 Å, LC Column 150 x 4.6 mm, C18 kolon)
- Kolon Agilent poroshell 120 EC-C18 (4.6*150mm 2.7 micron)
- Agilent 1290 Infinity LC sistemi (Agilent Technologies, ABD)
- Q-TOF kütle spektrometre sistemi sistemi (Agilent 6530 Accurate-Mass. Agilent Technologies, USA)

3.3. Yöntemler

3.3.1. UV-Görünür Bölge Spektroskopi Yöntemi

Tamsulosin, silodosin ve solifenasin süksinat için geliştirilen UV-Görünür Bölge Spektroskopi yönteminin şartları Tablo 3.1’de verildi.

Tablo 3.1. UV-Görünür Bölge Spektroskopi yöntem şartları

Yöntem Şartları	Tamsulosin	Silodosin	Solifenasin Süksinat
Data modu	Absorbans	Absorbans	Absorbans
Start Lamba (nm)	190	190	190
Stop Lamba (nm)	290	290	290
Absorbans (nm)	226	223	222
Tarama Hızı	600 nm/dk	600 nm/dk	600 nm/dk
Bant Genişliği	2 nm	2 nm	2 nm
Düzgünlük	Yüksek	Yüksek	Yüksek

3.3.2. 1D-Türev ve 2D-Türev Spektroskopi Yöntemleri

Tamsulosin, silodosin ve solifenasin süksinat için geliştirilen Birinci Derece-Türev (1D-Türev) ve İkinci Derece-Türev (2D-Türev) spektroskopi yöntem şartları Tablo 3.2 ve 3.3’de verildi.

Tablo 3.2. Birinci Derece-Türev (1D-Türev) Spektroskopi yöntem şartları

Yöntem Şartları	Tamsulosin	Silodosin	Solifenasin Süksinat
Data modu	Türev (1D-)	Türev (1D-)	Türev (1D-)
Start Lamba (nm)	190	190	190
Stop Lamba (nm)	290	290	290
Pozitif Pik Absorbans (nm)	218	218	219
Negatif Pik Absorbans (nm)	235/299	281	228/274
Tarama Hızı	600 nm/dk	600 nm/dk	600 nm/dk
Bant Genişliği	2 nm	2 nm	2 nm
Dalga Boyu Aralığı	21.0	21.0	21.0
Düzgünlük	Yüksek	Yüksek	Yüksek

Tablo 3.3. İkinci Derece-Türev (2D-Türev) Spektroskopi yöntem şartları

Yöntem Şartları	Tamsulosin	Silodosin
Data modu	Türev (2D-)	Türev (2D-)
Start Lamba (nm)	190	190
Stop Lamba (nm)	290	290
Pozitif Pik Absorbans (nm)	237	283
Negatif Pik Absorbans (nm)	229/279	278
Tarama Hızı	600 nm/dk	600 nm/dk
Bant Genişliği	2 nm	2 nm
Dalga Boyu Aralığı	21.0	21.0
Düzgünlük	Yüksek	Yüksek

3.3.3. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Silodosin standart maddesinden metanol ile 1.0 mg/mL derişimde silodosin birinci stok çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden 20.0 mL alınıp 100.0 mL'lik balonjojeye aktarıldı ve üzerine ticari TFA çözeltisinden 1.0 mL ekledikten sonra çözelti deiyonize su ile 100.0 mL'ye tamamlandı. Sonuç olarak %1.0'lik TFA içeren 200.0 µg/mL derişimine sahip ikinci silodosin stok çözeltisi hazırlanmış oldu. Hazırlanan çözelti 80 °C sıcaklıkta su banyosunda yarım saat bekletildi. Bu bekletilme sonunda elde edilen ikinci stok çözeltisinden silodosin 1.0-60 µg/mL derişim aralığında standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Tamsulosin ve solifenasin süksinat etken maddeleri için stok (%1.0'lik TFA içeren 200.0 µg/mL) ve standart çalışma çözeltileri de (Tamsulosin: 5.0-40.0 µg/mL derişim aralığında ve solifenasin süksinat: 5.0-80.0 µg/mL derişim aralığında) benzer şekilde hazırlandı.

Geliştirilen spektroskopi yöntemlerin, yöntem geçerlilik testlerini yapmak için kalibrasyon eğrileri içerisine düşen düşük, orta ve yüksek derişimlerde kalite kontrol çözeltileri standart çalışma çözeltilerinin hazırlandığı şekilde hazırlandı. Üç etken madde

(silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat) için hazırlanan çözelti derişimleri aşağıda verilmiştir.

Solifenasin süksinat çözeltileri:

Standart çözeltiler ($\mu\text{g/mL}$): 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 45.0, 50.0, 60.0, 70.0, 80.0

Kalite Kontrol Çözeltileri ($\mu\text{g/mL}$): 15.0, 45.0, 75.0

Silodosin çözeltileri:

Standart çözeltiler ($\mu\text{g/mL}$): 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0, 60.0

Kalite Kontrol Çözeltileri ($\mu\text{g/mL}$): 15.0, 35.0, 55.0

Tamsulosin çözeltileri:

Standart çözeltiler ($\mu\text{g/mL}$): 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, 35.0, 40.0

Kalite Kontrol Çözeltileri ($\mu\text{g/mL}$): 13.0, 23.0, 33.0

3.3.4. Spektroskopi Yöntemlerinde Farmasötik Preparat Çözeltilerinin Hazırlanması

Silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat etken maddelerine sahip ticari ilaçlar kapsül ve tablet formunda bulunmaktadır. Çalışmamızda, tamsulosin ve silodosin etken maddelerine sahip ticari ilaçlar sırasıyla Flomax MR® 0.4 mg kapsül ve Urorec® 8 mg kapsül, solifenasin süksinat etken maddesine sahip ticari ilaç Kinzy® 5 mg tablet olarak yerel eczanelerden temin edildi.

Silodosin: Urorec® (8mg) Kapsül'den 6 kapsül alındı, kapsül içerikleri boşaltılıp tek tek tartılarak içerik miktarları belirlendi. Daha sonra 6 kapsül içeriği birleştirildi, tartıldı ve toplam kütle kaydedildi. Birleştirilen kapsül toz içerikleri iyice karıştırılarak homojen bir karışım elde edilmeye çalışıldı. Bu karışımdan bir kapsül miktarı kadar tartılarak alındı ve 10.0 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Üzerine 7.0 mL metanol eklendi vortekste 10 dk ve ultrasonik banyoda 5 dk bekletilerek tamamen çözünmesi sağlandı. Çözeltide çözünmeden kalan yardımcı maddeleri uzaklaştırmak için whatman 40 süzgeç

kağıdından 10.0 mL'lik balon joje içerisinde süzöldü ve çözelti hacmi metanol ile tamamlandı. Bu şekilde Urorec® (8mg) Kapsöl stok çözeltisi hazırlanmış oldu. Bu çözeltiden %1.0'lik TFA çözeltisi kullanılarak 7.5 µg/mL derişimde silodosin (Urorec® (8mg)) kapsöl çözeltisi hazırlandı.

Tamsulosin: Flomax MR® 0.4 mg Kapsöl'den 6 kapsöl alındı, kapsöl içerikleri boşaltılıp tek tek tartılarak içerik miktarları belirlendi. Kapsöl içerikleri nano partiköl yapısında olduğu için kapsöl içerikleri havanda öğütölerek iyice toz haline getirildi. Toz haline getirilen 6 kapsöl içeriğı birleştirildi, tartıldı, toplam kütle kaydedildi ve iyice karıştırılarak homojen bir karışım haline gelmesi sağlandı. Bu karışımından bir kapsöl miktarı kadar tartılarak alındı ve 10.0 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Üzerine 7.0 mL metanol eklendi vortekste 10 dk ve ultrasonik banyoda 5 dk bekletilerek tamamen çözünmesi sağlandı. Çözeltide çözünmeden kalan yardımcı maddeleri uzaklaştırmak için whatman 40 süzgeç kâğıdından 10.0 mL'lik balon joje içerisinde süzöldü ve çözelti hacmi metanol ile tamamlandı. Bu şekilde Flomax MR® (0.4 mg) Kapsöl stok çözeltisi hazırlanmış oldu. Bu çözeltiden %1.0'lik TFA çözeltisi kullanılarak 7.0 µg/mL derişimde tamsulosin (Flomax MR® (0.4 mg)) kapsöl çözeltisi hazırlandı.

Solifenasin süksinat: Kinzy® 5 mg tablet'ten 6 tablet alındı her bir tablet tek tek tartılarak bir tablet kütle ve ayrıca 6 tablet toplu olarak da tartılarak toplam kütle belirlendi. 6 tablet havanda öğütölerek iyice toz haline getirildi. Bu toz karışımından bir tablet kütleinde tartılarak alındı ve 10 mL balon joje içerisine aktarıldı. Üzerine 7.0 mL metanol eklendi vortekste 10 dk ve ultrasonik banyoda 5 dk bekletilerek tamamen çözünmesi sağlandı ve çözelti hacmi metanol ile 10.0 mL'ye tamamlandı. Çözeltide çözünmeden kalan yardımcı maddeleri uzaklaştırmak için whatman 40 süzgeç kâğıdından süzöldü. Bu şekilde Kinzy® 5 mg Tablet stok çözeltisi hazırlanmış oldu. Bu

çözeltiden %1.0'lik TFA çözeltisi kullanılarak 7.5 µg/mL derişimde solifenasin süksinat (Kinzy® 5 mg) tablet çözeltisi hazırlandı.

%1.0'lik TFA ile hazırlanan her üç farmasötik preparat (kapsül ve tablet) çözetileri 80°C sıcaklıkta su banyosunda 30 dakika bekletildikten sonra spektroskopik tekniklerle analizleri gerçekleştirildi.

3.3.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Yöntemi

HPLC çalışmasında tamsulosin, silodosin ve solifenasin süksinat standart çalışma ve plazma çözeltileri için uygulanan yöntem şartları Tablo 3.4'de gösterildi.

Tablo 3.4. HPLC Yöntem Şartları

Yöntem Şartları	Standart / Plazma
Kolon	Agilent C18 kolon (5 µm, 150 x 4.6 mm)
Hareketli faz	10 mM amonyum format (pH:4): asetronitril: metanol (55:32.5:12.5 h/h/h)
Akış hızı	1 mL/dk
Kolon sıcaklığı	30 °C
Enjeksiyon hacmi	10.0 µL
Dedektör	UV (ultraviole) dedektör
Dalga Boyu	0-2 dk. 250 nm, 2 dk'dan sonra 210 nm
Analiz süresi	8 dk
İç Standart (IS)	Zolmitriptan

Hareketli faz olarak kullanılan çözeltiler: 1- Asetonitril; 2- Metanol; 3- Amonyum format tampon çözeltisi- 630 mg amonyum format 1.0 L'lik balonjojede 950 mL'ik saf suda çözüldü pH metre ile ölçerek bu çözeltinin pH'ı 4.0 olana kadar formik asit eklendi. pH'ı 4.0 olan çözeltinin hacmi saf su ile 1.0 L'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti Millipore filtrasyon sistemi ile vakum altında süzöldü.

Hareketli faz olarak kullanılan çözücü ve çözeltiler 15 dk degazerde bekletildi ve HPLC sistemine vermeden önce de 10-15 dk purge yapıldı.

3.3.4.1. HPLC Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

İç Standart (IS) Çözeltisi: İç standart olarak zolmitriptan etken maddesi kullanıldı. 25.0 mg zolmitriptan maddesi saf suda çözülerek toplam hacim 50.0 mL'ye tamamlandı. Bu şekilde 500.0 µg/mL'lik zolmitriptan stok çözeltisi hazırlanmış oldu. Hazırlanan bu çözeltden HPLC çalışma çözeltilerinde 50.0 µg/mL derişiminde zolmitriptan (IS) çözeltisi olacak miktarda tüm çözeltilere eklendi.

Standart Çalışma Çözeltileri: Her üç etken maddeden (silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat) 500.0 µg/mL'lik stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltden her üç maddenin standart çalışma çözeltileri 0.75-150.0 µg/mL derişim aralığında ve yöntem geçerlilik testlerinin yapılabilmesi için kullanılan kalite kontrol çözeltileri hareketli faz (10 mM amonyum format:asetonitril:metanol) ile hazırlandı. Hazırlanan çözeltilerin derişimleri aşağıda verildi.

Solifenasin süksinat:

Standart Çözeltiler (µg/mL): 3.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 45.0, 50.0, 60.0

Kalite Kontrol Çözeltileri (µg/mL): 15.0, 35.0, 55.0

Silodosin:

Standart çözeltiler (µg/mL): 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0, 70.0, 90.0

Kalite Kontrol Çözeltileri (µg/mL): 15.0, 45.0, 85.0

Tamsulosin:

Standart çözeltiler (µg/mL): 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0, 70.0, 90.0

Kalite Kontrol Çözeltileri (µg/mL): 15.0, 45.0, 85.0

Farmasötik Preparat Çözeltileri (µg/mL): 17.5, 47.5, 87.5

Solifenasin süksinat+Silodosin

Standart çözeltiler ($\mu\text{g/mL}$): 3.0/1.0, 5.0/5.0, 10.0/10.0, 20.0/20.0, 30.0/40.0, 40.0/50.0, 45.0/60.0, 50.0/80.0, 60.0/90.0

Kalite Kontrol Çözeltileri ($\mu\text{g/mL}$): 15.0/15.0,35.0/45.0,55.0/85.0

Solifenasin süksinat+Tamsulosin

Standart çözeltiler ($\mu\text{g/mL}$): 3.0/1.0, 5.0/5.0, 10.0/10.0, 20.0/20.0, 30.0/40.0, 40.0/50.0, 45.0/60.0, 50.0/80.0, 60.0/90.0

Kalite Kontrol Çözeltileri ($\mu\text{g/mL}$): 15.0/15.0,35.0/45.0,55.0/85.0

3.3.4.2.HPLC Yönteminde Farmasötik Preparat Çözeltilerinin Hazırlanması

Silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat etken maddelerine sahip ticari ilaçlar kapsül ve tablet formunda bulunmaktadır. Çalışmamızda, tamsulosin ve silodosin etken maddelerine sahip ticari ilaçlar sırasıyla Flomax MR® 0.4 mg kapsül ve Urorec® 8 mg Kapsül, solifenasin süksinat etken maddesine sahip ticari ilaç Kinzy® 5 mg tablet olarak yerel eczanelerden temin edildi.

Silodosin: Urorec® (8mg) Kapsül'den 10 kapsül alındı, kapsül içerikleri boşaltılıp tek tek tartılarak içerik miktarları belirlendi. Daha sonra 10 kapsül içeriği birleştirildi, tartıldı ve toplam kütle kaydedildi. Birleştirilen kapsül toz içerikleri iyice karıştırılarak homojen bir karışım elde edilmeye çalışıldı. Bu karışımdan bir kapsül miktarı kadar tartılarak alındı ve 10.0 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Üzerine 7.0 mL metanol eklendi vortekste 10 dk ve ultrasonik banyoda 5 dk bekletilerek tamamen çözünmesi sağlandı. Çözeltide çözünmeden kalan yardımcı maddeleri uzaklaştırmak için whatman 40 süzgeç kâğıdından 10.0 mL'lik balon joje içerisinde süzüldü ve çözelti hacmi metanol ile tamamlandı. Bu şekilde Urorec® (8mg) Kapsül stok çözeltisi hazırlanmış oldu. Bu çözeltiden 50 $\mu\text{g/mL}$ derişimde IS içeren 7.5 $\mu\text{g/mL}$ derişimde silodosin (Urorec® (8mg)) kapsül çözeltisi hareketli faz (10 mM amonyum format:asetonitril:metanol) ile hazırlandı.

Tamsulosin: Flomax MR® 0.4 mg Kapsül'den 6 kapsül alındı, kapsül içerikleri boşaltılıp tek tek tartılarak içerik miktarları belirlendi. Kapsül içerikleri nano partikül yapısında olduğu için havanda öğütülerek iyice toz haline getirildi. Toz haline getirilen 6 kapsül içeriği birleştirildi, tartıldı, toplam kütle kaydedildi ve iyice karıştırılarak homojen bir karışım haline gelmesi sağlandı. Bu karışımdan bir kapsül miktarı kadar tartılarak alındı ve 10.0 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Üzerine 7.0 mL metanol eklendi vortekste 10 dk ve ultrasonik banyoda 5 dk bekletilerek tamamen çözünmesi sağlandı. Çözeltide çözünmeden kalan yardımcı maddeleri uzaklaştırmak için whatman 40 süzgeç kâğıdından 10.0 mL'lik balon joje içerisinde süzüldü ve çözelti hacmi metanol ile tamamlandı. Bu şekilde Flomax MR® (0.4 mg) Kapsül stok çözeltisi hazırlanmış oldu. Bu çözeltiden 50 µg/mL derişimde IS içeren 7.5 µg/mL derişimde tamsulosin (Flomax MR® (0.4 mg)) kapsül çözeltisi hareketli faz (10 mM amonyum format:asetonitril:metanol) ile hazırlandı.

Solifenasin süksinat: Kinzy® 5 mg tablet'ten 6 tablet alındı her bir tablet tek tek tartılarak bir tablet kütlesi ve ayrıca 6 tablet toplu olarak ta tartılarak toplam kütle belirlendi. 6 tablet havanda öğütülerek iyice toz haline getirildi. Bu toz karışımından bir tablet kütleinde tartılarak alındı ve 10 mL balon joje içerisine aktarıldı. Üzerine 7.0 mL metanol eklendi vortekste 10 dk ve ultrasonik banyoda 5 dk bekletilerek tamamen çözünmesi sağlandı ve çözelti hacmi metanol ile 10.0 mL'ye tamamlandı. Çözeltide çözünmeden kalan yardımcı maddeleri uzaklaştırmak için whatman 40 süzgeç kâğıdından süzüldü. Bu şekilde Kinzy® 5 mg Tablet stok çözeltisi hazırlanmış oldu. Bu çözeltiden 50 µg/mL derişimde IS içeren 7.5 µg/mL derişimde solifenasin süksinat (Kinzy® 5 mg) tablet çözeltisi hareketli faz (10 mM amonyum format:asetonitril:metanol) ile hazırlandı.

3.3.4.3.Silodosin, Tamsulosin ve Solifenasin Süksinatın Plazmadan Ekstraksiyon

Prosesi

Her üç etken maddenin plazmada miktar tayini için etken madde çözeltilerinin plazmaya spayk edilmesi ve daha sonra sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemlerinin uygulanması ile plazma çalışma çözeltileri hazırlandı ve HPLC ile analizleri gerçekleştirildi. Uygulanan işlemler aşağıda verildi:

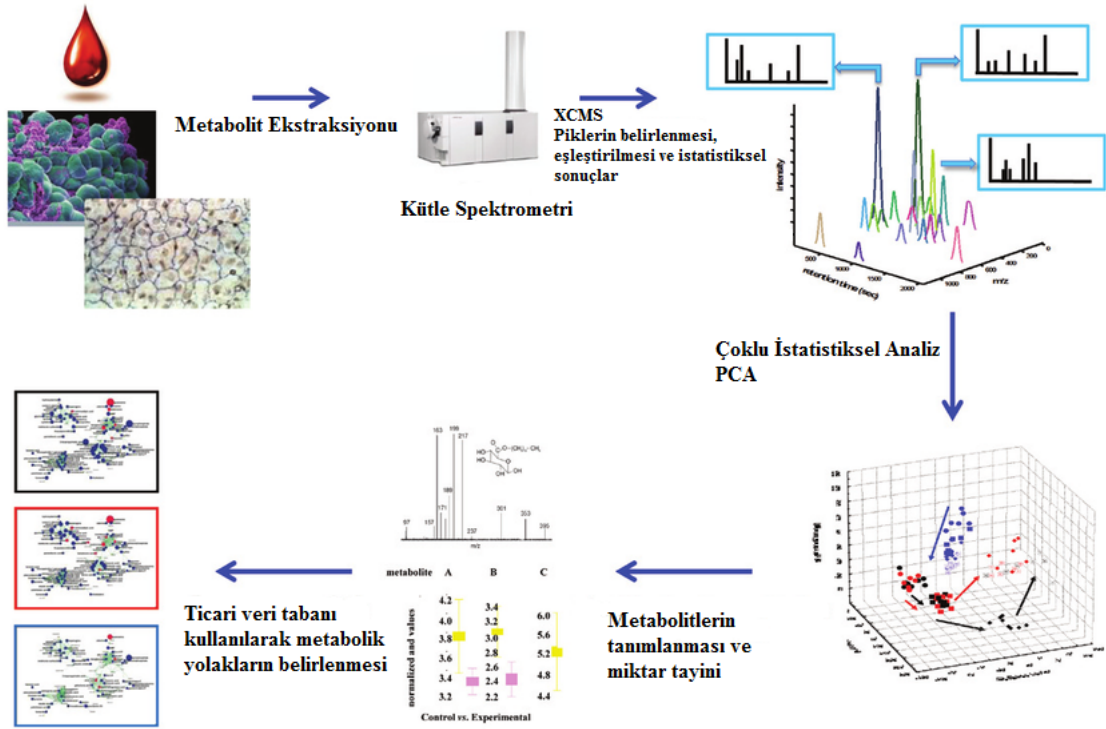
- İstenen derişimde plazma çalışma çözeltilerini elde etmek için uygun derişimlerde etken madde çözeltileri eppendorf tüpü içerisindeki 100.0 µL boş insan plazmasına spayk edildi ve 1 dk Vorteks Mikser’de vortekslendi.
- Üzerine 300.0 µL 3.0 M Na₂CO₃ eklendi ve 15 dk 2000 rpm Vorteks Mikser’de vortekslendi
- 1 mL MTBE : Hekzan : Diklorometan karışımı (2:1:1, h/h/h) eklendi ve 20 dk 2000 rpm Vorteks Mikser’de vortekslendi.
- 8600 rpm’de 25 dk santrifüjlendi.
- Üstteki süpernatant alındı, oda koşullarında azot gazı altında uçuruldu.
- Elde edilen kalıntıya 0.1 mL mobil faz-0.5 M H₃PO₄ (9:1, h/h) çözelti karışımı eklendi.
- 5 dk Vorteks Mikser’de vortekslendi ve aynı çözelti ile 1.0 mL’ye tamamlandı.
- 45 µm gözenek büyüklüğüne sahip membran filtreden viallere süzüldü.
- HPLC sistemine 10.0 µL enjekte edildi.

3.3.5. Metabolomiks Çalışması

3.3.5.1.Genel Deneysel Prosedür

Hedeflenmemiş metabolomiks çalışmasında yapılacak ilk işlemler biyolojik numunenin seçilmesi ve numunenin deney prosedürüne hazırlanmasıdır. Numunelerin analizinde uygulanan işlemler: 1- çalışmada kullanılacak olan analitiksel yöntemin

seçilmesi, 2-yöntemlerden elde edilen verilerin istatistiksel açıdan değerlendirilmesi, 3- herhangi bir ticari veri tabanı veya analitik programlar kullanılarak istatistiksel açıdan farklılık gösteren metabolitlerin tanımlanması, 4-tanımlanan metabolitlerin etkili olduğu metabolik yolların tanımlanması'dır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Metabolomiks genel deneysel prosedürü

3.3.5.2. Hayvan Deneyleri

Toplam 48 adet erkek wistar albino rat (300-400 g) Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (ATADEM) temin edildi (Tablo 3.5). Hayvanlar, 12:12 saat ışık/karanlık döngüsü altında gıda ve suya serbest erişim sağlanarak standart laboratuvar koşulları altında muhafaza edildi. 12'şer adet rat kontrol, silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat ilaç gruplarına ayrılarak, literatüre paralel olarak 5 gün boyunca silodosin için günde 1 doz 8.0 mg/kg, tamsulosin için 0.4 mg/kg ve solifenasin süksinat

için 5.0 mg/kg dozunda gavaj yardımı ile oral olarak ratlara uygulandı. 5 gün boyunca sadece plasebo ilaç uygulanan, 12 adet hayvan kontrol grubu olarak kullanıldı. Kan numunelerinin alınacağı günden bir gün önce hayvanların yiyecek alımı sonlandırılıp suya erişimlerine izin verildi. Tiypental sodyum 1.0 gr kullanılarak yüksek anestezi ile bayıltılan ratlardan yaklaşık 1.0 mL kan numunesi EDTA'lı tüplere alındı. 5400 rpm'de 3 dakika santrifüj edilen kan numunelerinin üst kısımlarında toplanan plazma kısmı kapaklı ependorf tüplere akatırıldı. Örnekler metabolom analizi yapıłana kadar -80 °C'de saklandı.

Tablo 3.5. İlaç uygulanan ratların ağırlıkları

Grup/ağırlık (Gram)	Kontrol	Silodosin	Tamsulosin	Solifenasin Süksinat
1	329	319	372	356
2	361	350	378	396
3	325	380	388	387
4	350	373	375	367
5	350	367	379	373
6	318	365	373	376
7	335	372	350	386
8	342	362	326	372
9	331	367	348	369
10	329	354	366	374
11	352	346	341	356
12	346	341	327	364

3.3.5.3. Kan Numunelerinin Hazırlanması ve Metabolit Ekstraksiyonu

Ratlardan alınan kan numunelerinden elde edilen plazma örnekleri metabolom analizi için -80 ° C'den çıkarıldı. Donmuş plazma numunelerinin çözülmesi için oda sıcaklığında bekletildi. Çözülen numuneler vorteks ile homojenize edildi ve bu plazma

numunesinden 100.0 μL alındı, üzerine 300.0 μL asetonitril eklenerek vortekslendi. 15 dk $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilerek hücrelerin parçalanıp metabolitlerin serbest kalması sağlandı ve daha sonra bu numunelerde bulunan proteinleri çöktürmek için, 16000 rpm de $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonrasında üstteki süpernatantlar ayrıldı ve $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 1.5 saat vakumlu konsantratörde V-Aqua modu kullanılarak süpernatantların tamamı uçuruldu.

3.3.5.4.Q-TOF LC/MS Sistemi İçin Çözeltilerin Hazırlanması

Kör numune olarak kullanmak amacıyla; 100.0 mL hacimde %95 deiyonize su, %5 asetonitril, %0.1 formik asit ve 50.0 ng/mL iç standart olarak tercih edilen olanzapin bulunan bir çözelti hazırlandı. Plazma numunelerinde bulunan metabolitlerin ekstraksiyon işleminden sonra kuruluğa kadar uçurulan süpernatant 48 örneğin üzerine hazırlanan bu çözeltisinden 300.0 μL eklendi. ThermoMixer C karıştırıcı kullanılarak numuneler 2000 rpm'de 4 dk boyunca karıştırılarak metabolitlerin çözeltiliye geçmesi sağlandı. Hazırlanan 48 numunenin 300.0 μL 'si 0.45 μL 'luk şırınga filtre uçlarından süzülerek 96 kuyucuklu platelere analiz için aktarıldı.

3.3.5.5.Hedeflenmemiş Metabolomiks Çalışmalarında Yöntem Geçerlilik Testi

Biyolojik numunelerden alınan cevapların istatistiksel olarak sağlıklı bir şekilde yorumlanabilmesi analitiksel yöntemin veya tercih edilen yaklaşımın geçerlilik testlerinin (valide) yapılmasına bağlıdır. Bu amaçla biyolojik numuneleri temsil eden kalite kontrol örnekleri (QC) kullanıldı. İlaç verilen ve kontrol gruplarına ait ratlardan elde edilen (24 adet) plazma örneklerinin her birinden 10.0 μL alınarak bir ependorf tüp içerisinde toplandı. Bu karışım vorteksle karıştırıldıktan sonra QC numunesi olarak önceden belirlenen ekstraksiyon yöntemiyle ekstrakte edildi. Elde edilen ekstrakt konsantratör içerisinde kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Kalıntı hareketli fazda çözüldü. Bu şekilde

hazırlanan QC numuneleri sistemi stabilize etmek ve yöntemi geçerli kılmak (valide) için, her 8 numunenin analizinden sonra bir defa QC numunesi analiz edildi.

Ayrıca plazma numunelerinden elde edilen metabolitlerin kütle analizi için QC-SVR çözeltileri kullanıldı. Bütün rat plazma örnekleri önceden belirlenen ekstraksiyon yöntemiyle ekstrakte edildi, elde edilen ekstraktlar konsantratörde kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Kalıntı hareketli fazda çözülerek hazırlanan numunelerin her birinden 5.0 µL alındı, vortekslendi ve LC-MS/MS sistemine enjekte edilerek analizleri gerçekleştirildi.

3.3.5.6. Sıvı Kromatografisi İle Dört Kutuplu Uçuş Zamanı Kütle Spektroskopisi

Yöntem Şartları

Metabolomiks çalışmasında kullanılan LC-QTOF/MS yöntemi şartları ve gradient elüsyon zaman çizelgesi sırasıyla Tablo 3.6 ve 3.7’de verilmiştir.

Tablo 3.6. LC-QTOF/MS Yöntem Şartları

Parametreler	Yöntem Şartları
LC	Agilent 1290 Infinity
Q-TOF	Agilent 6530
Kolon	Hypersil C18 (100 mm x 2.1 mm, 1.9 µm)
Hareketli faz	%0.1 formik asit içeren deiyonize su-Asetonitril (Gradient Elüsyon)
Akış hızı	0.4 mL/dk
Kolon sıcaklığı	25 ° C
Enjeksiyon hacmi	2.0 µL
Analiz süresi	15
İyonizasyon	Elektron sprey pozitif
Kurutma gaz akış hızı	11 L/dk
Püskürtme basıncı	45 psi
Kurutma gaz sıcaklığı	350 °C
Kapiler voltaj	3.5 kV

Tablo 3.7 Gradient Elüsyon Zaman Çizelgesi

A (%)	B (%)	Zaman (dk)
15	85	5
95	5	10
5 dk yeniden hareketli fazın eski haline dönüşü		
Hareketli faz olarak A) 0.1 M formik asit içeren su		
B) 0.1 M formik asit içeren asetonitril		

3.3.5.7. Metabolit Profillemede Kullanılan Çoklu Analiz ve İstatistiksel Veri Analizi

Hazırlanan kör, kalite kontrol (QC) ve plazma örneklerine ait kromatogramlar, Agilent MassHunter Yazılım versiyonu B.02.00 (Agilent Technologies, ABD) kullanılarak değerlendirildi. Elde edilen veriler ‘proteowizard’ programı kullanılarak .xml formatına çevrildi ve piklerin tanımlanması amacı ile .xml formatındaki veriler XCMS yazılım programına yüklendi. Kontrol grubu ile istatistiksel olarak farklılık gösteren metabolitleri tespit etmek için bütün örnekler; $p < 0.01$ ve fold analizi > 1.5 kriterlerini sağlayacak şekilde m/z değerlerine göre sıralandı. Kriterlere uyan metabolitler METLIN ve İnsan Metabolom Veri Tabanı (HMDB) veritabanları ile incelendi ve kimliklendirildi. Kimliklendirilen metabolitlerin doğruluğunu sağlamak için QC-SVR numunelerinin MS/MS spektrumları incelendi. Ekstrakte edilen metabolitlerin kümelenmesi ve veri toplama için MATLAB R2017a programı ve OPLS-DA algoritması kullanıldı. Metaboanalyst 4.0 ve Kyoto Genler ve Genom Ansiklopedisi (KEGG) yol veritabanı kullanılarak metabolitlere ait metabolik yolak analizi çıkarıldı.

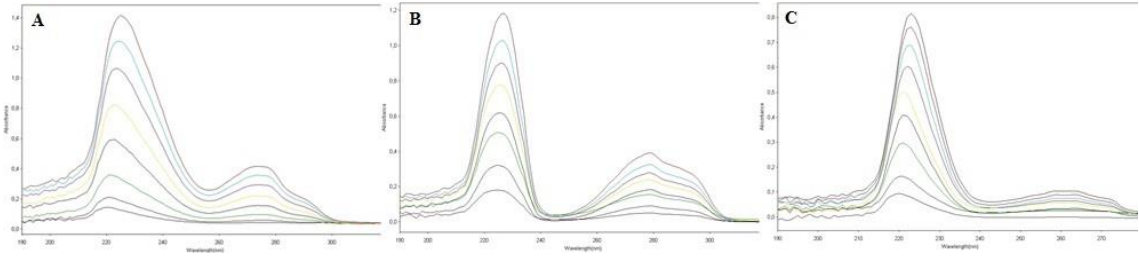
4. BULGULAR

4.1. UV-Görünür Bölge, Birinci-Türev ve İkinci-Türev Spektroskopi Yöntemleri

4.1.1. UV-Görünür Bölge Spektroskopi Yöntem Geçerlilik Testleri

4.1.1.1. Özgünlük (Belirleyicilik)

Silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinatın stok, standart çalışma çözeltileri ve kalite kontrol çözeltileri Bölüm “3.3.3. Standart Çözeltilerin Hazırlanması” kısmında belirtildiği şekilde hazırlandı. Hazırlana bu çözeltilerin maksimum absorbans verdiği dalga boyunu belirlemek için 190-800 nm dalga boyu aralığında taraması yapıldı ve spektrumları elde edildi. Spektrumlarda silodosinin 223 nm (Şekil 4.1. A), tamsulosinin 226 nm (Şekil 4.1. B) ve solifenasin süksinatın ise 222 nm (Şekil 4.1. C) dalga boylarında maksimum absorbans verdiği tespit edildi. Çalışmalarda bu dalga boyları kullanıldı. gözlemlendi.



Şekil 4.1. UV-Görünür Bölge spektroskopisi spektrumları: A) silodosin B) tamsulosin C) solifenasin süksinat

4.1.1.2. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı

Silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinatın “3.3.3. Standart Çözeltilerin Hazırlanması” bölümünde belirtildiği gibi %1.0 TFA içeren deiyonize su ile herbir etken madde için bir seri standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Her bir çözelti önceden belirlenen dalga boylarında UV-Görünür Bölge Spektrumları alındı ve maksimum absorbans değerleri okundu. Çözeltilerin derişimlerine karşı okunan absorbans değerleri

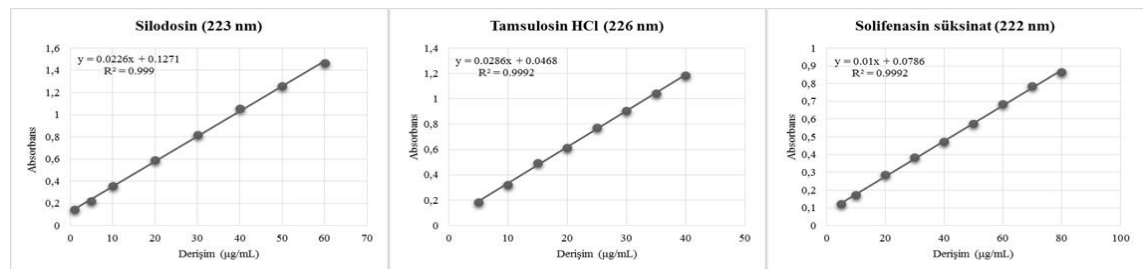
grafığe geçirilerek kalibrasyon eğrileri turetildi (Şekil 4.2.). Kalibrasyon eğrilerinin sapma gostermediği doğrusal çalışma aralığı belirlendi ve herbir etken maddenin doğrusal olduğu ve kalibrasyon eğrilerinin turetildiği standart çalışma ozeltilerinin derişimleri: silodosin için 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0 ve 60.0 µg/mL, tamsulosin için 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, 35.0 ve 40.0 µg/mL ve solifenasin sũksinat için 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0, 60.0, 70.0 ve 80.0 µg/mL derişimlerdir.

UV-Görünür Bölge Spektroskopi yöntemiyle elde edilen kalibrasyon eğrilerinin istatikselsel analiz sonuçları Tablo 4.1’de verildi.

Tablo 4.1. Silodosin, tamsulosin ve solifenasin sũksinat için UV-Görünür Bölge Spektroskopi yöntemiyle elde edilen kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz sonuçları

Etken Madde	DA (µg/mL)	Regresyon Denklemi ^a	Sa	Sb	r
Silodosin	1-60	$A_{223nm} = 0.0226x + 0.1271$	0.0002	0.0001	0.999
Tamsulosin	5-40	$A_{226nm} = 0.0286x + 0.0468$	0.0003	0.004	0.9992
Solifenasin Sũksinat	5-80	$A_{222nm} = 0.01x + 0.0786$	0.0017	0.0014	0.9992

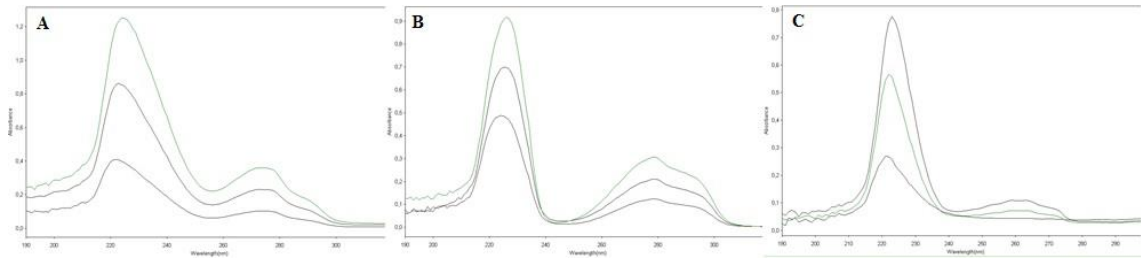
DA: doğrusal aralık, a:6 kalibrasyon eğrisi ortalaması, Sa:kaymanın standart sapması Sb:eğimin standart sapması, r: korelasyon katsayısı



Şekil 4.2. UV-Görünür Bölge Spektroskopi yöntemiyle elde edilen kalibrasyon eğrileri

4.1.1.3. Doğruluk/ Kesinlik

Silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat kalibrasyon eğrileri içerisinde düşen düşük, orta ve yüksek derişimlerde 3 adet kalite kontrol çözeltileri “3.3.3. Standart Çözeltilerin Hazırlanması” bölümünde belirtildiği şekilde hazırlandı ve her bir çözeltinin mevcut yöntemle spektrumları alındı (Şekil 4.3. A, 4.3. B ve 4.3. C) ve absorbanları okundu. Kalite kontrol çözeltilerinin gün içi ve günler arası analizleri yapılarak UV-Görünür Bölge Spektroskopi yöntemin doğruluk ve kesinlik parametreleri belirlendi. Gün içi aynı yöntem-laboratuvar koşullarında aynı gün içinde 6 kez ve günler arası aynı yöntem-laboratuvar koşullarında 3 farklı günde 6 kez analizlerinin yapılmasıdır. Bu analizler sonucunda elde edilen verilerin ortalaması, standart sapması, bağıl hata ve bağıl standart sapması değerleri belirlendi. Yöntemin kesinliği bağıl standart sapması (BSS: $SS/ortalama \times 100$) ve doğruluk değeri ise bağıl hata (BH: $(bulunan-eklenen)/eklenen \times 100$) ile verildi (Tablo 4.2).



Şekil 4.3. Kalite kontrol çözeltilerinin UV-Görünür Bölge Spektroskopi spektrumları A) silodosin B) tamsulosin C) solifenasin süksinat

Tablo 4.2. Silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat standart çözeltilerin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik sonuçları (n=6)

Etken Madde	λ (nm)	Kalite Kontrol Çözeltisi ($\mu\text{g/mL}$)	Günüçi			Günler Arası		
			Bulunan Ortalama $\pm$ SS ($\mu\text{g/mL}$)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS	Bulunan Ortalama $\pm$ SS ($\mu\text{g/mL}$)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS
Silodosin	A ₂₂₃	15	14.93 $\pm$ 0.13	-0.42	0.89	14.74 $\pm$ 0.09	-1.70	0.62
		35	33.97 $\pm$ 0.04	-2.92	0.13	33.68 $\pm$ 0.17	-3.76	0.49
		55	51.67 $\pm$ 0.14	-0.61	0.28	51.52 $\pm$ 0.08	0.16	6.32
Tamsulosin	A ₂₂₆	13	13.51 $\pm$ 0.10	3.96	0.76	13.29 $\pm$ 0.27	2.26	2.05
		23	22.78 $\pm$ 0.17	-0.95	0.75	22.43 $\pm$ 0.13	-2.47	0.59
		33	32.94 $\pm$ 0.28	-0.18	0.86	32.79 $\pm$ 0.23	-0.61	0.69
Solifenasin süksinat	A ₂₂₂	15	15.54 $\pm$ 0.68	3.60	4.42	15.50 $\pm$ 0.66	3.38	4.29
		45	45.97 $\pm$ 1.62	2.16	3.53	44.27 $\pm$ 0.25	-1.61	0.57
		75	71.74 $\pm$ 0.38	-4.34	0.52	71.29 $\pm$ 0.18	-4.95	0.26

λ : dalga boyu, SS: Standart sapma (n=6), BH: Bağlı hata, BSS: Bağlı standart sapma

4.1.1.4. Teşhis Limiti (LOD) ve Miktar Tayin Limiti (LOQ)

Silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat standart çözeltilerine ait doğrusal çalışma aralığının en düşük derişiminden daha düşük derişimlerde standart çözeltiler hazırlandı ve mevcut yöntem ile 6 defa analizleri yapıldı. Analiz sonucunda elde edilen verilerin ortalaması, standart sapması ve bağlı standart sapması (%BSS) değerleri belirlendi. %BSS değeri %20.0'den az olan derişim teşhis limitini, %10.0'dan az olan derişim miktar tayin limitini vermektedir.^{154, 155} UV-Görünür Bölge Spektroskopi yönteminin her üç etken maddelerine ait LOD ve LOQ değerleri Tablo 4.3'de verildi.

Tablo 4.3. Silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat standart çözeltilerin teşhis limiti ve miktar tayin limiti değerleri

Etken Madde	Duyarlılık Limiti	
	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
Silodosin	0.30	1.00
Tamsulosin	1.75	5.00
Solifenazin Süksinat	1.75	5.00

4.1.1.5. Analitik Geri Kazanım

“3.3.4. Spektroskopi Yöntemlerinde Farmasötik Preparat Çözeltilerinin Hazırlanması” kısmında anlatıldığı şekilde tamsulosin için 7.0 µg/mL, silodosin ve solifenasin süksinat için 7.5 µg/mL derişimlerde farmasötik preapart çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin mevcut yöntem ile spektrumları alındı absorbansları okundu. Bu çözeltilere her üç etken madde için hazırlanan kalite kontrol çözeltileri (10.0, 40.0 ve 70.0 µg/mL solifenasin süksinat, 10.0, 30.0 ve 50.0 µg/mL silodosin ve 10.0, 20.0 ve 30.0 µg/mL tamsulosin) eklendi. Elde edilen toplam çözeltilerin (final çözelti derişimleri: 17.5, 47.5 ve 77.5 µg/mL solifenasin süksinat, 17.5, 37.5, 57.5 µg/mL silodosin ve 17.0, 27.0, 37.0 tamsulosin) spektrumları alındı ve absorbans değerleri okundu. Elde edilen verilerin ortalaması, standart sapması, bağıl standart sapması ve analitik geri kazanım değerleri hesaplandı. Analitik geri kazanım değerleri [%A.G.K= (Toplam Çözelti Absorbans Değeri-Farmasötik Preparat Absorbans Değeri)/Farmasötik Preparat Absorbans Değeri x 100] formülünden hesaplandı. Elde edilen Analitik Geri Kazanım değerleri Tablo 4.4’de verildi.

Tablo 4.4. UV-Görünür Bölge Spektroskopi Yönteminin analitik eri kazanım değerleri (n=6)

Etken Madde ve Çözelti Derişimi	Eklenen Standart Çözelti (µg/mL)	Ortalama Değer±SS (µg/mL)	%Geri Kazanım	%BSS
Urorec® 7.5 µg/mL	10	7.42±0.27	98.33	3.66
	30	7.47±0.12	99.93	1.67
	50	7.15±0.04	99.34	0.59
Flomax MR® 7 µg/mL	10	7.04±0.09	100.75	1.30
	20	7.28±0.12	101.25	1.65
	30	6.91±0.26	100.48	3.81
Kinzy® 7.5 µg/mL	10	7.84±0.29	101.73	3.76
	40	8.29±0.25	101.80	3.04
	70	6.16±0.38	98.08	6.26

BSS: Bağlı Standart Sapma, SS: Standart sapma

4.2. Birinci Derece-Türev (1D-Türev) ve İkinci Derece-Türev (2D-Türev)

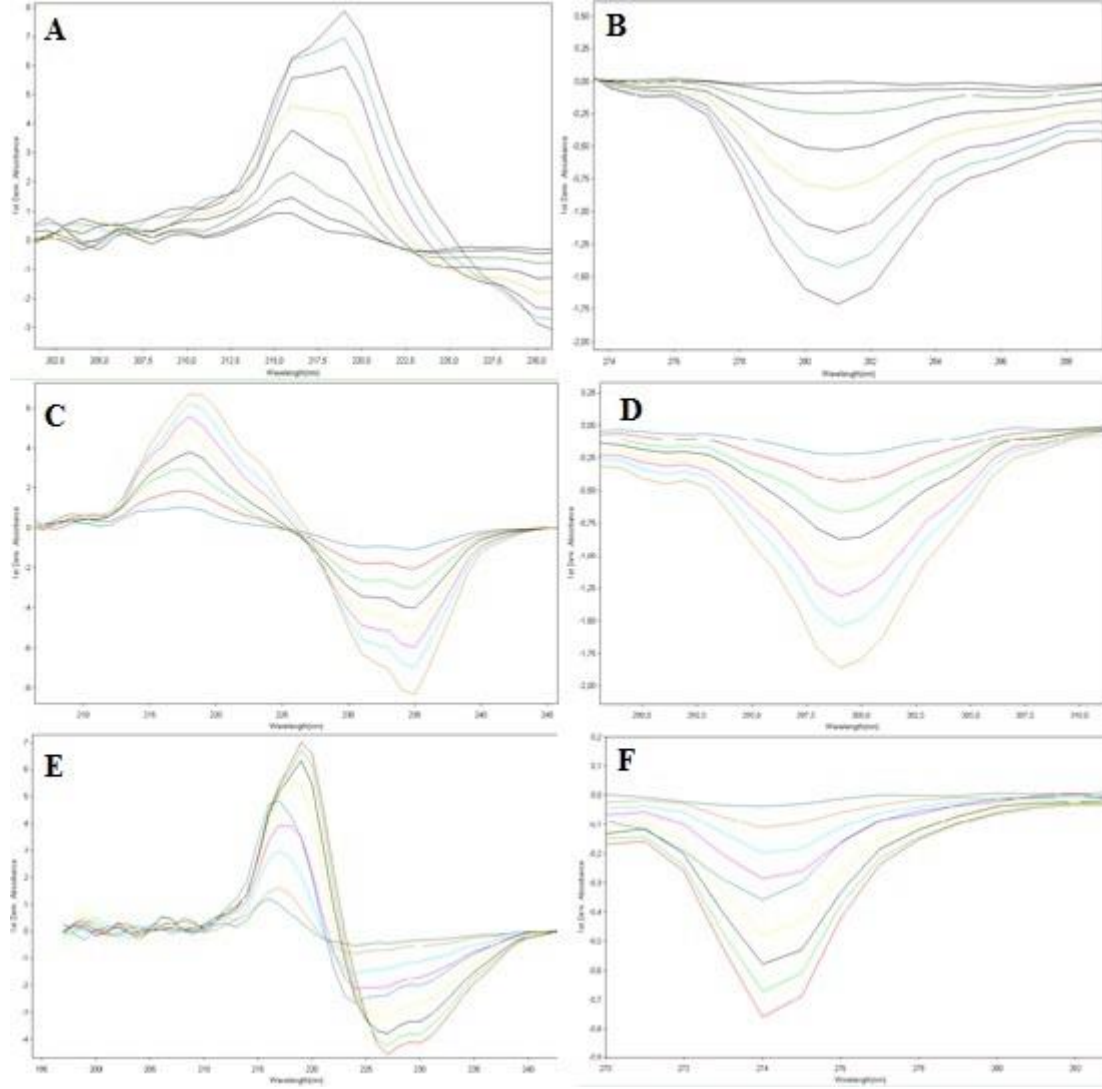
Spektroskopi Yöntemleri

4.2.1. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)

4.2.1.1. Özgünlük (Belirleyicilik)

Silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat etken maddelerinin stok, standart çalışma çözeltileri ve kalite kontrol çözeltileri “3.3.3. Standart Çözeltilerin Hazırlanması” kısmında belirtildiği şekilde hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerin 190-800 nm dalga boyu aralığında taraması yapıldı, 1D-Türev ve 2D-Türev spektrumları elde edildi. Elde edilen türev spektrumlarında: Silodosinin 1D-Türev spektrumunda 218 nm dalga boyunda bir maksimum ve 281 nm dalga boyunda bir minimum pik gözlemlendi (Şekil 4.4. A ve 4.4. B). Tamsulosin’in 1D-Türev spektrumunda 218 nm’de bir maksimum, 235 ve 299 nm’de iki minimum pik gözlemlendi (Şekil 4.4. C ve 4.4. D). Solifenasin süksinatın 1D-

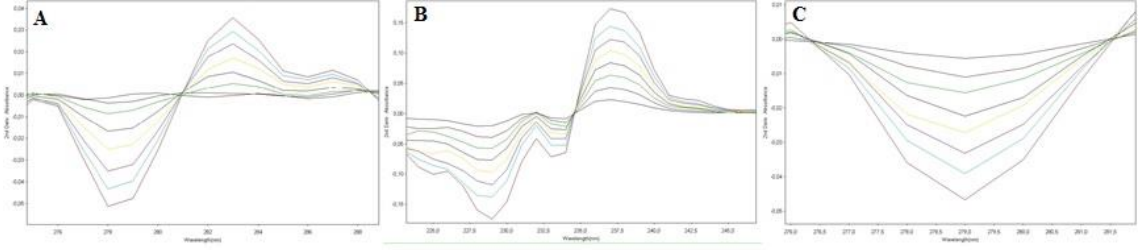
Türev spektrumunda ise 219 nm dalga boyunda bir maksimum ve 228 ve 274 nm dalga boyunda iki minimum pik gözlemlendi (Şekil 4.4. E ve 4.4. F).



Şekil 4.4. 1D-Türev Spektroskopi spektrumları, silodosin için A) 218 nm ve B) 281 nm; tamsulosin için C) 218 nm, 235 nm ve D) 281 nm; solifenasin süksinat için E) 219 nm , 228 nm ve F) 274 nm

Silodosinin 2D-Türev spektrumunda 278 nm’de bir minimum, 283 nm’de bir maksimum pik gözlemlendi (Şekil 4.5. A). Tamsulosin’in 2D-Türev spektrumunda 229 nm ve 279 nm dalga boyunda iki minimum pik, 237 nm dalga boyunda bir maksimum pik

gözlendi (Şekil 4.5. B ve 4.5. C). Solifenasin süksinatın 2D-Türev spektrumunda ise uygun doğruluk ve kesinlikle ölçülebilecek herhangi bir pik gözlenmedi.



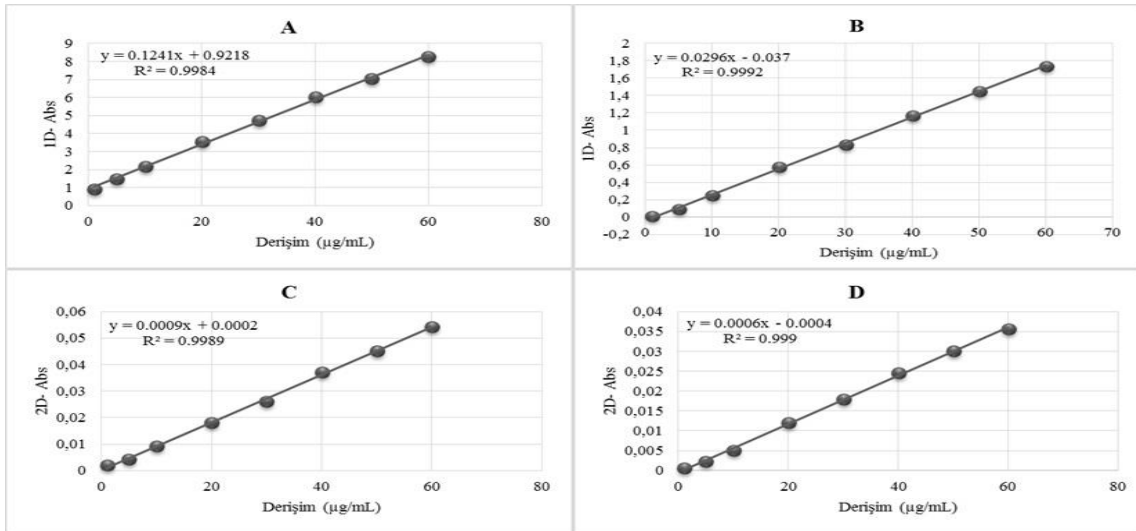
Şekil 4.5 2D-Türev Spektroskopi spektrumları, silodosin için A) 278nm ve 283 nm, tamsulosin için B) 229 nm, 237 nm ve C) 279 nm

4.2.1.2. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı

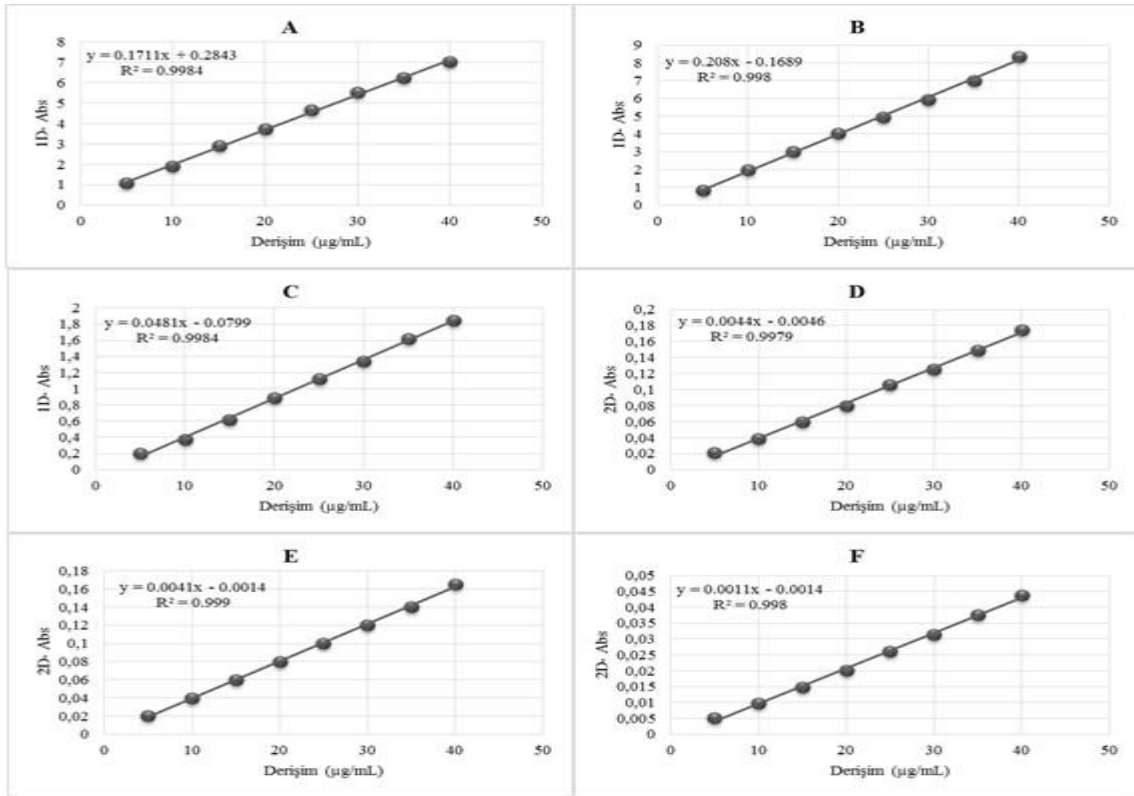
Silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinatın “3.3.3. Standart Çözeltilerin Hazırlanması” bölümünde belirtildiği şekilde %1.0 TFA içeren deiyonize su ile herbir etken madde için 0.25-150.0 µg/mL derişimleri arasında bir seri standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Her bir çözeltinin 1D-Türev ve 2D-Türev spektrumları alındı silodosin çözeltisi için 1D-Türev spektrumundaki 218 nm ve 281 nm dalga boylarında ve 2D-Türev spektrumunda 278 nm ve 283 nm dalga boylarında absorbans değerleri okundu. Çözeltilerin derişimlerine karşı okunan absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri türetildi (Şekil 4.6. A, 4.6. B, 4.6. C ve 4.6. D). Tamsulosin çözeltisi için 1D-Türev spektrumundaki 218 nm, 235 nm ve 299 nm dalga boylarında, 2D-Türev spektrumundaki 229 nm, 237 nm ve 279 nm dalga boylarında absorbans değerleri okundu. Çözeltilerin derişimlerine karşı okunan absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri türetildi (Şekil 4.7. A, 4.7. B, 4.7. C, 4.7. D, 4.7. E ve 4.7. F). Solifenasin süksinat çözeltileri için 1D-Türev spektrumunda ise 219 nm, 228 nm ve 274 nm dalga boylarında absorbans değerleri okundu. Çözelti derişimlerine karşı okunan

absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edildi (Şekil 4.8 A, 4.8 B ve 4.8 C).

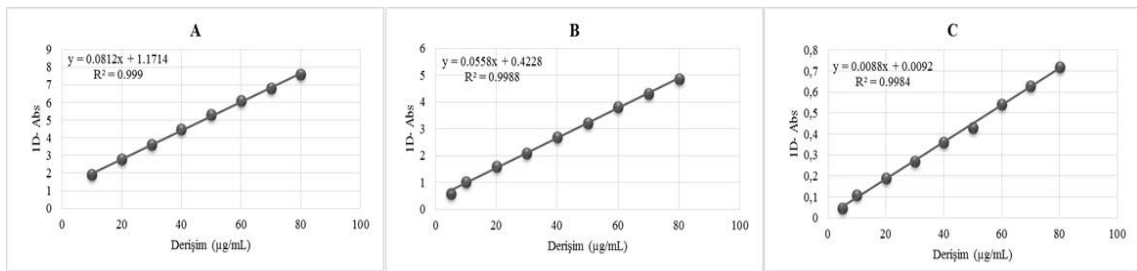
Kalibrasyon eğrilerinin sapma göstermediği doğrusal çalışma aralığı belirlemek için çok sayıda standart çalışma çözeltileri hazırlandı, spektrumları alındı belirlenen dalga boylarında absorbans değerleri okundu ve çözelti derişimlerine karşı okunan absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri türetildi. Kalibrasyon eğrisinin doğrusal olduğu ve sapma göstermediği derişim aralığı tespit edildi. Kalibrasyon eğrilerinin türetildiği standart çalışma çözeltilerinin derişimleri: silodosin için 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0 ve 60.0 µg/mL, tamsulosin için 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, 35.0 ve 40.0 µg/mL ve solifenasin süksinat için 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0, 60.0, 70.0 ve 80.0 µg/mL derişimlerdir.



Şekil 4.6. 1D-Türev ve 2D-Türev Spektroskopi yöntemi ile elde edilen silodosin standart çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrileri: A) 1D- 218 nm, B) 1D- 281 nm, C) 2D- 278 nm, D) 2D- 283 nm



Şekil 4.7. 1D-Türev ve 2D-Türev Spektroskopi yöntemi ile elde edilen tamsulosin standart çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrileri: A) 1D- 218 nm, B) 1D- 235 nm, C) 1D- 299 nm, D) 2D- 229 nm, E) 2D- 237 nm, F) 2D- 279 nm



Şekil 4.8. 1D-Türev Spektroskopi yöntemi ile elde edilen solifenasin süksinat standart çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrileri: A) 219 nm B) 228 nm C) 274 nm

1D-Türev ve 2D-Türev Spektroskopi yöntemleriyle elde edilen kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.5 ve 4.6'da verildi.

Tablo 4.5. Silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat standart çalışma çözeltilerinin 1D-Türev Spektroskopi yöntem ile elde edilen kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz sonuçları

Etken Madde	DA (µg/mL)	Regresyon Denklemi ^a	Sa	Sb	r
Silodosin	1-60	$1D_{218nm} = 0.1241x + 0.9218$	0.0002	0.0001	0.9984
	1-60	$1D_{281nm} = 0.0296x - 0.037$	0.001	0.0004	0.9992
Tamsulosin	5-40	$1D_{218nm} = 0.1711x + 0.2843$	0.0003	0.004	0.9984
	5-40	$1D_{235nm} = 0.208x - 0.1689$	0.00004	0.0002	0.998
	5-40	$1D_{299nm} = 0.0481x - 0.0799$	0.0005	0.0003	0.9984
Solifenasin süksinat	5-80	$1D_{219nm} = 0.0812x + 1.1714$	0.0007	0.0027	0.999
	5-80	$1D_{228nm} = 0.0558x + 0.4228$	0.0004	0.0006	0.9988
	5-80	$1D_{274nm} = 0.0088x + 0.0092$	0.0002	0.0008	0.9984

DA: Doğrusal aralık, a:6 kalibrasyon eğrisi, Sa: kaymanın standart sapması Sb: eğimin standart sapması, r: korelasyon katsayısı

Tablo 4.6. Silodosin ve tamsulosin standart çalışma çözeltilerinin 2D-Türev Spektroskopi yöntem ile elde edilen kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz sonuçları

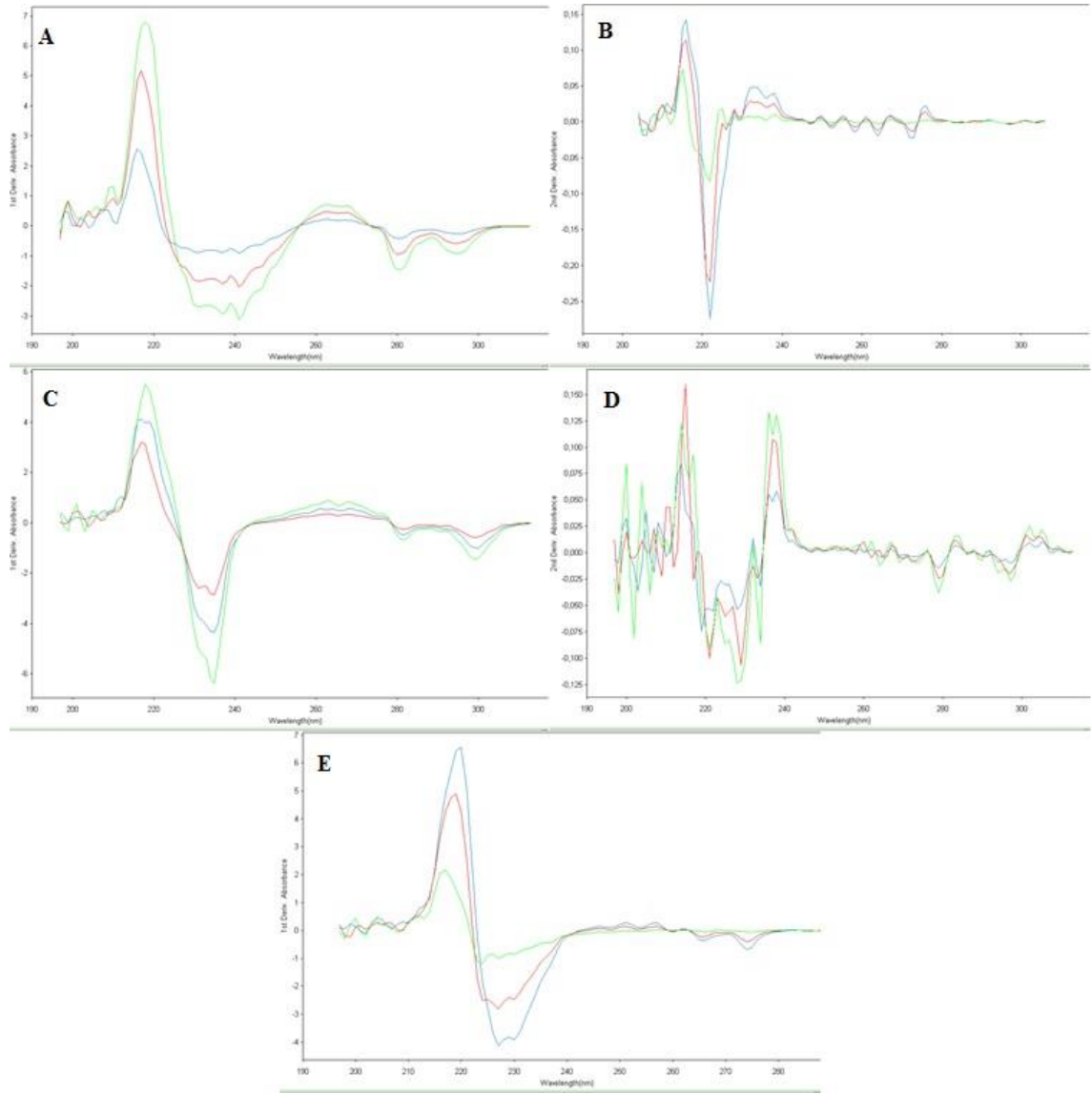
Etken Madde	DA (µg/mL)	Regresyon Denklemi ^a	Sa	Sb	r
Silodosin	1-60	$2D_{278nm} = 0.0009x + 0.0002$	0.0003	0.0017	0.9989
	1-60	$2D_{283nm} = 0.0006x - 0.0004$	0.0006	0.0007	0.9990
Tamsulosin	5-40	$2D_{229nm} = 0.0044x - 0.0046$	0.0008	0.0014	0.9979
	5-40	$2D_{237nm} = 0.0041x - 0.0014$	0.00002	0.0002	0.9990
	5-40	$2D_{279nm} = 0.0011x - 0.0014$	0.0007	0.0005	0.9980

DA: doğrusal aralık, a:6 kalibrasyon eğrisi, Sa: kaymanın standart sapması Sb: eğimin standart sapması, r: korelasyon katsayısı

4.2.1.3. Doğruluk/Kesinlik

Silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat çözeltileri için elde edilen kalibrasyon eğrileri içerisine düşen düşük, orta ve yüksek derişimlerde 3 adet kalite

kontrol çözeltileri “3.3.3. Standart Çözeltilerin Hazırlanması” kısmında belirtildiği şekilde hazırlandı ve her bir çözeltinin 1D-Türev ve 2D-Türev spektroskopi yöntemleri ile spektrumları alındı (Şekil 4.9. A, 4.9. B, 4.9. C, 4.9. D, 4.9. E) ve önceden belirlenen dalga boylarında absorbans değerleri okundu. Kalite kontrol çözeltilerinin gün içi ve günler arası analizleri yapılarak 1D-Türev ve 2D-Türev Spektroskopi yöntemlerinin doğruluk ve kesinlik parametreleri belirlendi. Güniçi aynı yöntem-laboratuvar koşullarında aynı gün içinde 6 kez ve günler arası aynı yöntem-laboratuvar koşullarında 3 farklı günde 6 kez analizlerinin yapılmasıdır. Bu analizler sonucunda elde edilen değerlerin ortalaması, standart sapması, bağıl standart sapması ve bağıl hatası değerleri hesaplandı. Yöntemin kesinliği bağıl standart sapması ($BSS: SS/ortalama \times 100$) ve doğruluk değeri ise bağıl hata ($BH: (bulunan-eklenen)/eklenen \times 100$) ile verildi (Tablo 4.7 ve Tablo 4.8).



Şekil 4.9. Kalite kontrol çözeltilerinin 1D-Türev ve 2D-Türev spektrumları A) Silodosin, 1D-, B) silodosin, 2D-, C) tamsulosin, 1D-, D) tamsulosin, 2D- E) solifenasin süksinat, 1D-

Tablo 4.7. 1D-Türev Spektroskopi yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik sonuçları (n=6)

Etken Madde	λ (nm)	Kalite	Günüçi			Günler Arası		
		Kontrol Çözeltilisi ($\mu\text{g/mL}$)	Ortalama $\pm$ SS ($\mu\text{g/mL}$)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS	Ortalama $\pm$ SS ($\mu\text{g/mL}$)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS
Silodosin	1D ₂₁₈	15	14.75 $\pm$ 0.05	-1.63	0.36	14.81 $\pm$ 0.09	-1.23	0.11
		35	35.20 $\pm$ 0.02	0.59	0.07	35.18 $\pm$ 0.03	0.54	0.01
		55	55.44 $\pm$ 0.42	0.81	0.76	55.52 $\pm$ 0.60	0.96	1.10
	1D ₂₈₁	15	15.17 $\pm$ 0.15	1.19	1.04	15.01 $\pm$ 0.05	0.08	0.34
		35	35.12 $\pm$ 0.47	0.35	1.36	35.42 $\pm$ 1.09	1.22	3.10
		55	56.09 $\pm$ 0.36	1.98	0.65	56.09 $\pm$ 0.45	2.00	0.81
Tamsulosin	1D ₂₁₈	13	13.07 $\pm$ 0.39	0.58	3.04	13.18 $\pm$ 0.21	1.44	1.58
		23	23.27 $\pm$ 0.03	1.19	0.14	23.05 $\pm$ 0.09	0.24	0.42
		33	33.00 $\pm$ 0.20	0.01	0.62	33.15 $\pm$ 0.22	0.46	0.67
	1D ₂₃₅	13	12.97 $\pm$ 0.09	-0.16	0.75	12.92 $\pm$ 0.03	-0.62	0.26
		23	23.27 $\pm$ 0.04	1.19	0.17	23.03 $\pm$ 0.22	0.14	0.95
		33	33.04 $\pm$ 0.28	0.13	0.86	33.01 $\pm$ 0.22	0.04	0.67
	1D ₂₉₉	13	13.06 $\pm$ 0.35	0.47	2.73	13.45 $\pm$ 0.29	3.49	2.16
		23	23.00 $\pm$ 0.05	0.02	0.24	22.92 $\pm$ 0.13	-0.33	0.59
		33	32.99 $\pm$ 0.09	-0.02	0.28	33.11 $\pm$ 0.14	0.33	0.44
Solifenasin süksinat	1D ₂₁₉	15	15.24 $\pm$ 1.17	1.64	7.71	15.01 $\pm$ 0.70	0.05	4.69
		45	46.63 $\pm$ 0.52	1.42	1.13	45.93 $\pm$ 0.18	2.06	0.41
		75	75.34 $\pm$ 0.78	0.47	1.04	75.07 $\pm$ 0.93	0.09	1.24
	1D ₂₂₈	15	15.24 $\pm$ 0.64	1.62	4.20	15.12 $\pm$ 1.15	0.86	7.59
		45	46.44 $\pm$ 0.15	3.21	0.33	45.80 $\pm$ 0.52	1.78	1.13
		75	76.32 $\pm$ 0.10	1.76	0.13	75.93 $\pm$ 0.51	1.25	0.68
	1D ₂₇₄	15	15.07 $\pm$ 0.76	0.49	5.06	14.75 $\pm$ 0.19	-1.67	1.33
		45	45.39 $\pm$ 0.65	0.89	1.44	45.16 $\pm$ 0.90	0.37	2.00
		75	75.39 $\pm$ 0.63	0.53	0.84	75.46 $\pm$ 0.56	0.61	0.75

λ : dalga boyu, SS: standart sapma (n=6), BH: Bağlı hata, BSS: bağlı standart sapma

Tablo 4.8. 2D-Türev Spektroskopi yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik sonuçları (n=6)

Etken Madde	λ (nm)	Kalite	Günüçi			Günler Arası		
		Kontrol Çözeltisi ($\mu\text{g/mL}$)	Ortalama $\pm$ SS ($\mu\text{g/mL}$)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS	Ortalama $\pm$ SS ($\mu\text{g/mL}$)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS
Silodosin	2D ₂₇₈	15	14.89 $\pm$ 0.18	-0.70	1.26	15.19 $\pm$ 0.90	1.28	5.94
		35	34.47 $\pm$ 0.64	-1.49	1.86	35.58 $\pm$ 0.63	1.65	1.79
		55	55.07 $\pm$ 0.72	0.13	1.32	55.29 $\pm$ 0.19	0.53	0.36
	2D ₂₈₃	15	15.61 $\pm$ 0.70	4.09	4.51	14.75 $\pm$ 0.34	-1.66	2.32
		35	35.26 $\pm$ 0.96	0.77	2.73	36.67 $\pm$ 0.28	-0.92	0.81
		55	54.77 $\pm$ 1.03	-0.41	1.88	55.68 $\pm$ 0.59	1.24	1.07
Tamsulosin	2D ₂₂₉	13	13.14 $\pm$ 0.20	1.13	1.54	13.09 $\pm$ 0.04	0.75	0.36
		23	23.28 $\pm$ 0.34	1.24	1.46	22.62 $\pm$ 0.38	-1.61	1.68
		33	33.01 $\pm$ 0.52	0.04	1.60	33.05 $\pm$ 0.47	0.17	1.43
	2D ₂₃₇	13	13.07 $\pm$ 0.35	0.59	2.72	13.27 $\pm$ 0.34	2.09	2.61
		23	23.05 $\pm$ 0.12	0.24	0.53	23.04 $\pm$ 0.15	0.17	0.68
		33	33.06 $\pm$ 0.22	0.19	0.68	33.04 $\pm$ 0.20	0.13	0.63
	2D ₂₇₉	13	13.13 $\pm$ 0.39	1.01	3.00	13.32 $\pm$ 0.14	2.45	1.06
		23	22.87 $\pm$ 0.11	-0.53	0.47	22.82 $\pm$ 0.71	-0.79	3.11
		33	33.04 $\pm$ 0.29	0.14	0.90	33.06 $\pm$ 0.47	0.17	1.43

λ : dalga boyu, SS: standart sapma (n=6), BH: Yüzde bağıl hata, BSS: bağıl standart sapma

4.2.1.4. Teşhis limiti (LOD) ve Miktar tayin limiti (LOQ)

Silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat standart çözeltilerine ait doğrusal çalışma aralığının en düşük derişiminden daha düşük derişimlerde bir seri standart çalışma çözeltiler hazırlandı ve mevcut yöntemler ile 6 defa analizleri yapıldı. Analiz sonucunda elde edilen değerlerin ortalaması, standart sapması ve bağıl standart sapması (%BSS) değerleri elde edildi. %BSS değerleri %20.0'den az olan derişimler teşhis limiti ve %10.0'dan az olan derişimler ise miktar tayin limitini vermektedir.^{154, 155} 1D-Türev ve 2D-Türev Spektroskopi yöntemlerinin silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat maddelerine ait LOD ve LOQ değerleri Tablo 4.9 ve Tablo 4.10'da verildi.

Tablo 4.9. 1D-Türev Spektroskopi yönteminin silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat standart çözeltilerine ait teşhis limiti ve miktar tayin limiti değerleri

Etken Madde	λ (nm)	Duyarlılık Limiti	
		LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
Silodosin	1D ₂₁₈	0.30	1.00
	1D ₂₈₁	0.30	1.00
Tamsulosin	1D ₂₁₈	1.75	5.00
	1D ₂₃₅	1.75	5.00
	1D ₂₉₉	1.75	5.00
Solifenasin Süksinat	1D ₂₁₉	1.75	5.00
	1D ₂₂₈	1.75	5.00
	1D ₂₇₄	1.75	5.00

λ : dalga boyu

Tablo 4.10. 2D-Türev Spektroskopi yönteminin silodosin ve tamsulosin standart çözeltilerine ait teşhis limiti ve miktar tayin limiti değerleri

Etken Madde	λ (nm)	Duyarlılık Limiti	
		LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
Silodosin	2D ₂₇₈	0.50	1.00
	2D ₂₈₃	0.50	1.00
Tamsulosin	2D ₂₂₉	1.75	5.00
	2D ₂₃₇	1.75	5.00
	2D ₂₇₉	1.75	5.00

λ : dalga boyu

4.2.1.5. Analitik Geri Kazanım

"3.3.4. Spektroskopi Yöntemlerinde Farmasötik Preparat Çözeltilerinin Hazırlanması" kısmında anlatıldığı şekilde tamsulosin için 7.0 $\mu\text{g/mL}$, silodosin ve solifenasin süksinat için 7.5 $\mu\text{g/mL}$ derişimlerde farmasötik preparat çözeltileri

hazırlandı. Bu çözeltilerin 1D-Türev ve 2D-Türev Spektroskopi yöntemlerle spektrumları alındı absorbans değerleri okundu. Daha sonra bu çözeltilere her üç etken madde için hazırlanan kalite kontrol çözeltileri (10.0, 40.0 ve 70.0 µg/mL solifenasin süksinat, 10.0, 30.0 ve 50.0 µg/mL silodosin ve 10.0, 20.0 ve 30.0 µg/mL tamsulosin) eklendi. Elde edilen toplam çözeltilerin (final çözelti derişimleri: 17.5, 47.5 ve 77.5 µg/mL solifenasin süksinat, 17.5, 37.5, 57.5 µg/mL silodosin ve 17.0, 27.0, 37.0 tamsulosin) mevcut yöntemlerle spektrumları alındı ve absorbans değerleri okundu. Elde edilen verilerin ortalaması, standart sapması, bağıl standart sapması ve analitik geri kazanım değerleri hesaplandı. Analitik geri kazanım değerleri [%A.G.K= (Toplam Çözelti Absorbans Değeri-Farmasötik Preparat Absorbans Değeri)/Farmasötik Preparat Absorbans Değeri x 100] formülünden hesaplandı. Elde edilen Analitik Geri Kazanım değerleri Tablo 4.11 ve Tablo 4.12’de verildi.

Tablo 4.11. Farmasötik preparatlarda 1D-Türev Spektroskopi yönteminin analitik geri kazanım değerleri (n=6)

Etken Madde	λ (nm)	Kalite		Geri Kazanım (%)	BSS (%)
		Kontrol Çözeltisi ($\mu\text{g/mL}$)	Ortalama $\pm$ SS ($\mu\text{g/mL}$)		
Urorec[®] 7.5 $\mu\text{g/mL}$	1D ₂₁₈	10	7.50 $\pm$ 0.22	100.11	2.96
		30	7.42 $\pm$ 0.29	99.48	3.95
		50	6.86 $\pm$ 0.53	98.86	7.73
	1D ₂₈₁	10	7.30 $\pm$ 0.27	99.15	3.79
		30	7.79 $\pm$ 0.39	100.5	5.06
		50	7.09 $\pm$ 0.51	98.66	7.28
Flomax MR[®] 7 $\mu\text{g/mL}$	1D ₂₁₈	10	7.07 $\pm$ 0.15	100.75	2.12
		20	6.98 $\pm$ 0.08	100.52	1.25
		30	7.19 $\pm$ 0.33	101.00	4.62
	1D ₂₃₅	10	7.13 $\pm$ 0.11	101.73	1.59
		20	7.06 $\pm$ 0.31	100.08	4.37
		30	6.99 $\pm$ 0.20	99.85	2.82
	1D ₂₉₉	10	6.99 $\pm$ 0.26	99.71	3.70
		20	7.09 $\pm$ 0.18	100.46	2.60
		30	7.19 $\pm$ 0.28	100.86	3.93
Kinzy[®] 7.5 $\mu\text{g/mL}$	1D ₂₁₉	10	7.32 $\pm$ 0.18	98.88	2.55
		40	7.35 $\pm$ 0.25	99.85	3.42
		70	7.31 $\pm$ 0.29	100.53	4.06
	1D ₂₂₈	10	7.45 $\pm$ 0.05	99.75	0.70
		40	7.54 $\pm$ 0.33	100.18	4.42
		70	7.37 $\pm$ 0.23	99.89	3.12
	1D ₂₇₄	10	7.50 $\pm$ 0.44	99.84	5.93
		40	7.30 $\pm$ 0.28	99.70	3.94
		70	7.61 $\pm$ 0.14	99.96	1.83

λ : dalga boyu, BSS: bağıl standart sapma, SS: standart sapma

Tablo 4.12. Farmasötik preparatlarda 2D-Türev Spektroskopi yönteminin analitik geri kazanım değerleri (n=6)

Etken Madde	λ (nm)	Kalite		Geri Kazanım (%)	BSS (%)
		Kontrol Çözeltisi ($\mu\text{g/mL}$)	Ortalama $\pm$ SS ($\mu\text{g/mL}$)		
Urorec® 7.5 $\mu\text{g/mL}$	2D ₂₇₈	10	7.68 $\pm$ 0.42	101.40	5.44
		30	7.80 $\pm$ 0.61	100.64	7.81
		50	7.36 $\pm$ 0.41	99.66	5.54
	2D ₂₈₃	10	7.40 $\pm$ 0.35	99.79	4.80
		30	7.32 $\pm$ 0.49	99.83	6.70
		50	7.73 $\pm$ 0.52	100.96	6.83
Flomax MR® 7 $\mu\text{g/mL}$	2D ₂₂₉	10	7.34 $\pm$ 0.38	101.93	5.24
		20	7.13 $\pm$ 0.39	100.48	5.47
		30	6.99 $\pm$ 0.37	99.93	5.32
	2D ₂₃₇	10	7.17 $\pm$ 0.13	101.41	1.84
		20	7.25 $\pm$ 0.05	100.83	0.73
		30	7.47 $\pm$ 0.48	100.78	6.48
	2D ₂₇₉	10	6.93 $\pm$ 0.40	99.11	5.86
		20	7.04 $\pm$ 0.10	100.26	1.46
		30	6.95 $\pm$ 0.20	100.33	2.99

λ : dalga boyu, BSS: bağıl standart sapma, SS: Standart sapma

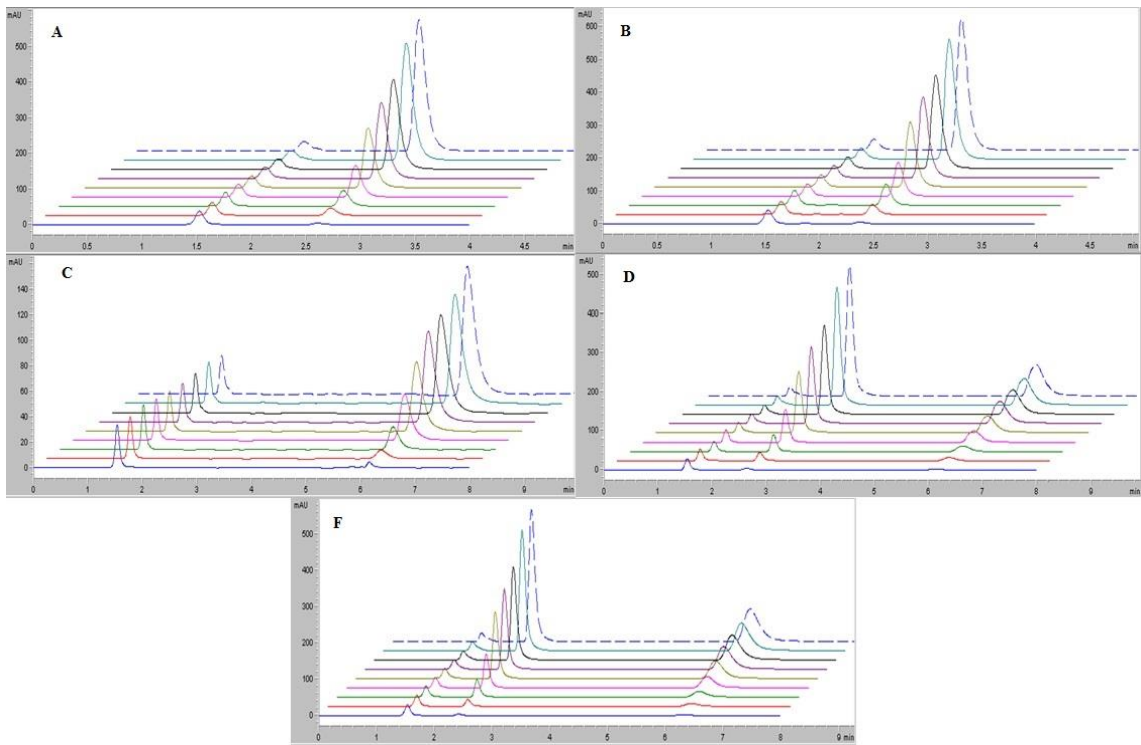
4.3. Kromatografik Yöntemler

4.3.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)

4.3.1.1. Özgünlük (Belirleyicilik)

“3.3.4.1. HPLC Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması” bölümünde verildiği şekilde silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat standart çalışma çözeltileri hazırlandı. HPLC sistemine enjekte edilerek kromatogramları alındı. Kromatogramlardan

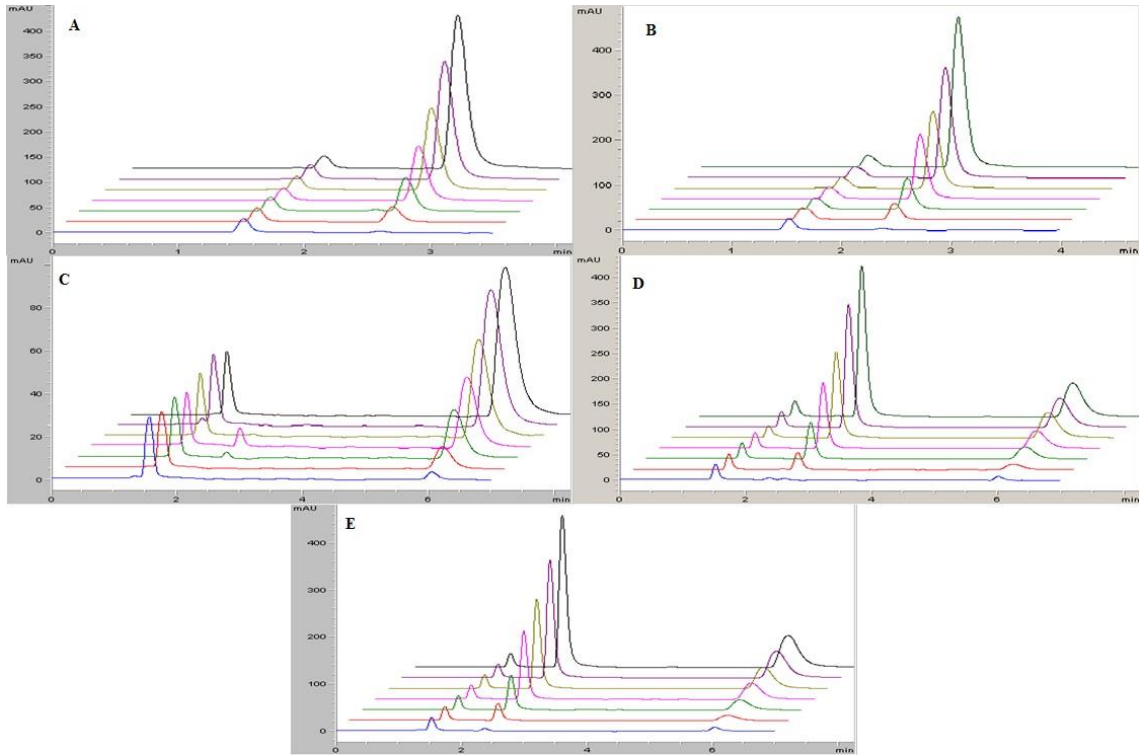
silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat alıkonma zamanları sırasıyla 2.61 dk, 2.33 dk ve 6.09 dk olarak belirlendi. HPLC çalışmasında zolmitriptan iç standart (IS) olarak kullanıldı. IS'ın (zolmitriptan) alıkonma zamanı ise 1.52 dk. olarak belirlendi. Ayrıca silodosin-solifenasin süksinat ve tamsulosin-solifenasin süksinat karışım çözeltileri hazırlandı ve bu çözeltilerin HPLC kromatogramları da alındı (Şekil 4.10. A, 4. 10. B, 4.10. C, 4.10. D, 4.10. E ve 4.10. F).



Şekil 4.10. Standart çalışma çözeltilerinin HPLC kromatogramları A) silodosin B) tamsulosin, C) solifenasin süksinat D) silodosin-solifenasin süksinat E) tamsulosin-solifenasin süksinat

Plazma çalışmaları “3.3.4.3. Silodosin, Tamsulosin ve Solifenasin Süksinatın Plazmadan Ekstraksiyon” bölümünde anlatıldığı şekilde plazma çalışma çözeltileri elde edildi ve HPLC sistemine enjekte edilerek kromatogramları alındı. Elde edilen kromatogramlardan silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat alıkonma süreleri sırasıyla 2.61 dk, 2.33 dk ve 6.09 dk ve iç standart olarak kullanılan zolmitriptanın

alınma süresi 1.52 dk olarak belirlendi (Şekil 4.11. A, 4.11. B, 4.11. C, 4.11 D ve 4.11. E).

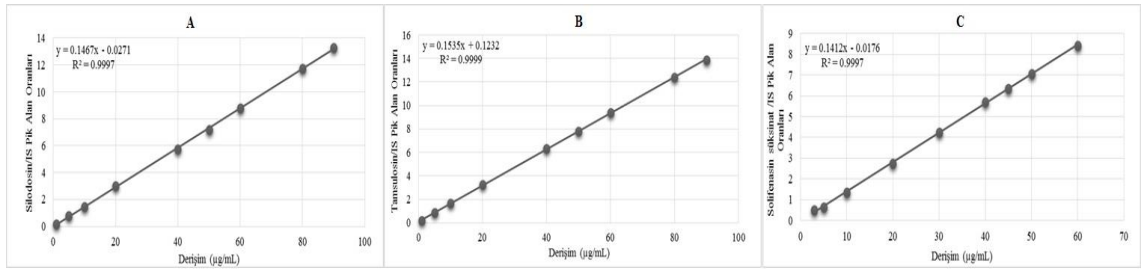


Şekil 4.11. Plazma çözeltilerinin HPLC kromatogramları A) silodosin B) tamsulosin, C) solifenasin süksinat D) silodosin-solifenasin süksinat E) tamsulosin-solifenasin süksinat

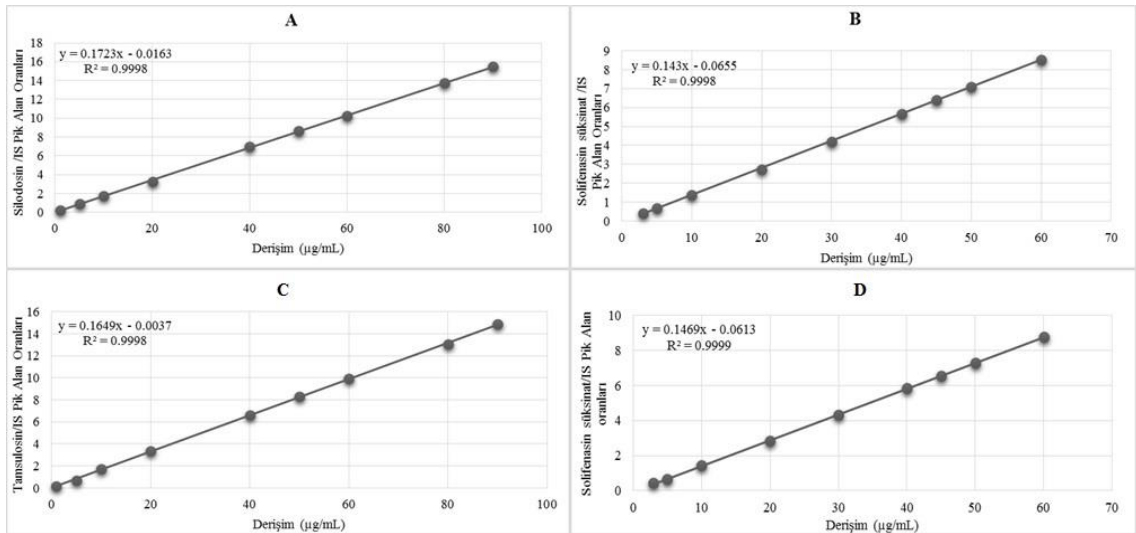
4.3.1.2. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı

“3.3.4.1. HPLC Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması” bölümünde anlatıldığı şekilde silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat standart çalışma çözeltileri hazırlandı. HPLC sistemine enjekte edildi ve kromatogramları alındı. Pik alanları ve IS (zolimtripan) pik alanı tespit edildi. Silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat derişimlerine karşı pik alan oranları (silodosin pik alanı/IS pik alanı; tamsulosin pik alanı/IS pik alanı ve solifenasin süksinat pik alanı/IS pik alanı) grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edildi. Kalibrasyon eğrileri çizilerek her bir etken madde için doğrusal çalışma aralıkları tespit edildi. Solifenasin süksinat için 3.0-60.0 µg/mL arasındaki çözeltilerde doğrusallık gözlenirken 70.0 µg/mL’lik standart çözeltiden sonra kalibrasyon eğrisinde doğrusallıktan sapma gözlemlendi. Aynı işlem silodosin ve tamsulosin

için yapıldığında 1.0-90.0 µg/mL standart çözeltileri 0.999 korelasyon katsayısına sahip bir kalibrasyon grafiğine sahipken, 100.0 µg/mL’lik standart çözeltiden sonra doğrusallıktan sapma gözlemlendi. Aynı işlem silodosin+solifenasin süksinat (1.0-90.0 + 3.0-60.0 µg/mL) ve tamsulosin+solifenasin süksinat (1.0-90.0 + 3.0-60.0 µg/mL) standart çalışma çözeltileri için de uygulandı (Şekil 4.12. A, 4.12. B, 4.12. C, Şekil 4.13. A, 4.13. B, Şekil 4.13. C ve 4.13 D). HPLC yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.13’de verildi.



Şekil 4.12. Standart çalışma çözeltilerinin HPLC yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrileri A) silodosin, B) tamsulosin, C) solifenasin süksinat



Şekil 4.13. Karışım halindeki çözeltilerin HPLC yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrileri: 1- silodosin (A)+ solifenasin süksinat (B) ve 2- tamsulosin (C)+ solifenasin süksinat (D)

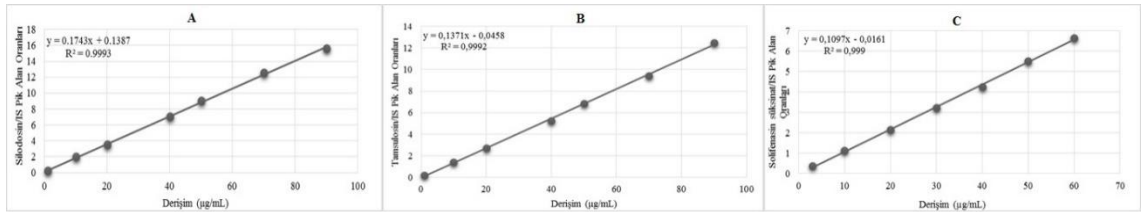
Tablo 4.13. HPLC yönteminin silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat standart çalışma çözeltilerine ait kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz sonuçları

Etken Madde	DA (µg/mL)	λ (nm)	Regresyon Denklemi^a	Sa	Sb	r
Silodosin	1-90	210	$y = 0.1467x - 0.0271$	0.0042	0.0061	0.9998
Tamsulosin	1-90	210	$y = 0.1535x + 0.1232$	0.00031	0.0009	0.9999
Solifenasin Süksinat	3-60	210	$y = 0.1412x - 0.0176$	0.00043	0.0007	0.9998
Silodosin / Solifenasin süksinat	1-90	210	$y = 0.1723x - 0.0163$	0.0007	0.0015	0.9998
	3-60	210	$y = 0.143x - 0.0655$	0.0025	0.0018	0.9998
Tamsulosin/ solifenasin süksinat	1-90	210	$y = 0.1649x - 0.0037$	0.0008	0.0037	0.9998
	3-60	210	$y = 0.1469x - 0.0613$	0.0012	0.0022	0.9999

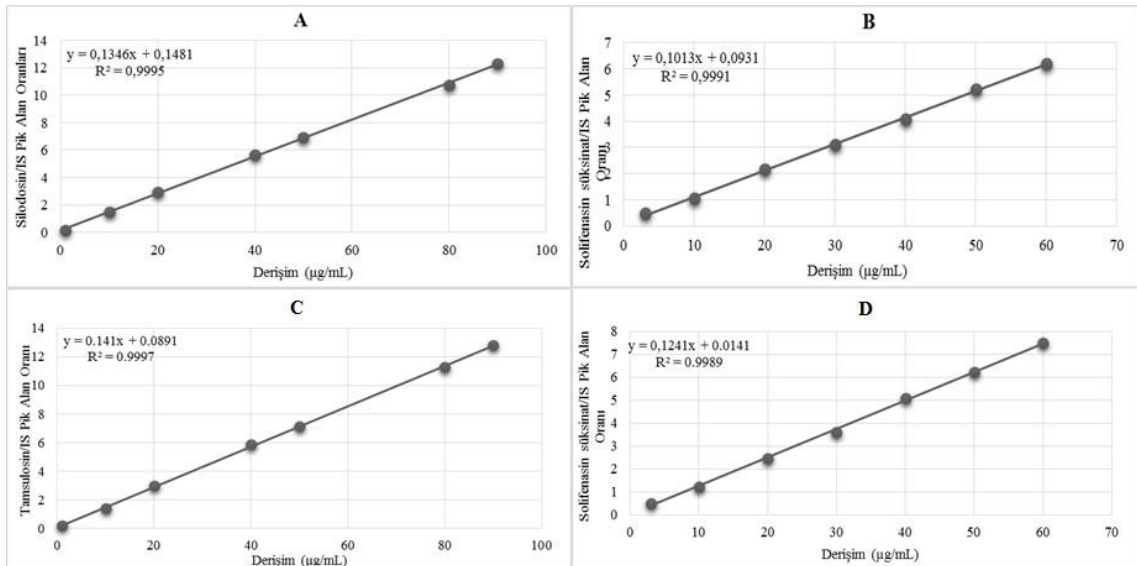
DA: doğrusal aralık, a:6 kalibrasyon eğrisi, Sa: kaymanın standart sapması Sb: eğimin standart sapması, r: korelasyon katsayısı, x: derişim, y: pik alanları oranı

Plazmaya spike edilip ve plazmadan “3.3.4.3. Silodosin, Tamsulosin ve Solifenasin Süksinatın Plazmadan Ekstraksiyon” bölümünde belirtildiği şekilde silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat plazma çalışma çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltiler HPLC sistemine enjekte edilerek kromatogramları elde edildi ve kromatogramlardan her bir etken maddenin pik alanları ile IS olarak kullanılan zolmitriptan pik alanı da tespit edildi. Silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat plazma çözelti derişimlerine karşı pik alan oranları (silodosintamsulosin pik alanı/IS pik alanı ve solifenasin süksinat pik alanı/IS pik alanı) grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edildi. Kalibrasyon eğrileri türetilerek her üç etken madde için doğrusal çalışma aralığı ayrı ayrı belirlendi. Solifenasin için 3.0-60.0 µg/mL arasındaki çözeltilerde doğrusallık gözlenirken 70.0 µg/mL’lik standart çözeltiden sonra kalibrasyon grafiğinde doğrusallıktan sapma gözlemlendi. Aynı işlem silodosin ve tamsulosin için yapıldığında 1.0-

90.0 µg/mL standart çözeltileri 0.999 korelasyon katsayısına sahip bir kalibrasyon grafiğine sahipken, 100.0 µg/mL’lik standart çözeltiden sonra doğrusallıktan sapma gözlemlendi. Aynı işlemler solifenasin süksinat + silodosin (3.0-60.0 + 1.0-90.0 µg/mL) ve solifenasin süksinat + tamsulosin (3.0-60.0 + 1.0-90.0 µg/mL) karışım halindeki çözeltilere de uygulandı (Şekil 4.14. A, 4.14. B ve 4.14. C, Şekil 4.15. A, 4.15. B, Şekil 4.15. C ve 4.15. D). HPLC yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.14’de verildi.



Şekil 4.14. Plazma çözeltilerinin HPLC yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrileri A) silodosin, B) tamsulosin, C) solifenasin süksinat



Şekil 4.15. Karışım halindeki etken maddelerin plazma çözeltilerinin HPLC yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrileri: 1- silodosin (A)+ solifenasin süksinat (B) ve 2- tamsulosin (C)+ solifenasin süksinat (D)

Tablo 4.14. HPLC yöntemiyle elde edilen silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat plazma çözeltilerine ait kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz sonuçları

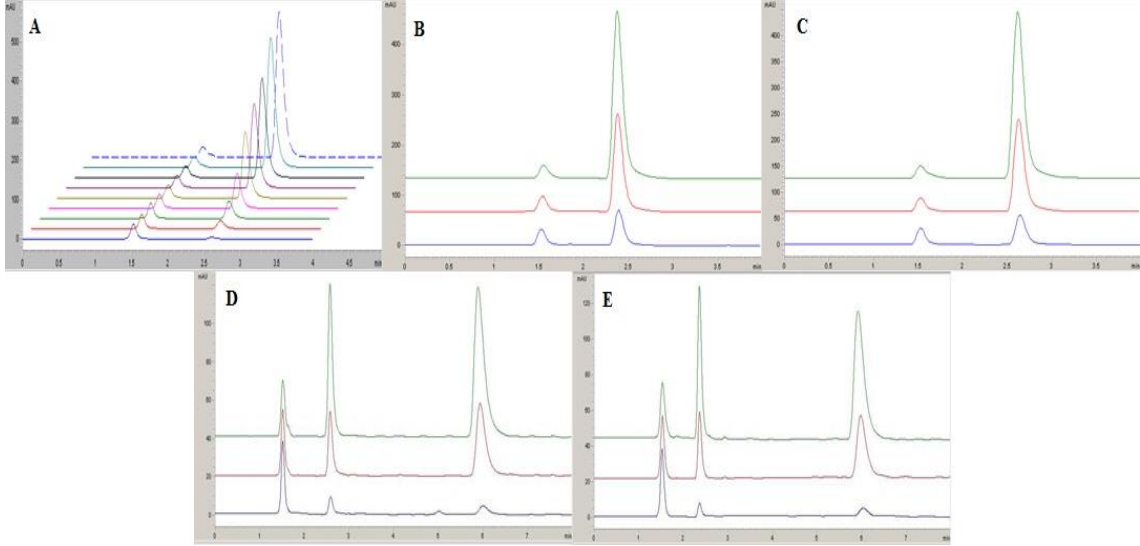
Etken Madde	DA (µg/mL)	λ (nm)	Regresyon Denklemi ^a	Sa	Sb	r
Silodosin	1-90	210	$y = 0.1743x + 0.1387$	0.0017	0.0043	0.9996
Tamsulosin	1-90	210	$y = 0.1371x - 0.0458$	0.00026	0.0025	0.9995
Solifenasin Süksinat	3-60	210	$y = 0.1097x - 0.0161$	0.00038	0.0003	0.9994
Silodosin / solifenasin süksinat	1-90	210	$y = 0.1346x + 0.1481$	0.0011	0.0018	0.9997
	3-60	210	$y = 0.1013x + 0.0931$	0.0026	0.0007	0.9995
Tamsulosin /solifenasin süksinat	1-90	210	$y = 0.141x + 0.0891$	0.0006	0.0042	0.9998
	3-60	210	$y = 0.1241x - 0.0141$	0.0017	0.0036	0.9994

DA: doğrusal aralık, a:6 kalibrasyon eğrisi, Sa: kaymanın standart sapması Sb: eğimin standart sapması, r: korelasyon katsayısı, x: derişim, y: pik alanları oranı

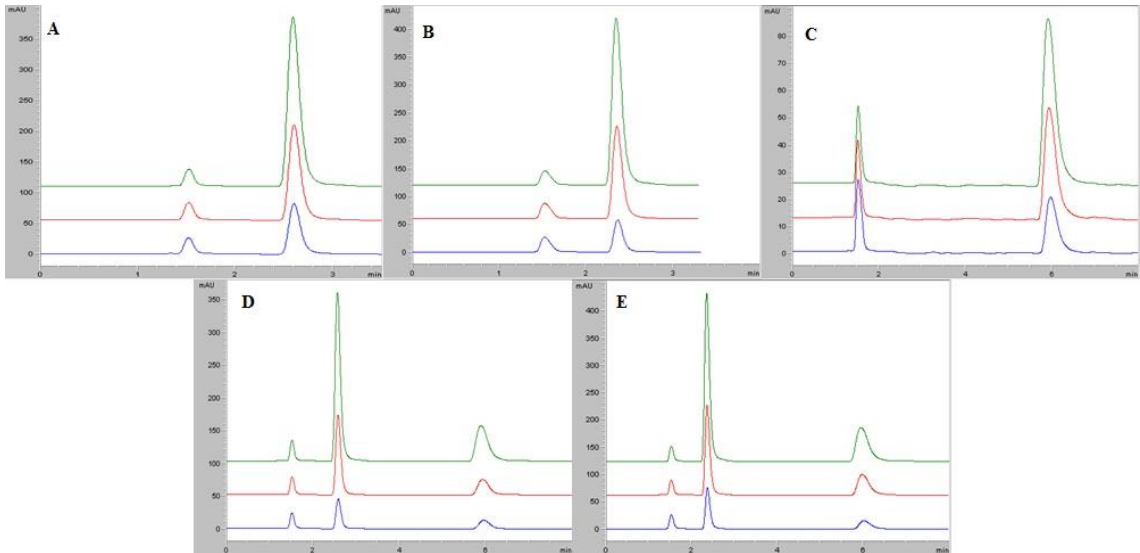
4.3.1.3. Doğruluk ve Kesinlik

Kalibrasyon eğrisi içerisine düşen üç farklı derişimde (15.0, 35.0 ve 55.0 µg/mL solifenasin süksinat, 15.0, 45.0 ve 85.0 µg/mL tamsulosin ve silodosin) standart ve plazma kalite kontrol çözeltileri hazırlandı. HPLC sistemine enjekte edilerek kromatogramları alındı (Şekil 4.16. A, 4.16. B, 4.16. C, 4.16. D ve 4.16. E, Şekil 4.17 A, 4.17 B, 4.17 C, 4.17 D ve 4.17 E). Kalite kontrol çözeltilerinin günüçi ve günler arası analizleri yapılarak HPLC yöntemin doğruluk ve kesinlik parametreleri belirlendi. Günüçi aynı yöntem-laboratuvar koşullarında aynı gün içinde 6 kez ve günler arası aynı yöntem-laboratuvar koşullarında 3 farklı günde 6 kez analizlerinin yapılmasıdır. Bu analizler sonucunda elde edilen verilerin ortalaması, standart sapması, bağıl hata ve bağıl standart sapması değerleri belirlendi. Yöntemin kesinliği bağıl standart sapması (BSS:

SS/ortalama x 100) ve doğruluk değeri ise bağıl hata (BH:(bulunan-eklenen)/eklenen x 100) ile verildi (Tablo 4.15, 4.16, 4.17, 4.18, 4.19 ve 4.20).



Şekil 4.16. Standart maddelerin kalite kontrol çözeltilerinin HPLC kromatogramları A) silodosin, B) tamsulosin, C) solifenasin süksinat, D) silodosin + solifenasin süksinat, E) tamsulosin + solifenasin süksinat



Şekil 4.16. Plazma kalite kontrol çözeltilerinin HPLC kromatogramları A) silodosin, B) tamsulosin, C) solifenasin süksinat, D) silodosin + solifenasin süksinat, E) tamsulosin + solifenasin süksinat

Tablo 4.15. Silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat standart çözeltilerinde HPLC yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)

Etken Madde	λ (nm)	Kalite Kontrol Çözeltisi (µg/mL)	Günüçi			Günler Arası		
			Ortalama $\pm$ SS (µg/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS	Ortalama $\pm$ SS (µg/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS
Silodosin	210	15	15.58 $\pm$ 0.18	3.87	1.21	15.53 $\pm$ 0.17	3.58	1.10
		45	45.82 $\pm$ 0.14	2.02	1.34	45.33 $\pm$ 0.28	1.47	0.63
		85	86.20 $\pm$ 0.12	1.41	0.15	86.02 $\pm$ 0.15	1.20	0.18
Tamsulosin	210	15	15.13 $\pm$ 0.05	0.92	0.36	15.17 $\pm$ 0.09	1.15	0.61
		45	46.00 $\pm$ 0.22	2.23	0.48	46.02 $\pm$ 0.33	2.27	0.71
		85	86.75 $\pm$ 0.40	2.06	0.46	86.58 $\pm$ 0.33	1.86	0.38
Solifenasin süksinat	210	15	14.81 $\pm$ 0.08	-1.21	0.55	14.77 $\pm$ 0.10	-1.50	0.73
		35	35.87 $\pm$ 0.31	2.49	0.86	36.03 $\pm$ 0.95	2.95	0.97
		55	56.04 $\pm$ 0.38	1.89	0.68	55.61 $\pm$ 0.24	1.12	0.43

λ : dalga boyu, SS: standart sapma (n=6), BH: Bağıl hata, BSS: bağıl standart sapma

Tablo 4.16. Silodosin+solifenasin süksinat standart çözeltilerinde HPLC yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)

Etken Madde	λ (nm)	Kalite Kontrol Çözeltisi (µg/mL)	Günüçi			Günler Arası		
			Ortalama $\pm$ SS (µg/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS	Ortalama $\pm$ SS (µg/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS
Silodosin	210	15	15.10 $\pm$ 0.08	0.71	0.58	15.11 $\pm$ 0.09	0.74	0.63
		45	45.02 $\pm$ 0.29	0.06	0.66	45.05 $\pm$ 0.30	0.12	0.68
		85	85.36 $\pm$ 0.30	0.42	0.35	85.30 $\pm$ 0.32	0.35	0.37
Solifenasin süksinat	210	15	15.02 $\pm$ 0.06	0.15	0.40	15.03 $\pm$ 0.03	0.20	0.23
		35	35.75 $\pm$ 0.17	2.16	0.49	35.58 $\pm$ 0.02	1.67	0.07
		55	56.35 $\pm$ 0.56	2.46	0.99	56.23 $\pm$ 0.79	2.23	1.41

λ : dalga boyu, SS: standart sapma (n=6), BH: Bağıl hata, BSS: bağıl standart sapma

Tablo 4.17. Tamsulosin+ solifenasin süksinat standart çözeltilerinde HPLC yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)

Etken Madde	λ (nm)	Kalite Kontrol Çözeltisi (µg/mL)	Günüçi			Günler Arası		
			Ortalama $\pm$ SS (µg/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS	Ortalama $\pm$ SS (µg/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS
Tamsulosin	210	15	15.09 $\pm$ 0.09	0.66	0.61	15.03 $\pm$ 0.06	0.23	0.40
		45	45.62 $\pm$ 0.16	1.37	0.36	45.49 $\pm$ 0.11	1.09	0.26
		85	84.49 $\pm$ 0.28	-0.58	0.34	84.46 $\pm$ 0.27	-0.63	0.32
Solifenasin süksinat	210	15	15.24 $\pm$ 0.17	1.62	1.12	15.12 $\pm$ 0.10	0.85	0.72
		35	35.16 $\pm$ 0.15	0.46	0.45	35.25 $\pm$ 0.19	0.72	0.54
		55	55.85 $\pm$ 0.01	1.54	0.02	55.76 $\pm$ 0.22	1.39	0.40

λ : dalga boyu, SS: standart sapma (n=6), BH: Bağlı hata, BSS: bağlı standart sapma

Tablo 4.18. Silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat plazma çözeltilerinin HPLC yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)

Etken Madde	λ (nm)	Kalite Kontrol Çözeltisi (µg/mL)	Günüçi			Günler Arası		
			Ortalama $\pm$ SS (µg/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS	Ortalama $\pm$ SS (µg/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS
Silodosin	210	15	15.83 $\pm$ 0.07	5.86	0.50	15.79 $\pm$ 0.16	5.29	1.05
		45	43.72 $\pm$ 0.58	-2.90	1.34	43.84 $\pm$ 0.77	-2.57	1.76
		85	82.55 $\pm$ 0.47	-2.86	0.57	82.83 $\pm$ 0.54	-2.54	0.65
Tamsulosin	210	15	15.21 $\pm$ 0.17	1.40	1.15	15.46 $\pm$ 0.09	3.10	0.63
		45	43.98 $\pm$ 0.49	-2.29	1.13	44.10 $\pm$ 0.84	-1.98	1.92
		85	88.62 $\pm$ 0.49	4.23	0.55	88.18 $\pm$ 0.07	3.75	0.08
Solifenasin süksinat	210	15	15.70 $\pm$ 0.06	4.72	0.39	15.60 $\pm$ 0.08	3.93	0.52
		35	34.10 $\pm$ 0.35	-2.64	1.05	33.9 $\pm$ 0.95	-3.07	-3.07
		55	55.60 $\pm$ 0.83	1.19	1.50	53.4 $\pm$ 0.88	-2.92	-2.90

λ : dalga boyu, SS: standart sapma (n=6), BH: Bağlı hata, BSS: bağlı standart sapma

Tablo 4.19. Silodosin + solifenasin süksinat plazma çözeltilerinde HPLC yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)

Etken Madde	λ (nm)	Kalite Kontrol Çözeltisi ($\mu\text{g/mL}$)	Günüçi			Günler Arası		
			Ortalama $\pm$ SS ($\mu\text{g/mL}$)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS	Ortalama $\pm$ SS ($\mu\text{g/mL}$)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS
Silodosin	210	15	15.63 $\pm$ 0.33	4.00	2.12	15.59 $\pm$ 0.09	3.33	0.59
		45	46.32 $\pm$ 0.22	2.88	1.48	46.84 $\pm$ 0.13	3.98	0.28
		85	85.03 $\pm$ 0.57	0.04	0.68	85.83 $\pm$ 0.49	0.38	0.57
Solifenasin süksinat	210	15	14.40 $\pm$ 0.11	-3.65	2.82	14.70 $\pm$ 0.08	-2.02	1.68
		35	34.60 $\pm$ 0.28	-1.04	1.81	35.04 $\pm$ 0.45	-0.08	3.29
		55	56.10 $\pm$ 0.37	2.09	3.66	55.8 $\pm$ 0.87	1.55	2.5

λ : dalga boyu, SS: standart sapma (n=6), BH: Bağıl hata, BSS: bağıl standart sapma

Tablo 4.20. Tamsulosin + solifenasin süksinat plazma çözeltilerinde HPLC yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)

Etken Madde	λ (nm)	Kalite Kontrol Çözeltisi ($\mu\text{g/mL}$)	Günüçi			Günler Arası		
			Ortalama $\pm$ SS ($\mu\text{g/mL}$)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS	Ortalama $\pm$ SS ($\mu\text{g/mL}$)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS
Tamsulosin	210	15	15.63 $\pm$ 0.11	4.46	0.69	15.59 $\pm$ 0.06	3.47	2.42
		45	47.42 $\pm$ 0.27	5.44	0.57	47.13 $\pm$ 0.19	4.70	2.41
		85	88.35 $\pm$ 0.34	3.96	0.39	88.83 $\pm$ 0.41	4.58	1.47
Solifenasin süksinat	210	15	15.50 $\pm$ 0.18	3.41	1.17	15.40 $\pm$ 0.20	2.86	2.32
		35	35.30 $\pm$ 0.25	1.07	1.71	35.42 $\pm$ 0.31	1.28	2.88
		55	54.10 $\pm$ 0.34	-1.55	2.64	54.07 $\pm$ 0.38	-1.78	1.72

λ : Dalga boyu, SS: Standart sapma (n=6), BH: Bağıl hata, BSS: bağıl standart sapma

4.3.1.4. Teşhis limiti (LOD) ve Miktar tayin limiti (LOQ)

HPLC çalışmasında, LOD ve LOQ değerleri ICH kılavuzlarında verildiği şekilde tayin edildi. Kalibrasyon eğrisinde yer alan en düşük derişimden daha düşük derişimlerde

hazırlanan standart çalışma ve plazma çözeltilerinin kromatogramları alındı. Bu kromatogramlardan sinyal/gürültü (S/G) oranı 3 olan değer teşhis limiti (LOD) ve S/G oranı 10 olan değerde miktar tayin limiti (LOQ) olarak belirlendi (Tablo 4.21, Tablo 4.22, Tablo 4.23, Tablo 4.24, Tablo 4.25 ve Tablo 4.26).^{154, 155}

Tablo 4.21. Silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat standart çalışma çözeltilerinin HPLC yöntemine ait teşhis limiti ve miktar tayin limiti

Etken Madde	λ (nm)	Duyarlılık Limiti	
		LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
Silodosin	210	0.33	1.0
Tamsulosin	210	0.33	1.0
Solifenasin Süksinat	210	0.90	3.0

λ : dalga boyu

Tablo 4.22. Silodosin + solifenasin süksinat standart çalışma çözeltilerinin HPLC yöntemine ait teşhis limiti ve miktar tayin limiti

Etken Madde	λ (nm)	Duyarlılık Limiti	
		LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
Silodosin	210	0.33	1.0
Solifenasin süksinat	210	0.90	3.0

λ : dalga boyu

Tablo 4.23. Tamsulosin + solifenasin süksinat standart çalışma çözeltilerinin HPLC yöntemine ait teşhis limiti ve miktar tayin limiti

Etken Madde	λ (nm)	Duyarlılık Limiti	
		LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
Tamsulosin	210	0.33	1.0
Solifenasin süksinat	210	0.90	3.0

λ : dalga boyu

Tablo 4.24. Silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat plazma çözeltilerinin HPLC yöntemine ait teşhis limiti ve miktar tayin limiti

Etken Madde	λ (nm)	Duyarlılık Limiti	
		LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
Silodosin	210	0.33	1.0
Tamsulosin	210	0.33	1.0
Solifenasin Süksinat	210	0.90	3.0

λ : dalga boyu

Tablo 4.25. Silodosin + solifenasin süksinat plazma çözeltilerinin HPLC yöntemine ait teşhis limiti ve miktar tayin limiti

Etken Madde	λ (nm)	Duyarlılık Limiti	
		LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
Silodosin	210	0.33	1.0
Solifenasin süksinat	210	0.90	3.0

λ : dalga boyu

Tablo 4.26. Tamsulosin + solifenasin süksinat plazma çözeltilerinin HPLC yöntemine ait teşhis limiti ve miktar tayin limiti

Etken Madde	λ (nm)	Duyarlılık Limiti	
		LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
Tamsulosin	210	0.33	1.0
Solifenasin süksinat	210	0.90	3.0

λ : dalga boyu

4.3.1.5. Analitik ve Plazma Geri Kazanımı

HPLC yöntemi ile farmasötik preparatlarda silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinatın analitik geri kazanım çalışması standart ekleme yöntemine göre yapıldı. “3.3.4.2. HPLC Yönteminde Farmasötik Preparat Çözeltilerinin Hazırlanması” bölümünde anlatıldığı şekilde farmasötik preparat çözeltileri IS (50.0 µg/mL) ile birlikte hazırlandı ve HPLC sistemine enjekte edilerek kromatogramları alındı pik alanları tespit edildi. Sonra bu çözeltilere önceden hazırlanmış olan her üç etken maddenin kalite kontrol çözeltileri (10.0, 30.0 ve 50.0 µg/mL solifenasin süksinat, 10.0, 40.0 ve 80.0 µg/mL tamsulosin ve silodosin) eklendi. Bu çözeltiler için final derişimleri 17.5, 37.5 ve 57.5 µg/mL solifenasin ve 17.5, 47.5 ve 87.5 µg/mL derişimlerde tamsulosin ve silodosin çözeltileri elde edilmiş oldu. Bu çözeltiler HPLC sistemine enjekte edilerek kromatogramları alındı ve pik alanları belirlendi. Elde edilen pik alan verilerinin ortalaması, standart sapması, bağıl standart sapması ve analitik geri kazanım değerleri hesaplandı. Analitik geri kazanım değerleri [%A.G.K= (Toplam Çözeltinin Pik Alanı Değeri-Farmasötik Preparat Çözeltisi Pik Alan Değeri)/Farmasötik Preparat Çözeltisi Pik Alan Değeri x 100] formülünden hesaplandı. Elde edilen Analitik Geri Kazanım değerleri Tablo 4.27’de verildi.

Tablo 4.27. HPLC yönteminin farmasötik preparatlarda analitik geri kazanım değerleri

Etken Madde	λ (nm)	Eklenen		Geri Kazanım (%)	BSS (%)
		Kalite Kontrol Çöz. ($\mu\text{g/mL}$)	Ortalama $\pm$ SS($\mu\text{g/mL}$)		
Urorec[®] 7.5 $\mu\text{g/mL}$	210	10	10.28 $\pm$ 0.16	102.8	1.58
		40	40.13 $\pm$ 0.16	100.3	0.41
		80	79.92 $\pm$ 0.21	99.9	0.26
Flomax MR[®] 7.5 $\mu\text{g/mL}$	210	10	10.08 $\pm$ 0.26	100.8	2.63
		40	40.50 $\pm$ 0.53	100.9	1.31
		80	79.72 $\pm$ 0.72	99.6	0.91
Kinzy[®] 7.5 $\mu\text{g/mL}$	210	10	9.91 $\pm$ 0.10	99.2	1.04
		30	30.15 $\pm$ 0.13	100.5	0.44
		50	50.57 $\pm$ 0.24	101.1	0.47

SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma, GK: Geri Kazanım

Plazmadan geri kazanım çalışmasında ise silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinatın üç farklı derişimdeki kalite kontrol çözeltileri IS ile birlikte plazmaya eklendi, karıştırıldı. “3.3.4.3. Silodosin, Tamsulosin ve Solifenasin Süksinatın Plazmadan Ekstraksiyon Prosesi” bölümünde verilen şekilde plazma çözeltileri hazırlandı ve HPLC sistemine enjekte edilerek kromatogramları elde edildi ve pik alanları tespit edildi. Standart çözeltilerin ve plazma çözeltilerinin günüçi ve günler arası yapılan analizlerinde belirlenen pik alan oranları, standart çözeltilerden elde edilen pik alan oranları değerleri ile kıyaslanarak plazmadan yüzde geri kazanım değerleri hesaplandı (Tablo 4.28, 4.29 ve 4.30).

Tablo 4.28. HPLC yöntemi ile elde edilen günüçi ve günler arası plazmadan geri kazanım değerleri (n=6)

Etken Madde	λ (nm)	Kalite	Günüçi				Günler arası			
		Kontrol	Analit		IS		Analit		IS	
		Çözeltili	%	%	%	%	%	%	%	%
		($\mu\text{g/mL}$)	GK	BSS	GK	BSS	GK	BSS	GK	BSS
Silodosin	210	10	92.9	3.69	93.8	4.12	96.4	5.51	101.1	1.91
		40	96.7	2.23	96.2	3.47	99.4	1.58	103.4	4.68
		80	98.1	3.53	98.2	4.41	97.2	6.42	100.7	1.53
Tamsulosin	210	10	93.9	3.96	97.4	3.20	100.4	3.28	96.0	2.81
		40	96.3	2.93	99.2	5.78	100.3	3.72	98.2	4.13
		80	97.4	3.11	101.1	1.83	98.2	6.12	94.6	2.33
Solifenasin süksinat	210	10	93.1	2.68	95.3	3.47	94.2	3.26	96.8	3.25
		30	96.3	2.95	96.7	5.64	93.8	2.53	102.2	2.61
		50	97.4	2.92	99.4	4.04	98.1	4.62	104.2	5.01

SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma, GK: Geri Kazanım, λ : Dalga boyu

Tablo 4.29. HPLC yöntemi ile elde edilen silodosin+solifenasin süksinatın günüçi ve günler arası plazmadan geri kazanım değerleri (n=6)

Etken Madde	λ (nm)	Kalite Kontrol Çözeltilisi ($\mu\text{g/mL}$)	Günüçi				Günler arası			
			Analit		IS		Analit		IS	
			%	%	%	%	%	%	%	%
			GK	BSS	GK	BSS	GK	BSS	GK	BSS
Silodosin	210	10	98.1	2.41	100.7	2.01	97.2	3.68	98.1	4.91
		40	99.3	3.52	99.8	3.02	103.1	4.72	95.3	2.16
		80	100.1	4.37	97.6	3.84	99.8	3.65	96.5	3.72
Solifenasin süksinat	210	10	96.4	5.13	98.1	4.72	96.8	2.47	99.3	2.48
		30	94.3	3.81	99.4	2.51	97.8	1.83	101.4	1.89
		50	95.1	1.25	96.2	1.32	98.6	2.06	97.5	6.15

SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma, GK: Geri Kazanım, λ : Dalga boyu

Tablo 4.30. HPLC yöntemi ile elde edilen tamsulosin + solifenasin süksinatın günüçi ve günler arası plazmadan geri kazanım değerleri (n=6)

Etken Madde	λ (nm)	Kalite Kontrol Çözeltilisi ($\mu\text{g/mL}$)	Günüçi				Günler arası			
			Analit		IS		Analit		IS	
			%	%	%	%	%	%	%	%
			GK	BSS	GK	BSS	GK	BSS	GK	BSS
Tamsulosin	210	10	103.9	2.39	96.7	1.48	96.4	4.27	95.8	3.81
		40	100.2	5.36	100.5	3.72	97.3	3.64	98.3	2.52
		80	98.4	4.28	98.7	2.19	99.6	2.21	101.2	1.46
Solifenasin süksinat	210	10	92.8	3.08	92.7	3.62	101.2	1.07	99.6	0.81
		30	93.8	1.77	97.5	2.85	91.4	2.09	93.5	3.72
		50	95.6	3.68	98.9	5.81	98.2	3.45	96.2	2.15

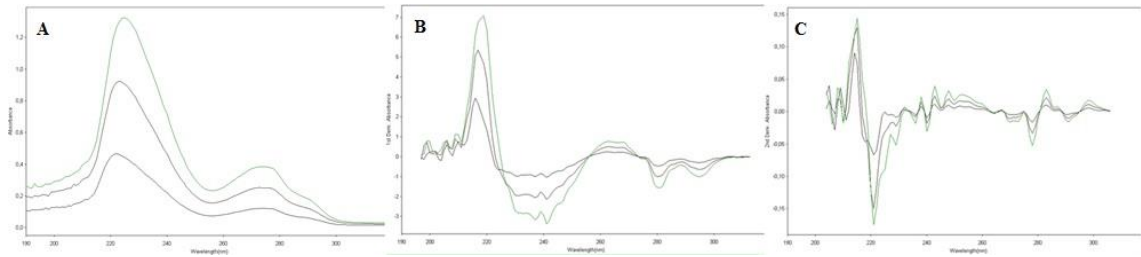
SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma, GK: Geri Kazanım, λ : Dalga boyu

4.4. Yöntemlerin Gerçek Numunelere Uygulama

Geliştirilen ve geçerlilik testleri yapılan yöntemlerin uygulanabilirliğini göstermek için silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat içeren ticari farmasötik preparatlarda etken maddelerin miktar tayinleri gerçekleştirildi.

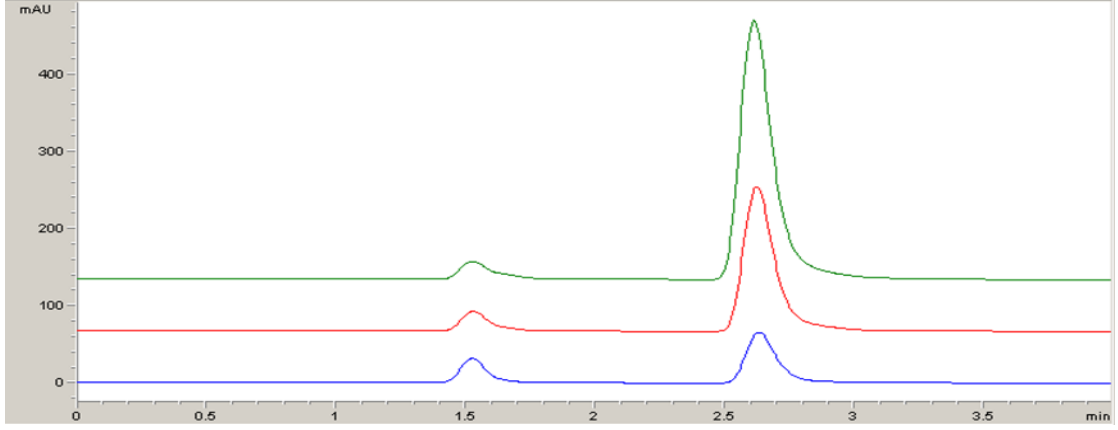
4.4.1. Urorec® Yumuşak Kapsül

8 mg silodosin içeren Urorec® Yumuşak kapsül çözeltileri “3.3.4. Spektroskopi Yöntemlerinde Farmasötik Preparat Çözeltilerinin Hazırlanması” bölümünde anlatıldığı şekilde hazırlandı. Hazırlanan farmasötik preparat çözeltilerinin UV-Görünür Bölge, 1D-Türev ve 2D-Türev spektrumları (Şekil 4.18. A, 4.18. B ve 4.18. C) alındı ve absorbans değerleri okundu. Bir kapsül içeriğindeki etken madde miktarları belirlendi (Tablo 4.31).



Şekil 4.17. Urorec® kapsül çözeltilerinin spektroskopi yöntemlerinin spektrumları; A) UV-Görünür Bölge, B) 1D-Türev C) 2D-Türev

HPLC uygulamasında 8 mg silodosin içeren Urorec® Yumuşak kapsül çözeltileri “3.3.4.2. HPLC Yönteminde Farmasötik Preparat Çözeltilerinin Hazırlanması” bölümünde belirtildiği şekilde IS ile birlikte hazırlandı. Bu çözeltiler HPLC sistemine enjekte edilerek kromatogramları alındı (Şekil 4.19.) ve pik alan oranları belirlendi. Bir kapsül içeriğindeki silodosin etken madde miktarı belirlendi (Tablo 4.31).



Şekil 4.18. Urorec® kapsül çözeltilerinin HPLC kromatogramları

Tablo 4.31. Urorec® (8 mg) kapsülde silodosin etken madde miktar tayini (n:6)

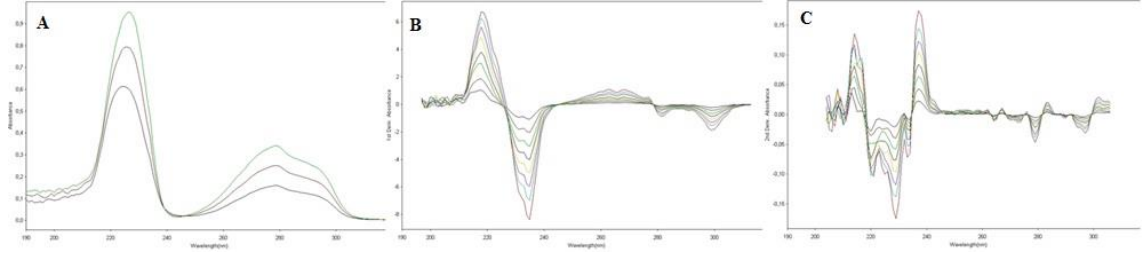
Etken Madde	Yöntem	λ (nm)	Ortalama $\pm$ SS (mg)	%Geri Kazanım	%BSS	Güven aralığı
Urorec® Kapsül	UV-Görünür Bölge	223	7.97 $\pm$ 0.76	99.6	1.64	98.0-101.2
		218	7.65 $\pm$ 1.11	95.6	1.12	94.4-100.2
	1D-Türev	281	7.93 $\pm$ 0.47	99.1	1.82	97.1-101.6
		278	8.01 $\pm$ 0.83	100.1	3.18	98.3-101.7
	2D-Türev	283	8.13 $\pm$ 0.79	101.6	2.46	96.1-103.3
	HPLC	210	8.04 $\pm$ 0.54	100.5	2.22	97.4-102.1

λ : dalga boyu, BSS: bağıl standart sapma.

4.4.2. Flomax MR® Yumuşak Kapsül

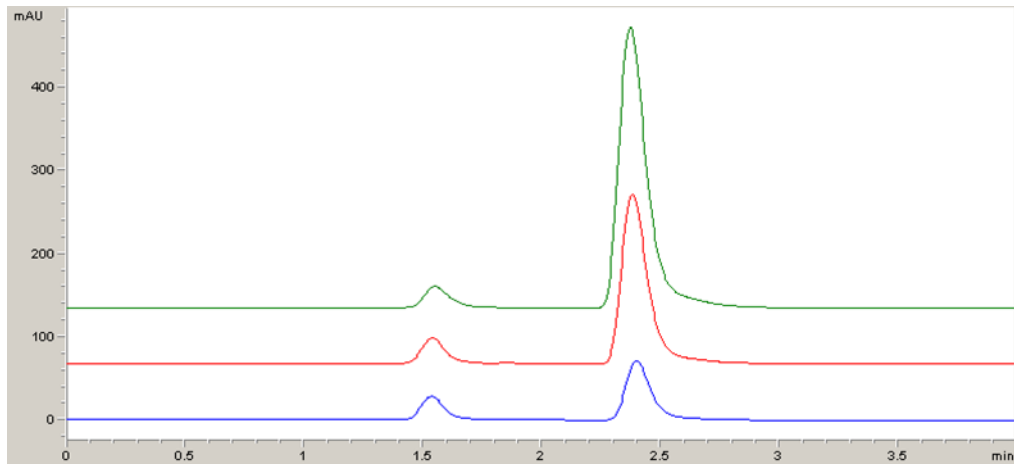
0.4 mg tamsulosin içeren Flomax MR® kapsül çözeltileri “3.3.4. Spektroskopi Yöntemlerinde Farmasötik Preparat Çözeltilerinin Hazırlanması” bölümünde anlatıldığı şekilde hazırlandı. Hazırlanan farmasötik preparat çözeltilerinin UV-Görünür Bölge, 1D-

Türev ve 2D-Türev spektrumları (Şekil 4.20. A, 4.20. B ve 4.20. C) alındı ve absorbans değerleri okundu. Bir kapsül içeriğindeki etken madde miktarları belirlendi (Tablo 4.32).



Şekil 4.19. Flomax MR® kapsül çözeltilerinin spektroskopi yöntemlerinden elde edilen spektrumları; A) UV-Görünür Bölge, B) 1D-Türev C) 2D-Türev

HPLC uygulamasında 0.4 mg tamsulosin içeren Flomax MR® kapsül çözeltileri “3.3.4.2. HPLC Yönteminde Farmasötik Preparat Çözeltilerinin Hazırlanması” bölümünde belirtildiği şekilde IS ile birlikte hazırlandı. Bu çözeltiler HPLC sistemine enjekte edilerek kromatogramları alındı (Şekil 4.21.) ve pik alan oranları belirlendi. Bir kapsül içeriğindeki silodosin etken madde miktarı belirlendi (Tablo 4.32).



Şekil 4.20. Flomax MR® 0.4 mg kapsül çözeltilerinin HPLC kromatogramı

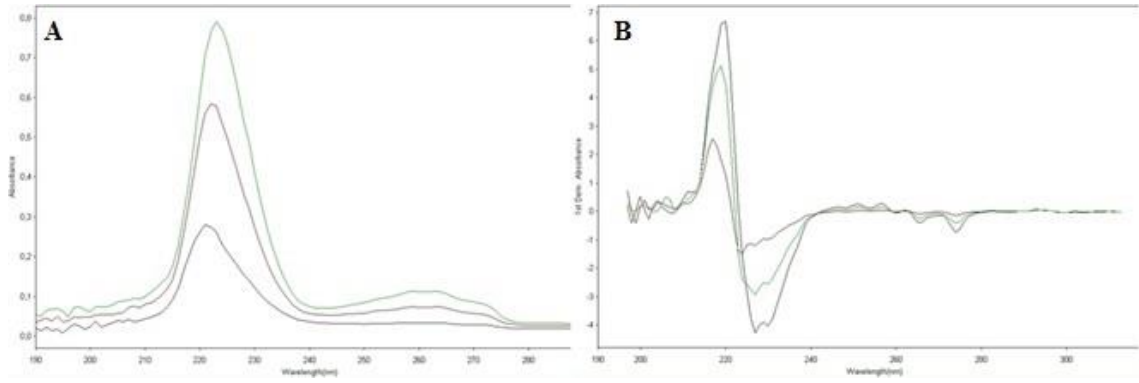
Tablo 4.32. Flomax MR® 0.4 mg kapsülde tamsulosin etken madde miktar tayini (n:6)

Etken Madde	Yöntem	λ (nm)	Ortalama$\pm$ SS (mg)	%Geri Kazanım	%BSS	Güven aralığı
Flomax MR® Kapsül	UV-Görünür Bölge	226	0.387 $\pm$ 0.74	96.75	3.21	94.14-99.57
		218	0.413 $\pm$ 1.01	103.2	2.51	98.43-103.9
	1D-Türev	235	0.394 $\pm$ 0.83	98.5	1.74	96.57-100.7
		299	0.407 $\pm$ 0.23	101.7	3.20	99.76-102.3
	2D-Türev	229	0.375 $\pm$ 0.49	93.7	1.06	92.18-96.36
		237	0.412 $\pm$ 0.57	103	4.25	99.48-105.3
	HPLC	279	0.373 $\pm$ 1.24	93.2	1.08	92.42-99.43
		210	0.397 $\pm$ 0.62	99.2	0.76	97.87-101.9

λ : dalga boyu, BSS: bağıl standart sapma

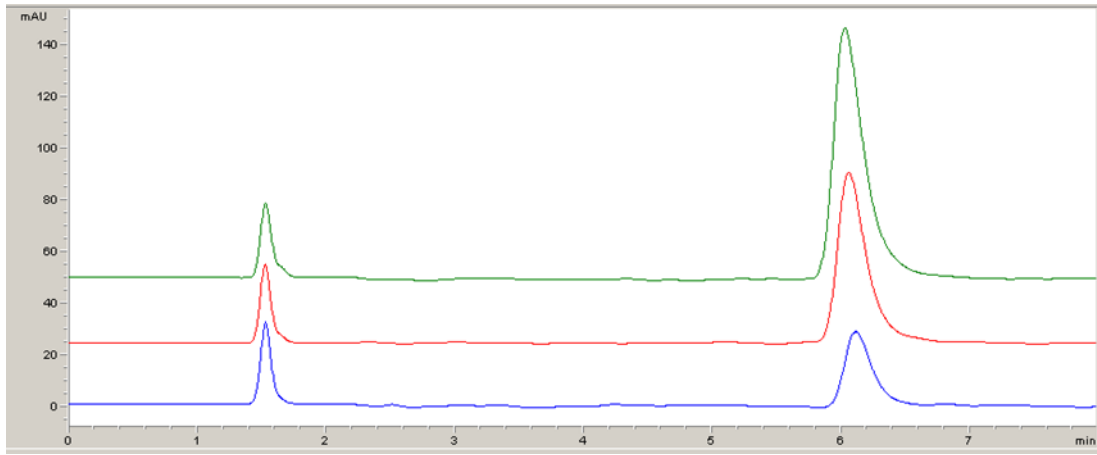
4.4.3. Kinzy® Tablet

5 mg solifenasin süksinat içeren Kinzy® Tablet çözeltileri “3.3.4. Spektroskopi Yöntemlerinde Farmasötik Preparat Çözeltilerinin Hazırlanması” bölümünde anlatıldığı şekilde hazırlandı. Hazırlanan farmasötik preparat çözeltilerinin UV-Görünür Bölge, 1D-Türev ve 2D-Türev spektrumları (Şekil 4.22. A ve 4.22. B) alındı ve absorbans değerleri okundu. Bir tablet içeriğindeki etken madde miktarları belirlendi (Tablo 4.33).



Şekil 4.21. Kinzy® 5 mg Tablet çözeltilerinin Spektroskopi yöntemlerinden elde edilen spektrumları A) UV-Görünür Bölge ve B) 1D-Türev

HPLC uygulamasında 5 mg solifenasin süksinat içeren Kinzy® Tablet çözeltileri “3.3.4.2. HPLC Yönteminde Farmasötik Preparat Çözeltilerinin Hazırlanması” bölümünde belirtildiği şekilde IS ile birlikte hazırlandı. Bu çözeltiler HPLC sistemine enjekte edilerek kromatogramları alındı (Şekil 4.23.) ve pik alan oranları belirlendi. Bir tablet içeriğindeki solifenasin süksinat etken madde miktarı belirlendi (Tablo 4.33.).



Şekil 4.22. Kinzy® 5mg Tablet çözeltilerinin HPLC kromatogramları

Tablo 4.33. Kinzy® 5mg Tablette solifenasin süksinat etken madde miktar tayini

Etken Madde	Yöntem	λ (nm)	Ortalama $\pm$ SS (mg)	%Geri Kazanım	%BSS	Güven aralığı
Kinzy® Tablet	UV-Görünür Bölge	222	4.89 $\pm$ 0.78	97.8	1.749	95.61-100.1
		219	4.92 $\pm$ 0.49	98.4	1.325	96.47-100.4
	1D-Türev	228	5.02 $\pm$ 1.07	100.4	0.892	98.12-101.9
		274	5.10 $\pm$ 1.23	102	0.963	98.32-103.8
	HPLC	210	4.99 $\pm$ 0.78	99.8	0.628	98.01-102.4

λ : dalga boyu, BSS: bağıl standart sapma (standart sapma/ortalama $\times$ 100)

4.5. Metabolomiks

4.5.1. Plazma Örneklerinin Metabolik Veri Setleri ve Analitik Yaklaşımı

Cerrahi işlem ile kontrol ve ilaç uygulanmış rat gruplarındaki her bir rattan alınıp $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan plazma örnekleri ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edilip, konsantratörde kuruluğa kadar buharlaştırılıp hareketli fazda çözülerek hazırlanan numuneler LC-QTOF-MS/MS yöntemiyle analiz edildi. LC-QTOF-MS/MS cihazından alınan veri setleri ProteoWizard programına yüklenerek verilerin uzantısı işlenebilir hale getirildi. Kör numune, kalite kontrol numuneleri ve plazma numunelerinin analiz sonuçlarını değerlendirmek için elde edilen veriler Agilent MassHunter Yazılım versiyonu B.02.00'e yüklendi. XCMS yazılım programı kullanılarak kromatogramda ortaya çıkan pikler doğrulanarak düzenlendi. Bu program vasıtasıyla rat plazması ve çalışma ile ilgisi olmayan ve karakteristik kütle fragmanı bilgisi bulunmayan maddelerin dışında kalan metabolitlerin listesi çıkarıldı. m/z oranları ile metabolitler tanımlandı. Listede dedektör tarafından yaklaşık olarak silodosin grubu için 4581, tamsulosin grubu için 4776 ve solifenasin süksinat grubu için 4441 farklı değer tespit edilirken bunlardan

fold değeri>1.5 ve p değeri $p<0.01$ şartlarını taşıyarak kontrol grubuna göre anlamlı farklılık gösteren her grup için birçok farklı metabolit tespit edildi. Bu metabolitlerin doğru kütle ve yapı bilgileri HMDB ve METLIN gibi veri tabanları kullanılarak doğrulandı. Değerlendirme sonucu silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat grupları için sırası ile 41, 35 ve 43 tane metabolit tespit edilip tanımlandı (Tablo 4. 34-36).

Tablo 4.34. Silodosin grubu rat plazmalarında tanımlanan metabolitler

Metabolitler	Fold	P değeri	Değişim	m/z med	Rt med
PI(18:0/22:6(4Z.7Z.10Z.13Z.16Z.19Z))	9.5	6.22e-8	Azalış	899.5613	7.19
PC(20:4(8Z.11Z.14Z.17Z)/18:1(11Z))	27.1	2.07e-7	Azalış	808.5874	0.09
17-beta-Estradiol glukuronit	2.2	0.00001	Azalış	448.5061	2.65
TG(18:1(9Z)/16:0/18:3(9Z.12Z.15Z))	2.6	0.00003	Artış	855.7385	2.13
PE(22:4(7Z.10Z.13Z.16Z)/22:5(4Z.7Z.10Z.13Z.16Z))	6.5	0.00004	Azalış	842.5692	0.47
L-kinurenin	3.1	0.00061	Azalış	208.0848	9.15
S-Adenozilmetiyonin	1.7	0.00043	Artış	399.4451	11.53
N-formilkinurenin	2.3	0.00018	Azalış	236.0797	6.48
Taurokolik asid	2.9	0.00762	Azalış	515.7034	5.14
PS(18:0/22:5(7Z.10Z.13Z.16Z.19Z))	9.0	0.00005	Azalış	804.5554	1.65
Sfinganin	1.9	0.00006	Artış	301.5078	14.74
14.15-epoksi-5.8.11-eikosatrienoik asit (14.15-EET)	2.1	0.00034	Azalış	320.4663	7.53
Homovanilik asid	1.7	0.00048	Artış	182.1733	12.38
(R)-N-Metilsalsolinol	2.0	0.00021	Azalış	279.0946	2.04
PG(18:0/18:0)	2.0	0.00028	Artış	779.0912	0.40
PA(16:0/18:1(9Z))	2.8	0.00057	Artış	813.6949	2.13
Prostaglandin H2	1.7	0.00486	Azalış	352.4651	7.14
5'-Metiltiyoadenozin	1.9	0.00160	Artış	297.3347	14.99
PG(18:1(11Z)/22:6(4Z.7Z.10Z.13Z.16Z.19Z))	5.4	0.00175	Azalış	821.5339	6.86
Kolin	2.3	0.00276	Azalış	104.1078	4.87
LysoPC(22:5(4Z.7Z.10Z.13Z.16Z))	2.7	0.00540	Azalış	570.3576	14.66
Feniletilamin	1.8	0.00728	Artış	122.0969	7.88
11b-PGF2a	2.0	0.00795	Azalış	393.2612	3.12
Tetrahidrokortisol	3.2	0.00802	Azalış	366.4917	4.42
Tromboksan A2	2.7	0.00806	Azalış	352.4651	5.36
Sfingozin	3.6	0.00809	Artış	299.4919	3.21
15-Keto-prostaglandin E2	1.5	0.00816	Azalış	350.4492	2.99
D-Glutamin	1.6	0.0874	Azalış	147.0763	2.39
Prostaglandin G2	1.5	0.00951	Azalış	368.4645	7.88
PE-NMe(18:1(9Z)/18:1(9Z))	12.1	0.00103	Azalış	732.5566	14.80
Fosforibozil formamidokarboksamid	2.7	0.00046	Azalış	366.2213	9.46
1-Monopalmitin	1.7	0.00054	Azalış	331.2856	5.02
5-hidroperoksieikosatetraenoik asit	2.3	0.0086	Azalış	336.4617	5.27
Fosfatidik asit (16:0/18:1)	2.6	0.00527	Artış	674.9414	1.42

Kalsidiol	1.7	0.00584	Artış	400.6371	0.41
5-amino-1-(5-fosfo-D-ribozil)imidazole-4-karboksilat	2.4	0.00618	Azalış	339.1959	3.28
(-)-Epinefrine	1.6	0.00637	Artış	184.0952	2.18
L-Arjinin	4.3	0.00574	Azalış	174.1117	3.42
L-Metiyonin	3.6	0.00082	Artış	149.0513	3.57
Lesitin	4.1	0.00658	Artış	165.1891	3.34
Prolin	3.4	0.00692	Artış	115.1305	4.17

Tablo 4.35. Tamsulosin grubu rat plazmalarında tanımlanan metabolitler

Metabolitler	Fold	P değeri	Değişim	m/z med	Rt med
LysoPC(18:0)	2.9	0.00166	Artış	524.3729	13.62
α -Linolenik Asit	2.9	0.00246	Azalış	278.4296	4.51
LysoPC(20:4(5Z.8Z.11Z.14Z))	31.9	0.00296	Azalış	543.6729	7.13
Tiamin	2.3	0.00470	Artış	265.1125	8.00
Retinoik asit	2.7	0.00484	Azalış	301.2177	4.80
Prostaglandin D2-1-gliseril ester	1.5	0.00643	Azalış	426.5436	3.00
Retinil ester	5.4	0.00683	Azalış	303.2340	4.18
Piroglutamik asit	1.5	0.00980	Artış	130.0506	6.82
1.25-Dihidroksivitamin D3-26.23-lacton	1.7	0.00399	Artış	444.6035	2.10
gamma-Linolenik asit	5.3	0.00461	Azalış	278.4296	4.74
L-Glutamin	1.5	0.00544	Artış	147.0771	7.77
LysoPE(18:2(9Z.12Z)/0:0)	2.3	0.00783	Azalış	478.2958	8.54
L-Serin	3.1	0.00863	Azalış	105.0926	3.42
Kolin	1.6	0.00995	Azalış	104.1079	2.80
Retinaldehit	2.1	0.00225	Azalış	285.2225	4.81
Sfingozin 1-fosfat	2.0	0.00291	Azalış	380.2574	8.35
Palmitik asit	9.0	0.00234	Azalış	256.4241	1.18
LysoPE(18:1(9Z)/0:0)	2.3	0.00246	Azalış	494.3251	10.42
L-Lizin	1.9	0.00247	Azalış	146.1876	6.84
Kalsitriol	3.4	0.00249	Artış	416.6365	2.57
23S.25-dihidroksivitamin D3	2.2	0.00242	Artış	416.6365	1.26
N-Oleoil Etanolamin	2.5	0.00249	Azalış	325.5292	10.13
Sfinganin	4.8	0.00775	Azalış	302.3067	13.92
Piroglutamik asit	1.9	0.00796	Artış	130.0504	2.12
N-Akriloliglisin	3.6	0.00834	Artış	129.1108	2.56
1.25- Dihidroksivitamin D3-26.23-lacton	2.0	0.00309	Azalış	444.6015	5.43
Kalsidiol	2.8	0.00307	Azalış	400.6371	4.57
Beta-D-Glucopiranuronik asit	5.4	0.00306	Azalış	314.2419	14.99
Arjininik asit	1.5	0.00309	Artış	176.1037	2.13
L-Triptofan	2.1	0.00119	Azalış	204.2252	3.55
N-Acetil-L-alanin	1.8	0.00136	Artış	131.1299	3.37
L-Alanin	2.8	0.00144	Artış	89.0932	4.14
PC(P-16:0/22:4(7Z.10Z.13Z.16Z))	190.5	0.00357	Azalış	794.1354	0.52
LysoPC (20:0/0:0)	372.6	0.00388	Azalış	810.5946	0.10

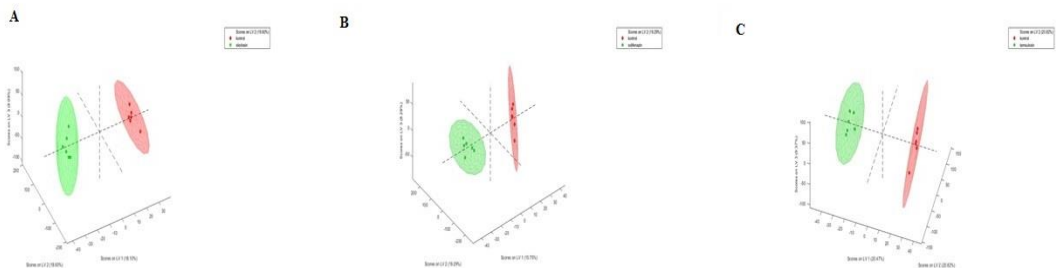
Tablo 4.36. Solifenasin süksinat grubu rat plazmalarında tanımlanan metabolitler

Metabolitler	Fold	P değeri	Değişim	m/z med	Rt med
Indolakrilik asit	1.7	0.00240	Azalış	188.0716	2.16
Araşidonik asit	1.8	0.00332	Azalış	304.4669	2.12
LysoPC(22:5(4Z.7Z.10Z.13Z.16Z))	2.2	0.00741	Azalış	570.3582	14.62
Palmitik asit	18.4	0.00793	Azalış	732.5572	7.12
Thromboksan A2	1.5	0.00885	Azalış	352.4651	4.68
Kolin	1.5	0.00971	Azalış	104.1079	3.38
Normetanefrine	1.5	0.00978	Artış	184.0954	2.18
PC(18:1(9Z)/18:1(9Z))	10.4	0.00172	Azalış	786.1134	14.80
LysoPE(0:0/20:1(11Z))	2.5	0.00152	Azalış	508.3431	14.93
11H-14.15-EETA	4.1	0.00199	Azalış	336.4657	11.23
Urat-3-ribonükleosit	1.5	0.00207	Artış	301.0767	14.52
Thromboksan B2	2.7	0.00583	Azalış	368.4645	8.48
23S.25- Dihidroksivitamin D3	1.3	0.00624	Azalış	416.6365	5.03
L-Triptofan	1.4	0.00931	Artış	204.2252	2.99
Prostaglandin D2-1-gliseril ester	2.9	0.00272	Artış	426.5436	2.13
L-Kinurenin	3.3	0.00253	Artış	204.2252	13.4
L-Metiyonin	1.8	0.00284	Azalış	150.0592	2.15
1.25- Dihidroksivitamin D3-26.23-lactone	3.1	0.00464	Azalış	444.6249	5.12
Kalsidiol	1.9	0.00476	Azalış	400.6371	4.71
L-Fenilalanin	1.6	0.00527	Azalış	165.1891	2.12
2.5-Dimetil-3-propilpirazine	1.6	0.00782	Artış	151.1232	13.63
Histamin fosfate	2.1	0.00454	Azalış	308.0403	3.68
Tirozin metilester	1.5	0.00580	Azalış	195.2151	2.12
5-Aminoimidazol ribonukleotit	1.8	0.00981	Azalış	296.0665	2.17
3-Guanidinopropanoat	1.5	0.00284	Azalış	132.0776	2.17
Kalsitroik asit	1.7	0.00499	Azalış	374.5137	14.91
Nervonil karnitine	1.7	0.04667	Artış	102.1286	7.89
2-(a-Hidroksietil)tiamin difosfat	1.9	0.00882	Azalış	469.0712	2.12
Retinil ester	2.0	0.00425	Azalış	313.4538	5.14
Indolakrilik asit	1.7	0.00600	Azalış	188.0716	6.64
L-Sistein	2.6	0.00478	Azalış	240.3921	3.22
L-Lösin	1.8	0.00635	Azalış	132.1026	3.59
L-İzolösin	1.9	0.00756	Azalış	131.1742	3.21
Beta-Alanin	3.7	0.00426	Azalış	89.0932	3.11
N-Acetil-L-alanin	1.8	0.00685	Azalış	131.1299	3.59
Oksaloasetik asit	2.5	0.00512	Azalış	132.0716	4.49

L-Valin	3.1	0.00779	Azalış	117.1542	3.28
Urat-3-ribonukleosit	1.8	0.00900	Artış	301.0770	5.03
L-Histidin	2.1	0.00921	Artış	155.1546	14.51
Oksidized glutatyon	1.7	0.00926	Artış	612.6317	0.86
7alfa-Hidroksi-3-okso-4-kolestenoat	3.1	0.00348	Azalış	430.6291	3.52
Dekanoilkarnitin	9.4	0.00428	Azalış	315.4482	14.83
PE(18:2(9Z.12Z)/22:2(13Z.16Z))	10.2	0.00615	Azalış	796.5826	14.83

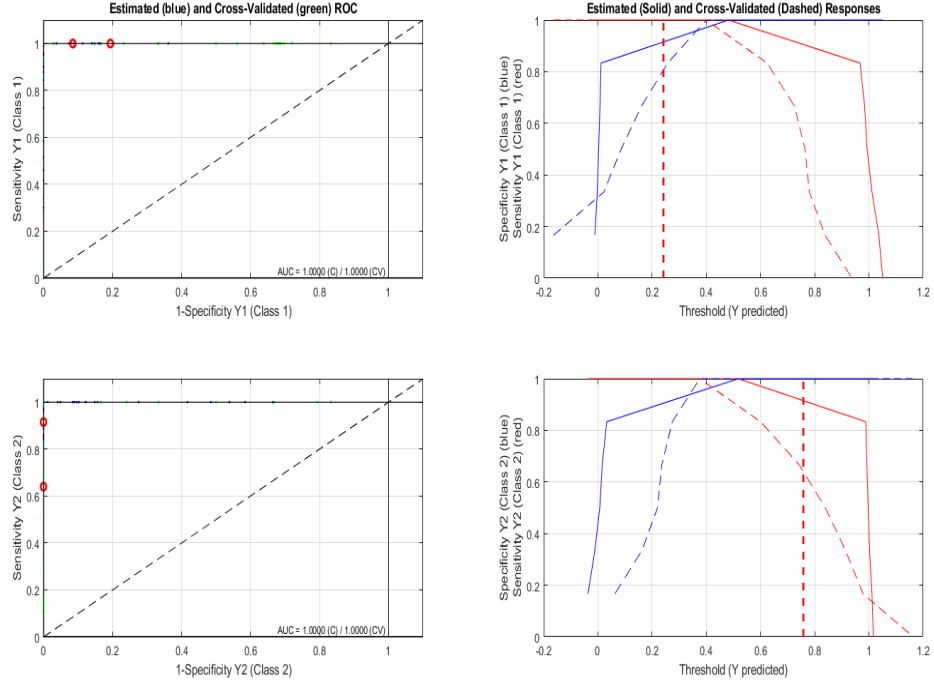
4.5.2. Kemometrik Analiz

Tanımlanan metabolitlerin m/z oranları MATLAB R2017b programına aktarıldı. İlaç uygulanan ve uygulanmayan rat gruplarının plazma örneklerinde farklılık gösteren önemli metabolitler ve oluşturulan bu grupların regresyon katsayıları ortogonal kısmi en küçük kareler diskriminant analizi (OPLS-DA) kullanılarak belirlendi. Sınıflandırmayı açıklamak için kullanılan latent değişken skoru 1 (LV1), latent değişken skoru 2 (LV2) ve latent değişken skoru 3 (LV3) kullanıldı. İlaç grubu ve kontrol gruplarına ait 2 kümeden oluşan PCA skor grafikleri elde edildi (Şekil 4.24. A, 4.24. B, 4.24. C). PCA skor grafiklerinde iki gruba ait numunelerin birbirlerinden ayrı kümelenmesi, ilaç ve kontrol gruplarına ait metabolik profiller arasında önemli farklılıklar olduğunu göstermektedir. Silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinatın beş gün oral uygulanması, ratların metabolik özelliklerini değiştirdiği kemometrik analizlerle ortaya konulmuştur.

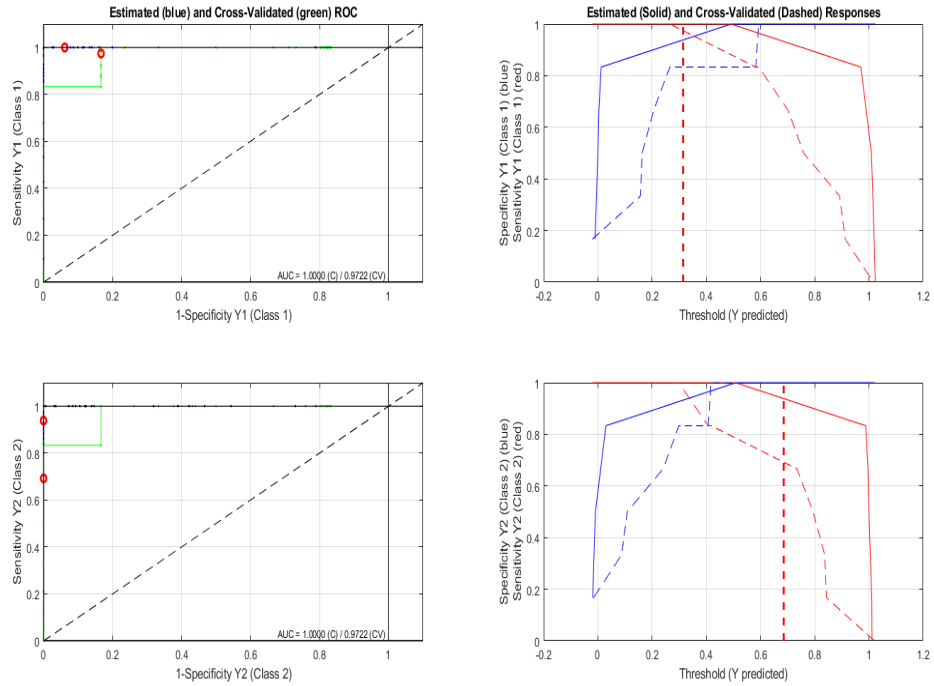


Şekil 4.23. İlaç ve kontrol gruplarının OPLS-DA skor grafiği A) silodosin B) tamsulosin C) solifenasin süksinat

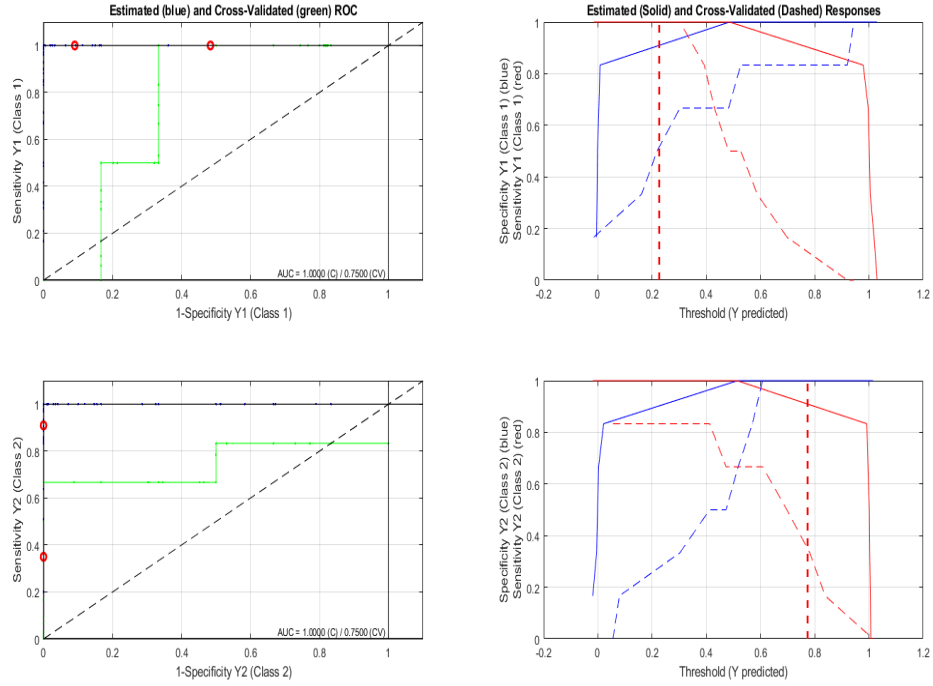
İlaç uygulanan ve kontrol gruplarının metabolit profillerinin ayrılmasını sağlayan metabolitlerin varlığı OPLS-DA analizi ile gösterildi. Modelin değişkeninin ve öngörüsünün geçerliliğini değerlendirmek için çapraz geçerlilik testleri uygulandı. Latent değişkenleri vasıtasıyla yöntemlerin silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat için sırasıyla %95.48, 94.73 ve 96.13'lük kısmı açıklanabilmektedir. Analiz gerçekleştirilmeden önce elde edilen veriler ön işleme tabi tutuldu. Ön işleme kısmı pareto scaling ile gerçekleştirildi. Önerilen modeli açıklamak için dört latent değişken ve Çapraz Doğrulamanın Karekök Ortalama Hatası (RMSEC) seçildi. Modellerin kararlılığı ve güvenilirliği R^2 Cal değeri ile verildi. RMSEC ve Çapraz Validasyonun Karekök Ortalama Hatası (RMSECV) değerlerinin birbirine yakın olması seçilen metabolitlerle uygulanan küme analizinin hatasının oldukça düşük olduğunu ve güvenilirliğinin yüksek olduğunu göstermektedir. RMSEC ile model kalibrasyonuna dataların yakınlığı belirlenirken, RMSECV ile geçerlilik testlerinin veri setinin kalibrasyon veri setine uzaklığı hesaplanır. Bu iki değer birbirine yakın olması seçilen parametrelerin modele uygunluğunun yüksek olduğunu göstermektedir. Modellerin hassasiyeti ve seçiciliği, ROC (Receiver Operator Characteristics Curve) eğrilerine ait eğri altında kalan alan (AUC) ile belirlendi (Şekil 4.25., 4.26. ve 4.27.). AUC'nin 1'e yakın olması modelin hassasiyet ve seçiciliğinin iyi olduğunu, R^2 Cal değerinin 1'e yakın olması ise değişkenler ile veri setimiz arasında çok yüksek bir korelasyon olduğunu göstermektedir. OPLS-DA modeli ile X bloğunun ön işlenmesi için Ortogonal Sinyal Düzeltme (OSC) seçildi. Matrisin, Y bloğu için de 1 ve 0 yapay değişken olarak oluşturuldu. Her ilaç grubu için elde edilen değerler Tablo 4.37'de verildi.



Şekil 4.24. Silodosin ve kontrol gruplarına ait ROC eğileri



Şekil 4.25. Tamsulosin ve kontrol gruplarına ait ROC eğileri



Şekil 4.26. Solifenasin süksinat ve kontrol gruplarına ait ROC eğileri

Tablo 4.37. Model gruplarının OPLS-DA analizinden elde edilen verilerin istatistiksel analiz sonuçları

Parametreler	Silodosin	Tamsulosin	Solifenasin Süksinat
Hassasiyet	1.000	0.9722	0.750
Seçicilik	1.000	0.9722	0.750
R ² Cal	0.997856	0.998888	0.999145
RMSEC	0.0231542	0.0166757	0.0146218
RMSECV	0.230485	0.267352	0.462313

4.5.3. Metabolitlerin Yolak Analizi

Her bir ilaç grubu için ayrı ayrı tanımlanan metabolitlerin birçok metabolik yolak üzerinde etkili olduğu belirlendi. Aralarında anlamlı farklılık bulunan metabolitlerin Kyoto Genler ve Genom Ansiklopedisi (KEGG) ve Metaboanalyst 4.0

kullanılarak detaylı yolak analizi gerçekleştirildi. Bu metabolik yollar ve etkileri Kyoto Genler ve Genom Ansiklopedisi (KEGG) ve Metaboanalyst 4.0 veritabanlarından alınan şekiller ile gösterildi. Silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinatın kronik uygulandığı rat gruplarında değişikliğe uğrayan metabolik yollar Tablo 38, 39 ve 40’da verildi.

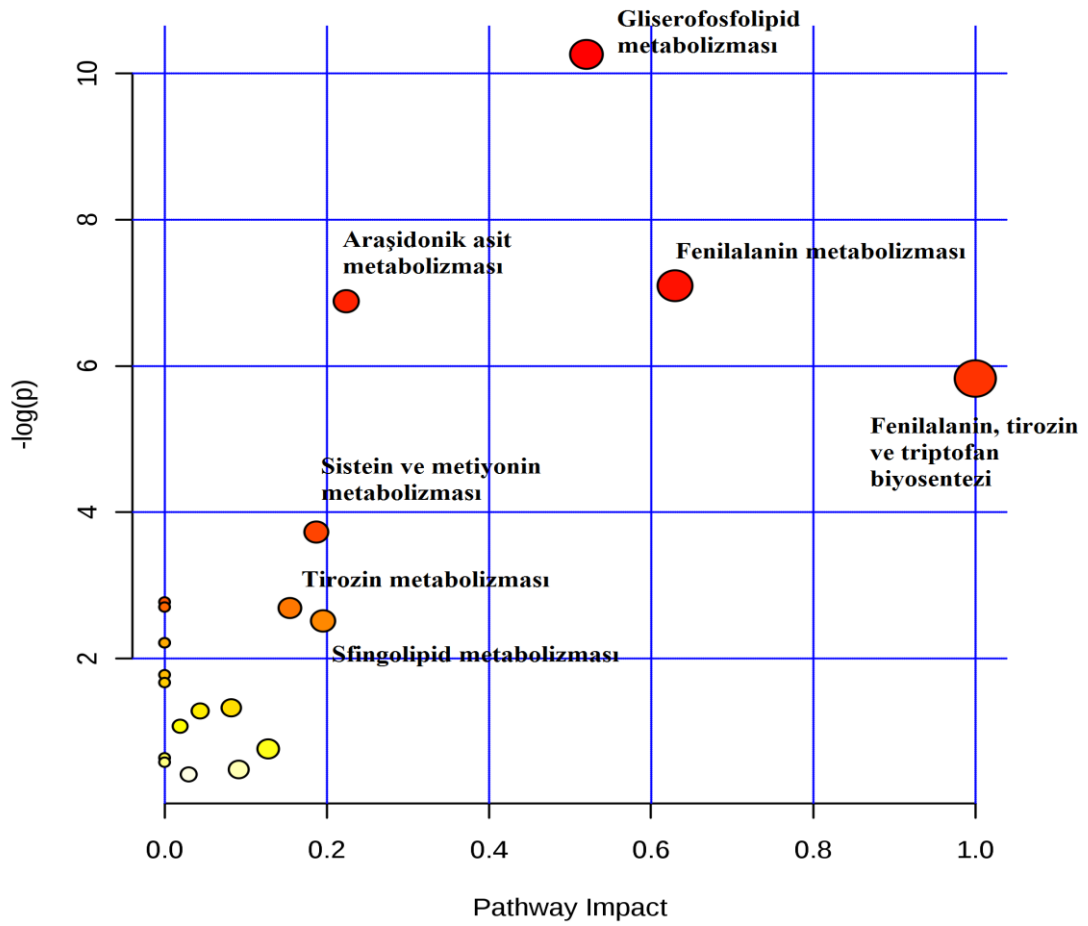
4.5.3.1. Silodosin

Tablo 4.38. Metabolom analizinde silodosin plazma örneklerinin yolak analizi

Yolak İsmi	Eşleşen Metabolit	P Değeri	-Log(p)
Gliserofosfolipid Metabolizması	6/30	3.5×10^{-5}	10.26
Fenilalanin Metabolizması	3/9	8.276×10^{-4}	7.097
Araşidonik Asit Metabolizması	5/36	0.001023	6.885
Fenilalanin, Tirozin Ve Triptofan Biyosentezi	2/4	0.0029443	5.8279
Sistein Ve Metiyonin Metabolizması	3/28	0.024023	3.7287
Aminoasit-Trna Biyosentezi	4/67	0.062483	2.7729
Ubikinon Ve Kinon Biyosentezi	1/3	0.066969	2.7035
Tirozin Metabolizması	3/42	0.067876	2.6901
Sfingolipid Metabolizması	2/21	0.080956	2.5139
D-Glutamin Ve D-Glutamat Metabolizması	1/5	0.10918	2.2148
Linoleik Asit Metabolizması	1/5	0.10918	2.2148
Taurin Ve Hipotaurin Metabolizması	1/8	0.16905	1.7776
Alfa-Linolenik Asit Metabolizması	1/9	0.18812	1.6707
Arginin Ve Prolin Metabolizması	2/44	0.26568	1.3255
Glikosilfosfatidilinositol (GPI) -Anchor Biyosentezi	1/14	0.27731	1.2826
Gliserolipid Metabolizması	1/18	0.34175	1.0737

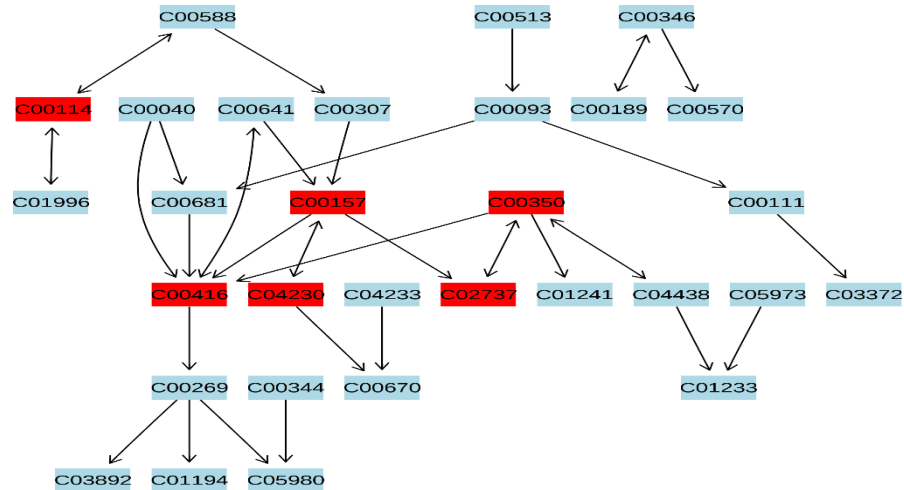
Purin Metabolizması	2/68	0.46592	0.76374
Steroid Biyosentezi	1/35	0.55877	0.58201
Triptofan Metabolizması	1/41	0.61733	0.48235
Birincil Safra Asidi Biyosentezi	1/46	0.66031	0.41504

Metabolitlerin anlamlı derecede ilişkili oldukları yollar Şekil 4.28’de gösterildi.



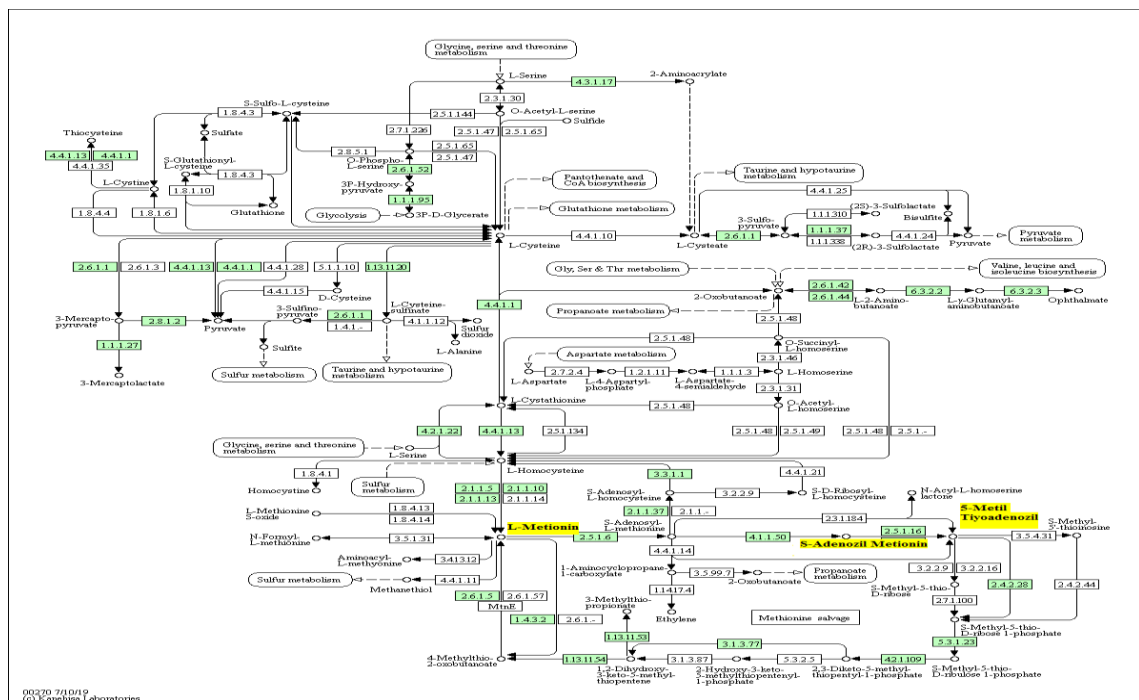
Şekil 4.27. Silodosin plazma örneklerinde tanımlanan metabolitlerin anlamlı derecede ilişkili oldukları yolların etki değerleri

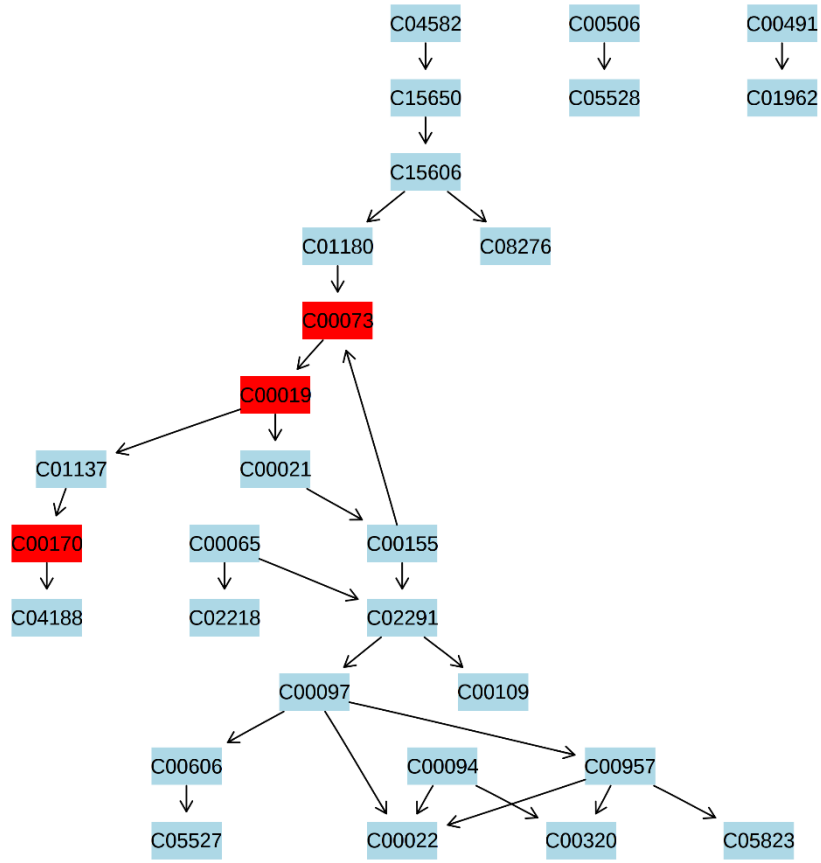
Gliserofosfolipit Metabolizması



Şekil 4.28. Silodosin uygulanan rat grubunda Gliserofosfolipit Metabolizmasında etkili metabolitler C00114(kolin), C00157 (fosfotidilkolin (lesitin)), C00350 (fosfatidiletanolamin (sefalin)), C00416 (PA(16:0/16:0)), C04230 (LysoPC(18:1(9Z))), C02737 (PS(16:0/16:0))

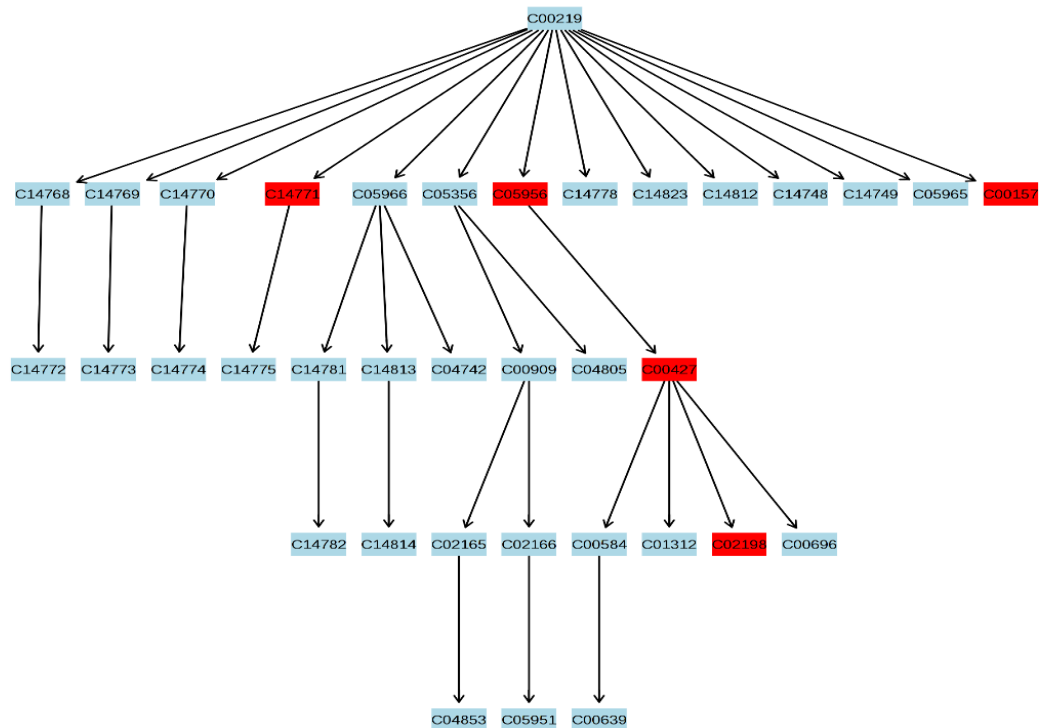
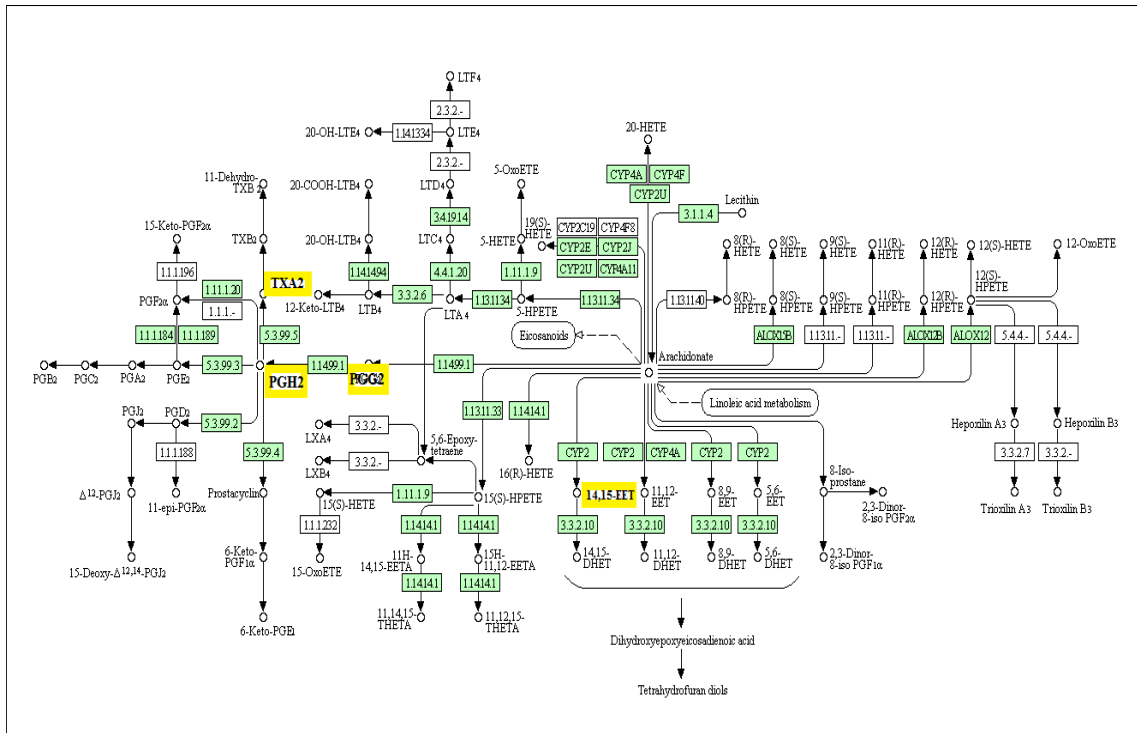
Sistein ve Metionin Metabolizması





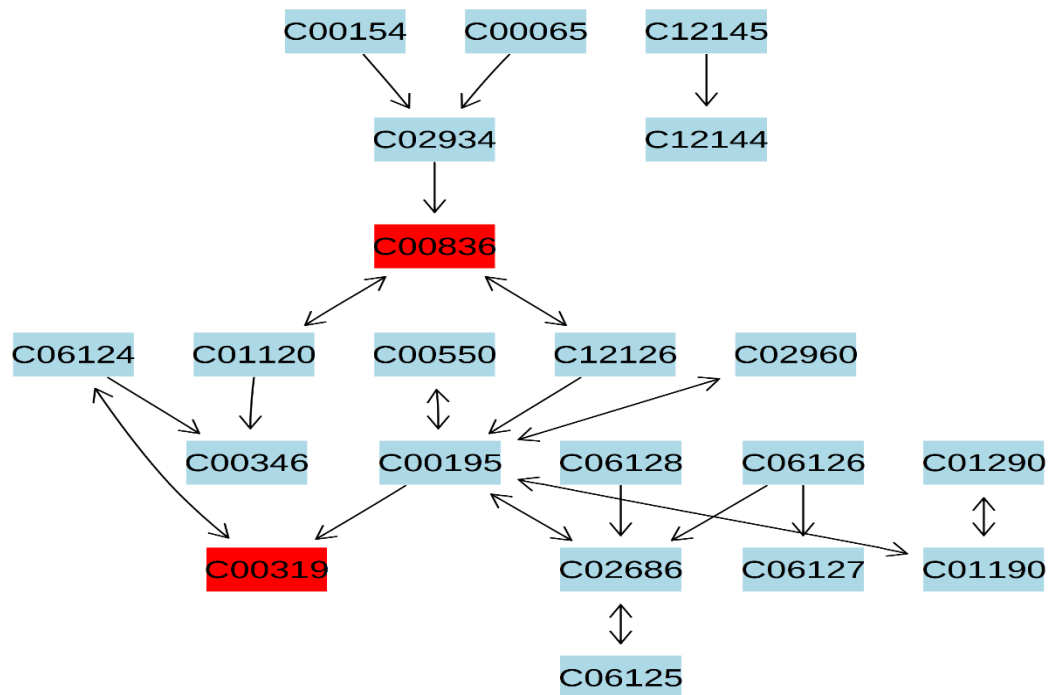
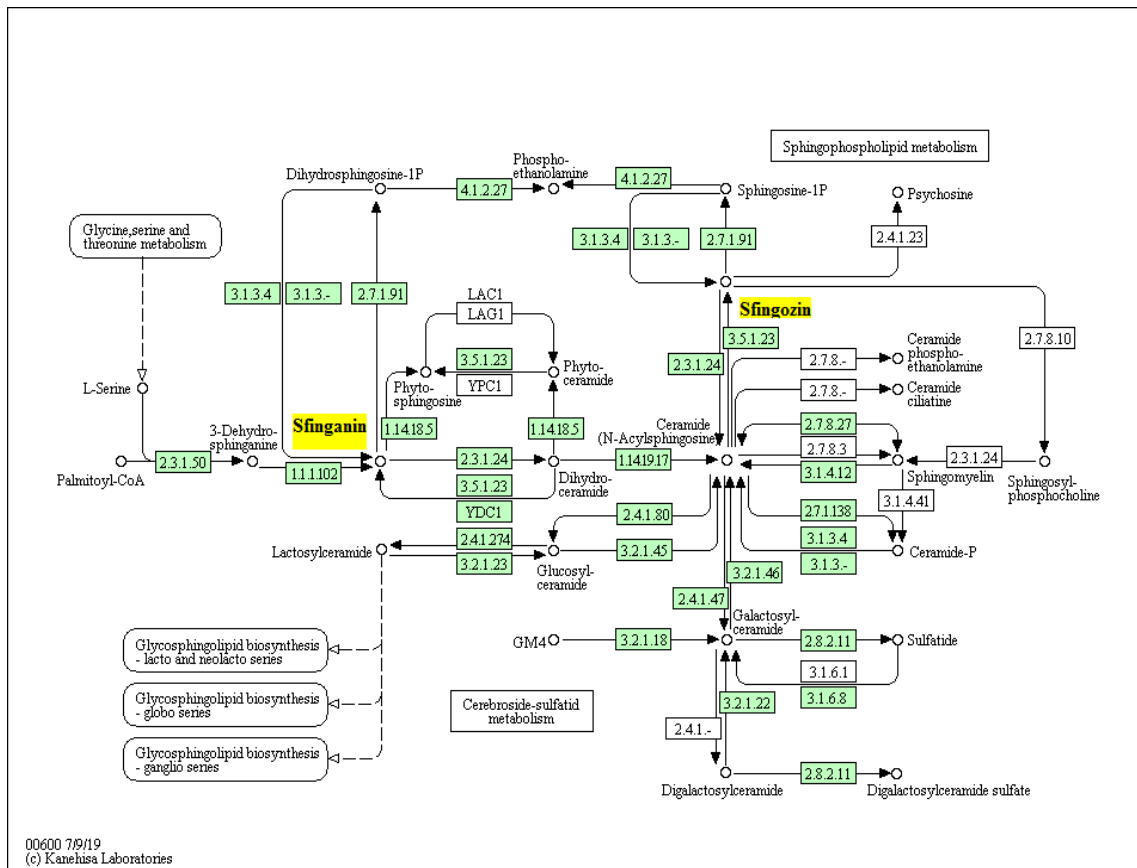
Şekil 4.29. Silodosin uygulanan rat grubunda Sistein ve Metionin Metabolizmasında etkili metabolitler C00073 (L-Metionin), C00170 (5'-Metiltiyoadenozil), C00019 (S-Adenozilmetiyonin)

Araşidonik Asit Metabolizması



Şekil 4.30. Silodosin uygulanan rat grubunda Araşidonik Asit Metabolizmasında etkili metabolitler C14771 (14.15-EET), C05956 (Prostaglandin G2), C00157 (Fosfotidilkolin), C00427 (Prostaglandin H2), C02198 (Tromboksan A2)

Sfingolipid Metabolizması



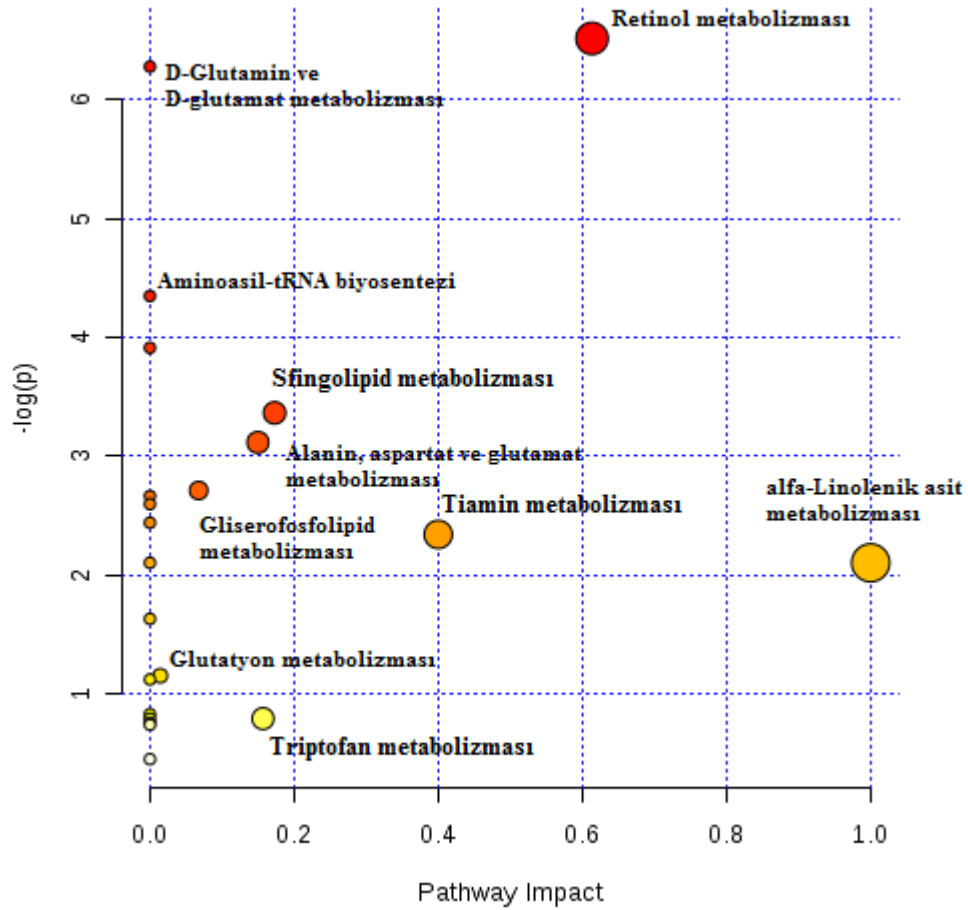
Şekil 4.31. Silodosin uygulanan rat grubunda Sfingolipit Metabolizmasında etkili metabolitler C00836 (Sfinganin), C00319 (Sfingozin)

4.5.3.2. Tamsulosin

Tablo 4.39. Metabolom analizinde tamsulosin plazma örneklerinin yolak analizi

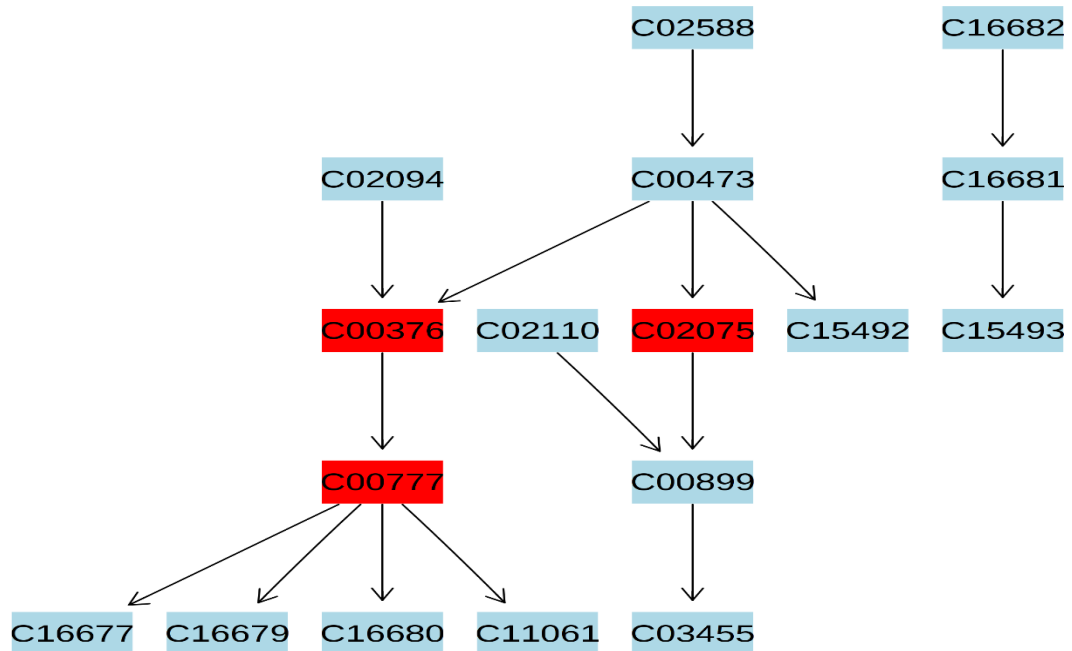
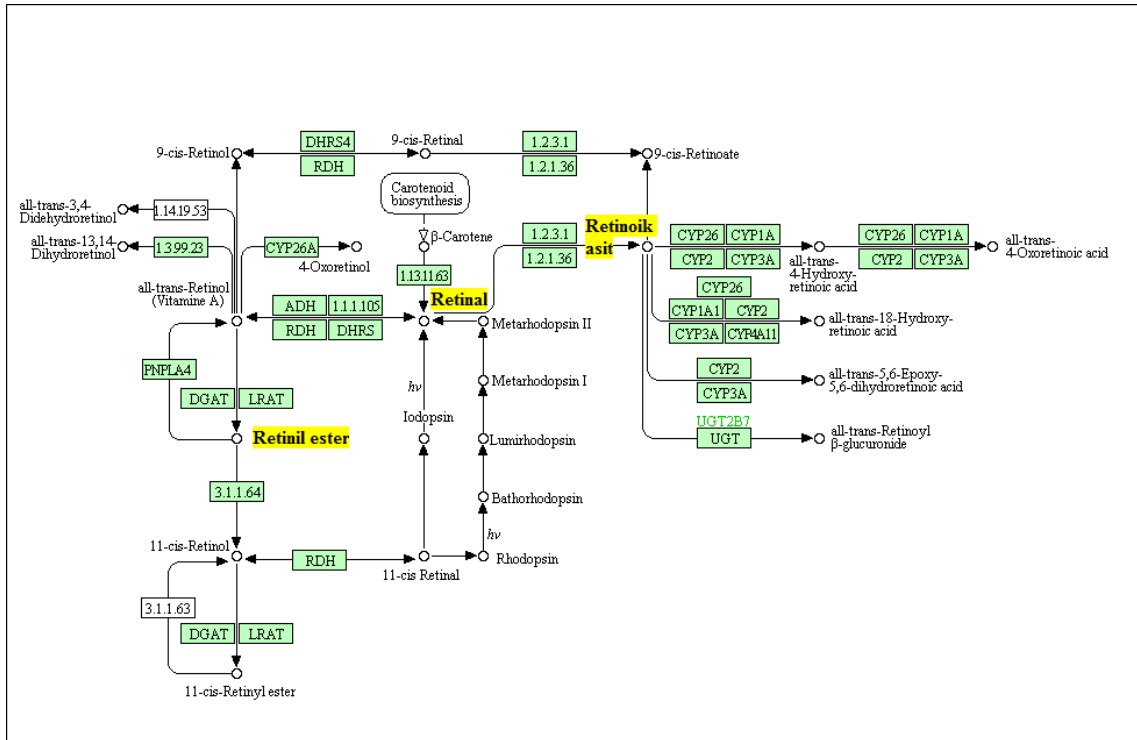
Yolak İsmi	Eşleşen Metabolit	P Değeri	-Log(p)
Retinol Metabolizması	3/17	0.001488	6.5103
D-Glutamin Ve D-Glutamat Metabolizması	2/5	0.0018853	6.2737
Aminoasil-Trna Biyosentezi	4/67	0.012935	4.3478
Doymamış Yağ Asitlerinin Biyosentezi	3/42	0.019991	3.9125
Sfingolipid Metabolizması	2/21	0.034526	3.366
Alanin, Aspartat Ve Glutamat Metabolizması	2/24	0.044234	3.1183
Gliserofosfolipid Metabolizması	2/30	0.066257	2.7142
Biyotin Metabolizması	1/5	0.069417	2.6676
Glisin, Serin Ve Treonin Metabolizması	2/32	0.074281	2.5999
Steroid Biyosentezi	2/35	0.086878	2.4433
Tiamin Metabolizması	1/7	0.095881	2.3447
Azot Metabolizması	1/9	0.12163	2.1068
Alfa-Linolenik Asit Metabolizması	1/9	0.12163	2.1068
Selenoamino Asit Metabolizması	1/15	0.19476	1.636
Glutasyon Metabolizması	1/26	0.31406	1.1582
Mitokondride Yağ Asidi Metabolizması	1/27	0.32403	1.1269
Yağ Asidi Metabolizması	1/39	0.43343	0.83603
Pirimidin Metabolizması	1/41	0.44994	0.79865
Triptofan Metabolizması	1/41	0.44994	0.79865
Yağ Asidi Biyosentezi	1/43	0.46599	0.76359
Arjinin Ve Prolin Metabolizması	1/44	0.47385	0.74687
Purin Metabolizması	1/68	0.63261	0.4579

Metabolitlerin anlamlı derecede ilişkili oldukları yolların etki değerleri Şekil 4.33’de gösterildi.



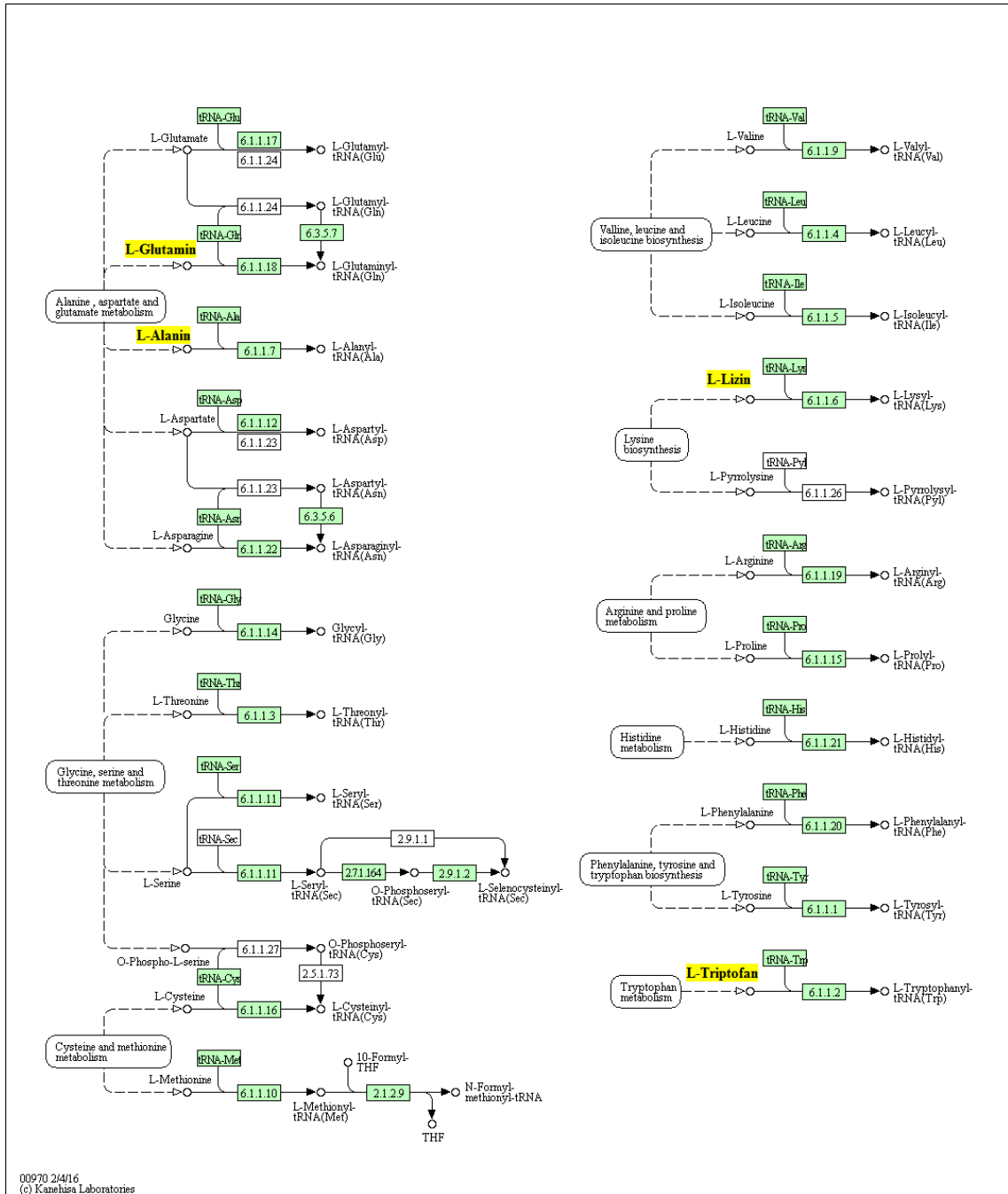
Şekil 4.32. Tamsulosin uygulanan ratların plazma örneklerinde tanımlanan metabolitlerin yolak etki değerleri

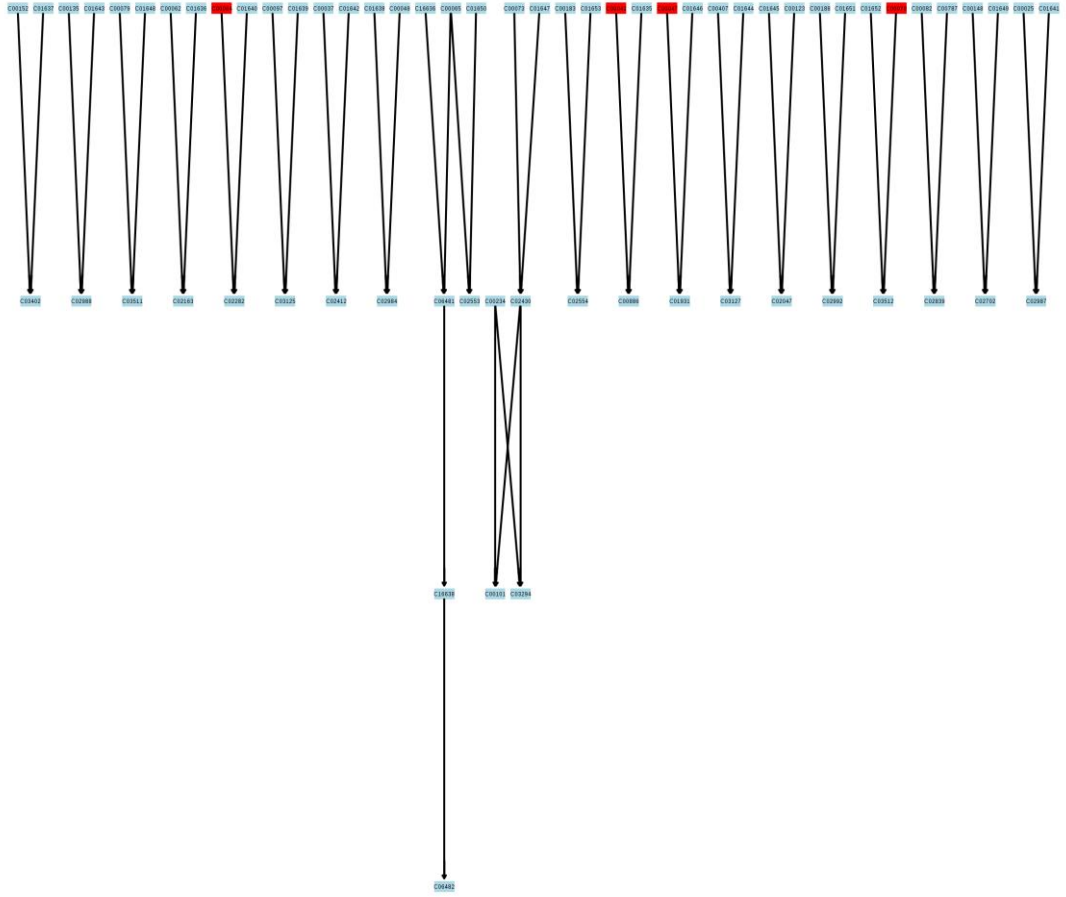
Retinol Metabolizması



Şekil 4.33. Tamsulosin uygulanan ratlarda Retinol Metabolizmasında etkili metabolitler C00376 (Retinal), C02075 (Retinil ester), C00777 (Retinoik asit)

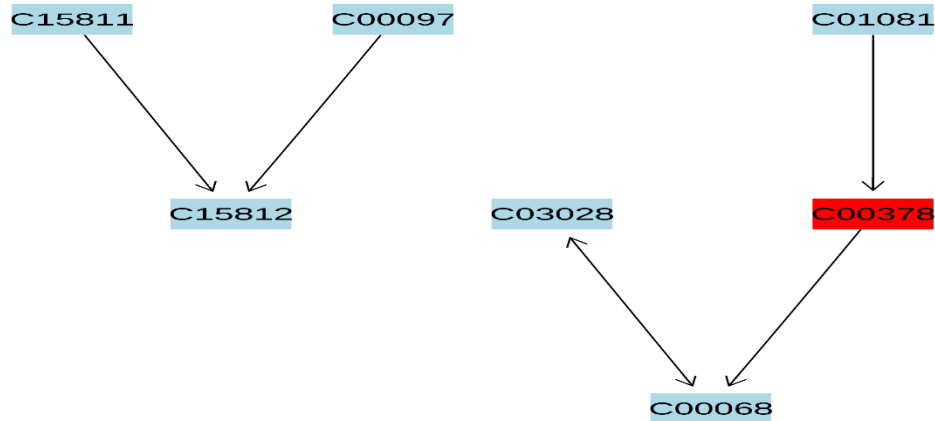
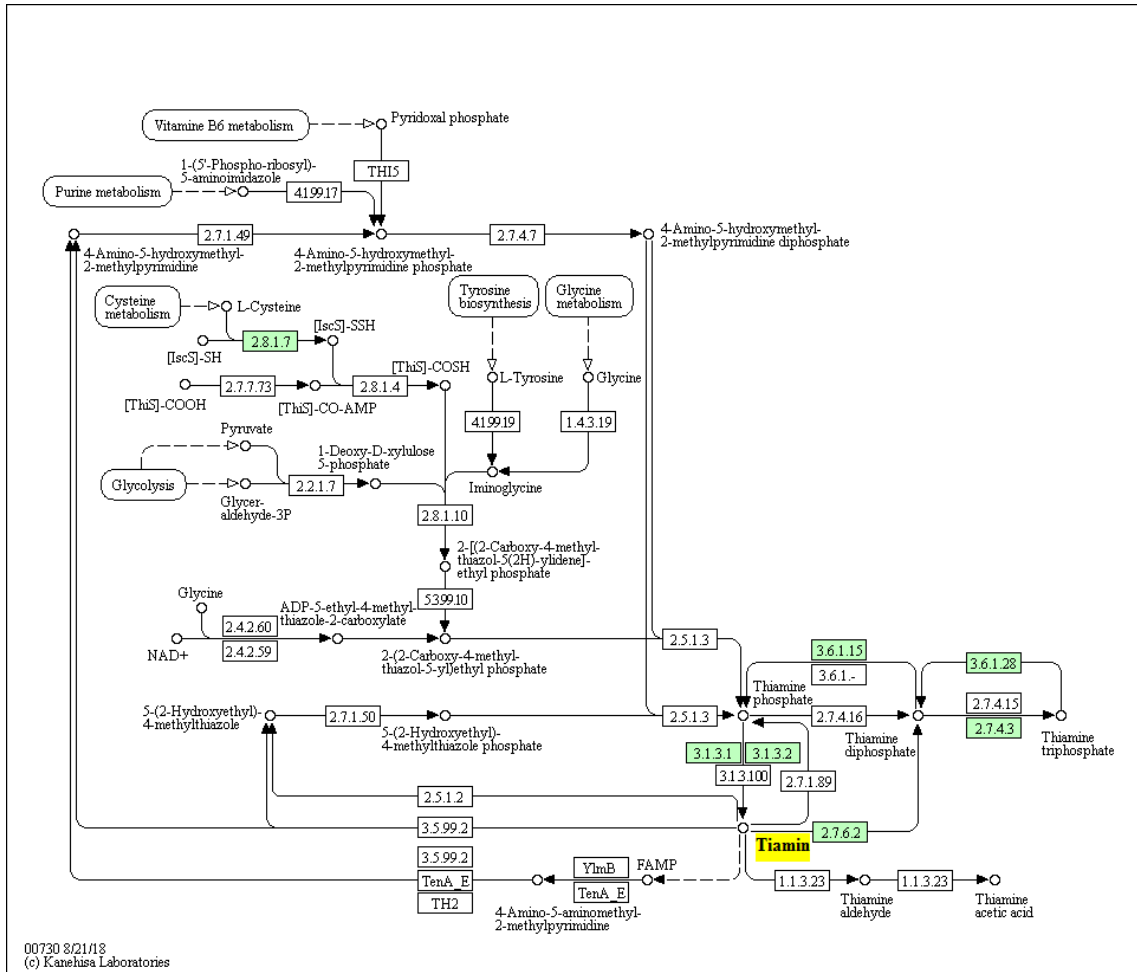
Aminoasil-tRNA Biyosentezi





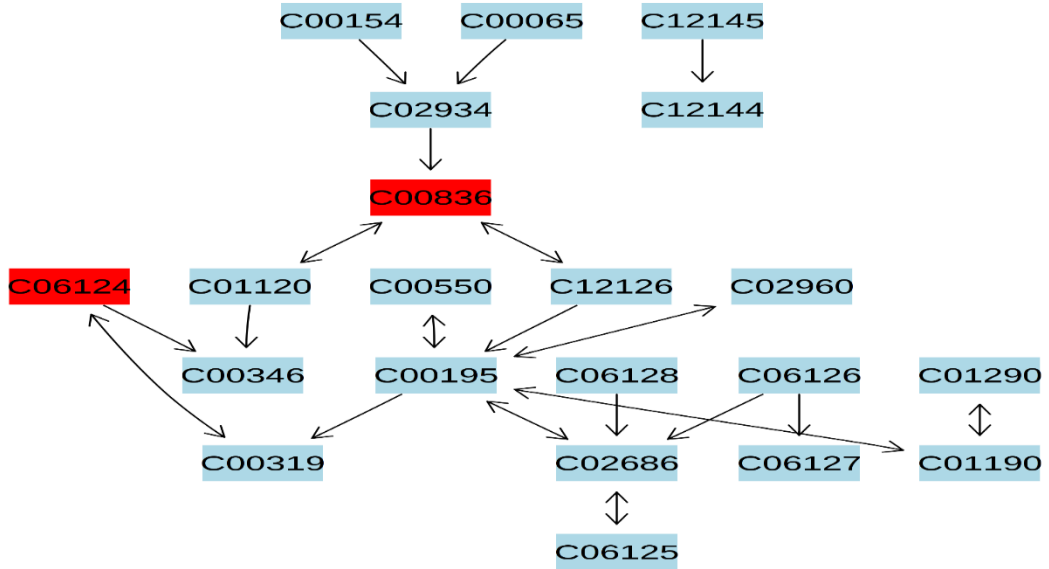
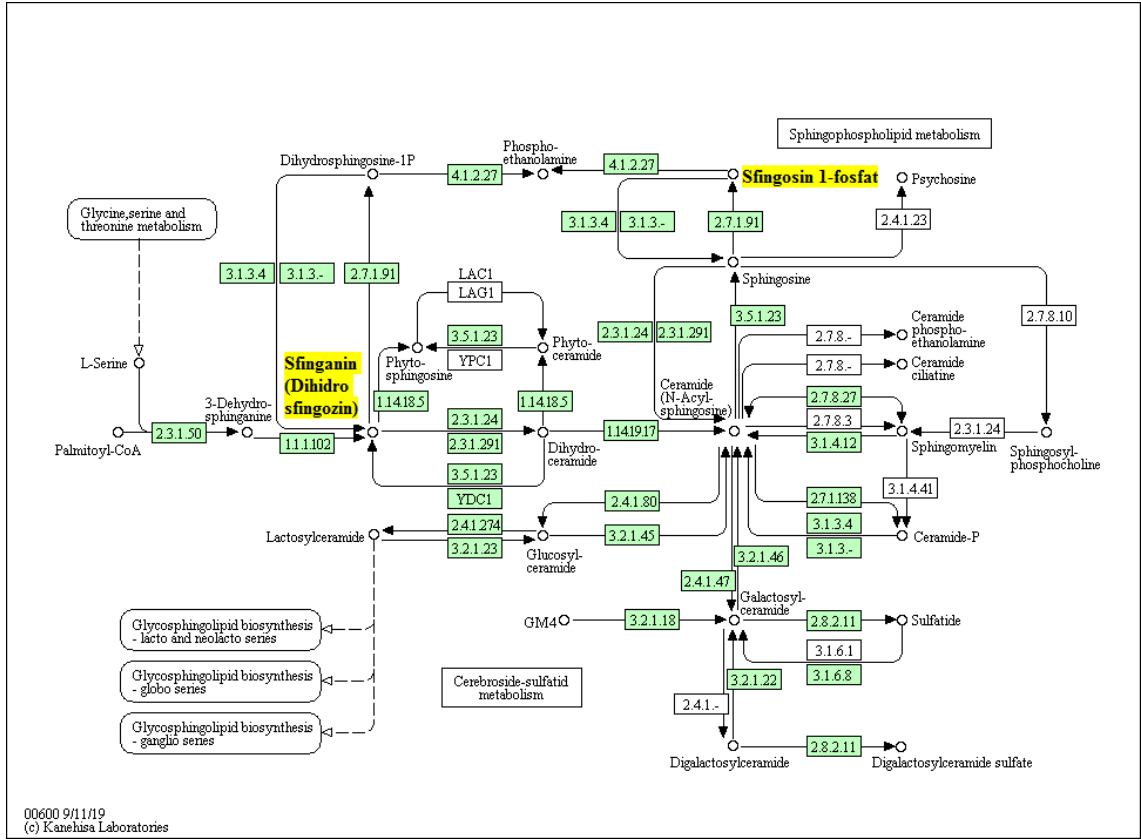
Şekil 4.34. Tamsulosin uygulanan ratlarda Aminoasıl-tRNA Biyosentezinde etkili metabolitler C00064 (L-Glutamin), C00041 (L-Alanin), C00047 (L-Lizin), C00078 (L-Triptofan)

Tiamin Metabolizması



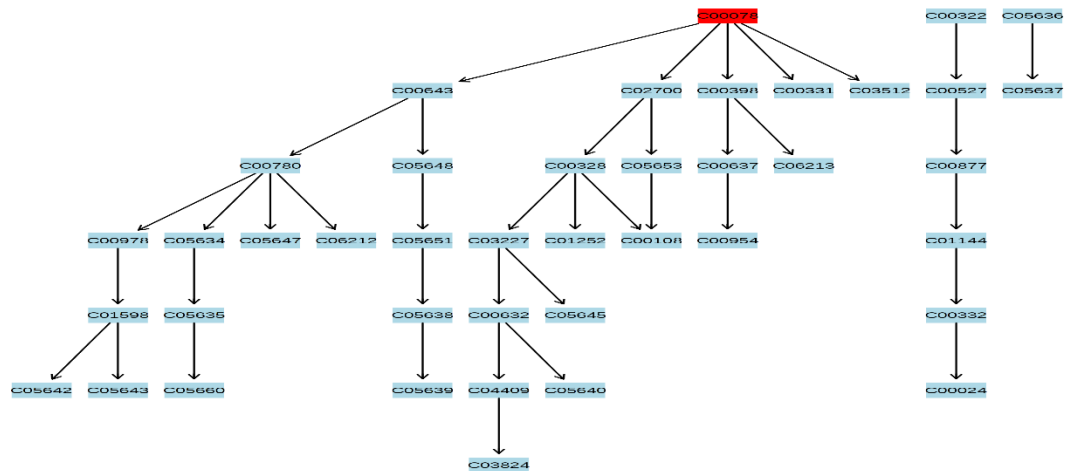
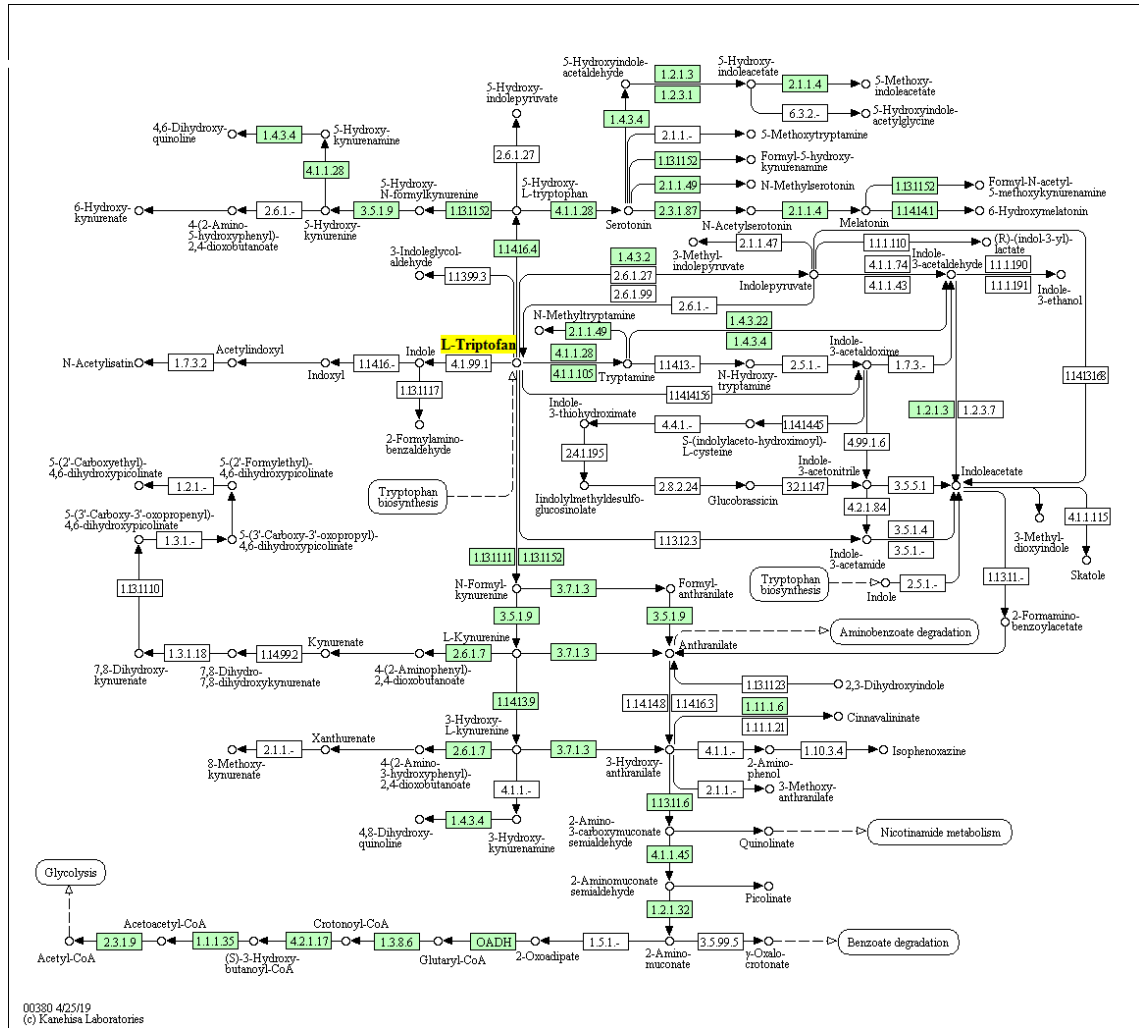
Şekil 4.35. Tamsulosin uygulanan ratlarda Tiamin Metabolizmasında etkili metabolit C00378 (Tiamin)

Sfingolipit Metabolizması



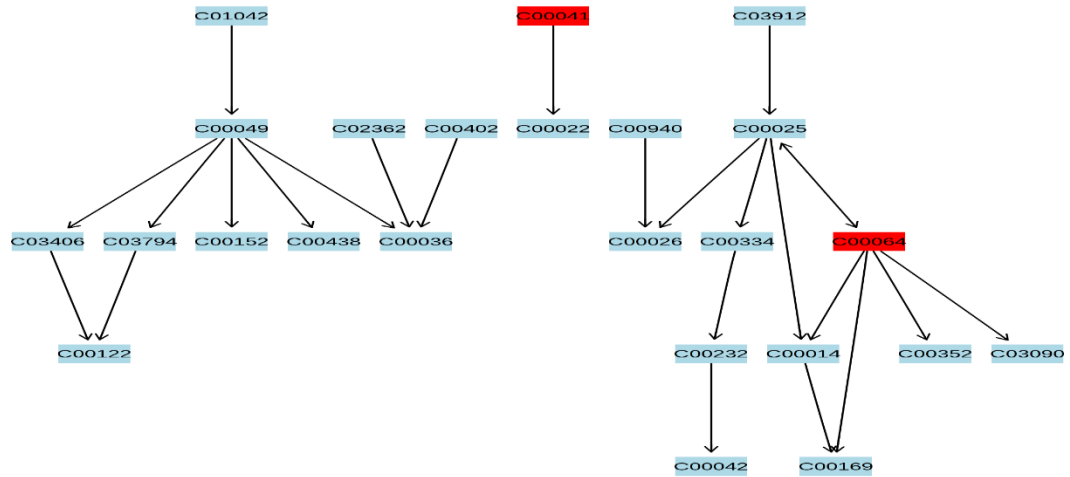
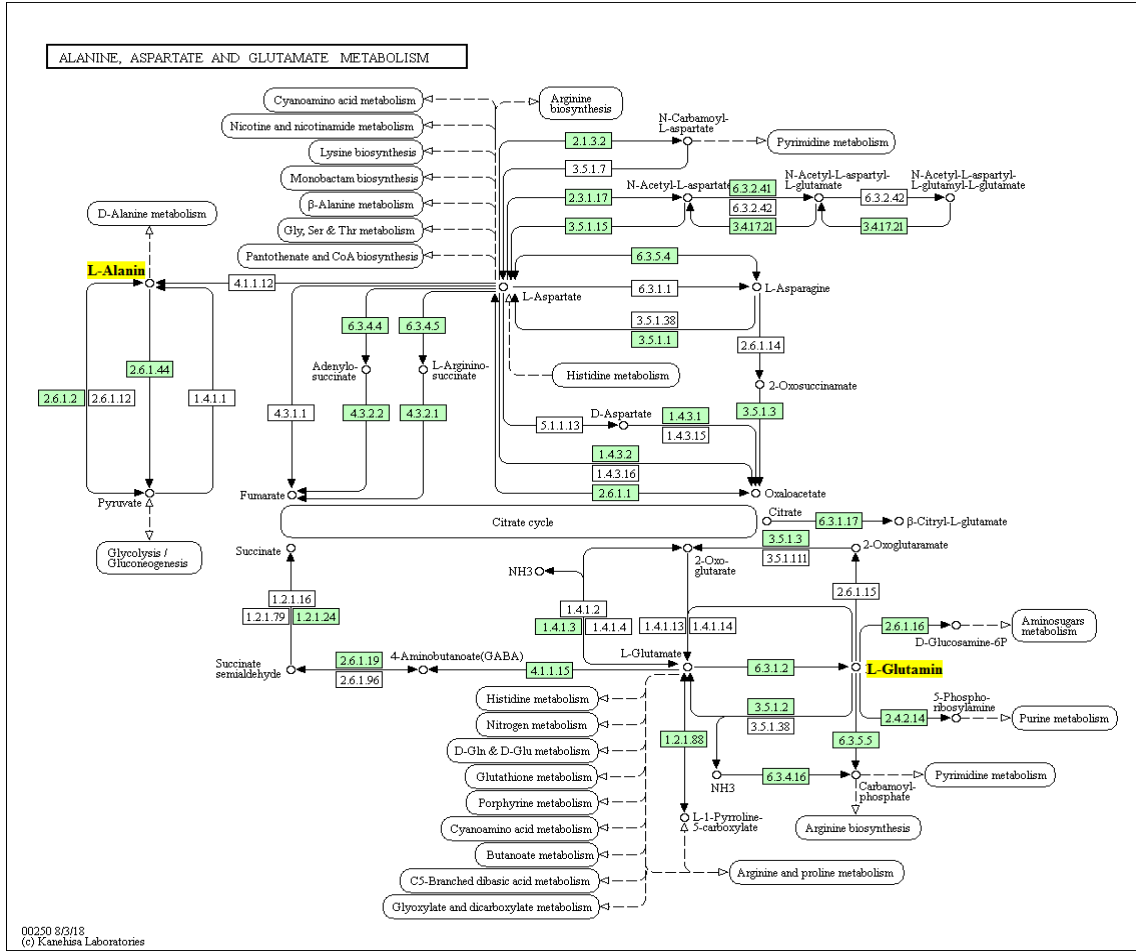
Şekil 4.36. Tamsulosin uygulanan ratlarda Sfingolipit Metabolizmasında etkili metabolitler C00836 (Sfinganin), C06124 (Sfngozin 1-fosfat)

Triptofan Metabolizması



Şekil 4.37. Tamsulosin uygulanan ratlarda Triptofan Metabolizmasında etkili metabolit C00078 (L-Triptofan)

Alanin, Aspartat ve Glutamat Metabolizması



Şekil 4.38. Tamsulosin uygulanan ratlarda Alanin, Aspartat ve Glutamat Metabolizmasında etkili metabolitler C00041 (L-Alanin), C00064 (L-Glutamat)

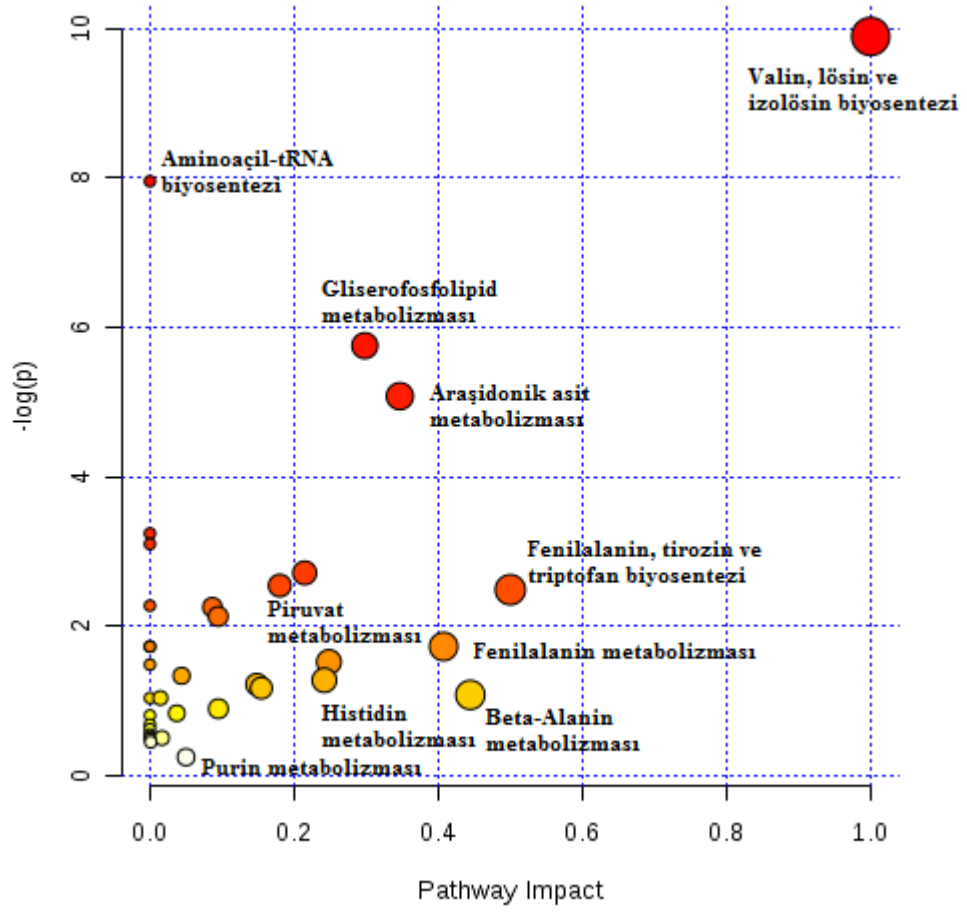
4.5.3.3. Solifenasin Süksinat

Tablo 4.40. Metabolom analizinde solifenasin süksinat plazma örneklerinin yolak analizi

Yolak İsmi	Eşleşen Metabolit	P Değeri	-log (p)
Valin, Lösin Ve İzolösin Biyosentezi	4/11	5.079×10 ⁻⁵	9.8876
Aminoasıl-Trna Biyosentezi	7/67	3.521×10 ⁻⁴	7.9515
Gliserofosfolipid Metabolizması	4/30	0.003174	5.7528
Araşidonik Asit Metabolizması	4/36	0.0062368	5.0773
Pantotenat Ve Coa Biyosentezi	2/15	0.039109	3.2414
Valin, Lösin Ve İzolösin Bozulması	3/38	0.045046	3.1001
Sitrat Döngüsü (TCA Döngüsü)	2/20	0.066257	2.7142
Piruvat Metabolizması	2/22	0.078469	2.545
Fenilalanin, Tirozin Ve Triptofan Biyosentezi	1/4	0.08297	2.4893
Linoleik Asit Metabolizması	1/5	0.10265	2.2764
Glikoliz Veya Glukoneogenez	2/26	0.10478	2.2559
Sistein Ve Metiyonin Metabolizması	2/28	0.11874	2.1308
Alfa-Linolenik Asit Metabolizması	1/9	0.17736	1.7296
Azot Metabolizması	1/9	0.17736	1.7296
Fenilalanin Metabolizması	1/9	0.17736	1.7296
Triptofan Metabolizması	2/41	0.2179	1.5237
Doymamış Yağ Asitlerinin Biyosentezi	2/42	0.2259	1.4876
Glikosilfosfatidilinositol (GPI) -Anchor Biyosentezi	1/14	0.26233	1.3382
Histidin Metabolizması	1/15	0.27827	1.2792
Glyoksilat Ve Dikarboksilat Metabolizması	1/16	0.29388	1.2246
Retinol Metabolizması	1/17	0.30916	1.1739
Beta-Alanin Metabolizması	1/19	0.33878	1.0824
Propanoat Metabolizması	1/20	0.35312	1.0409

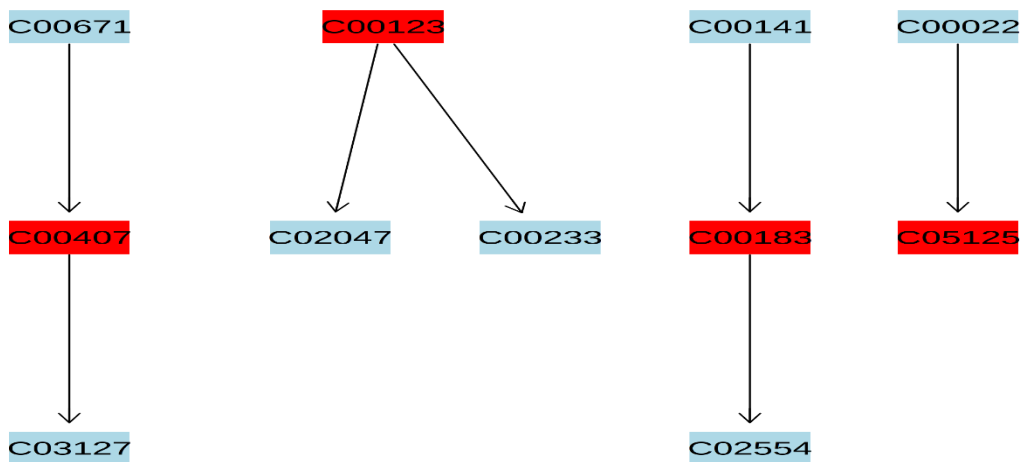
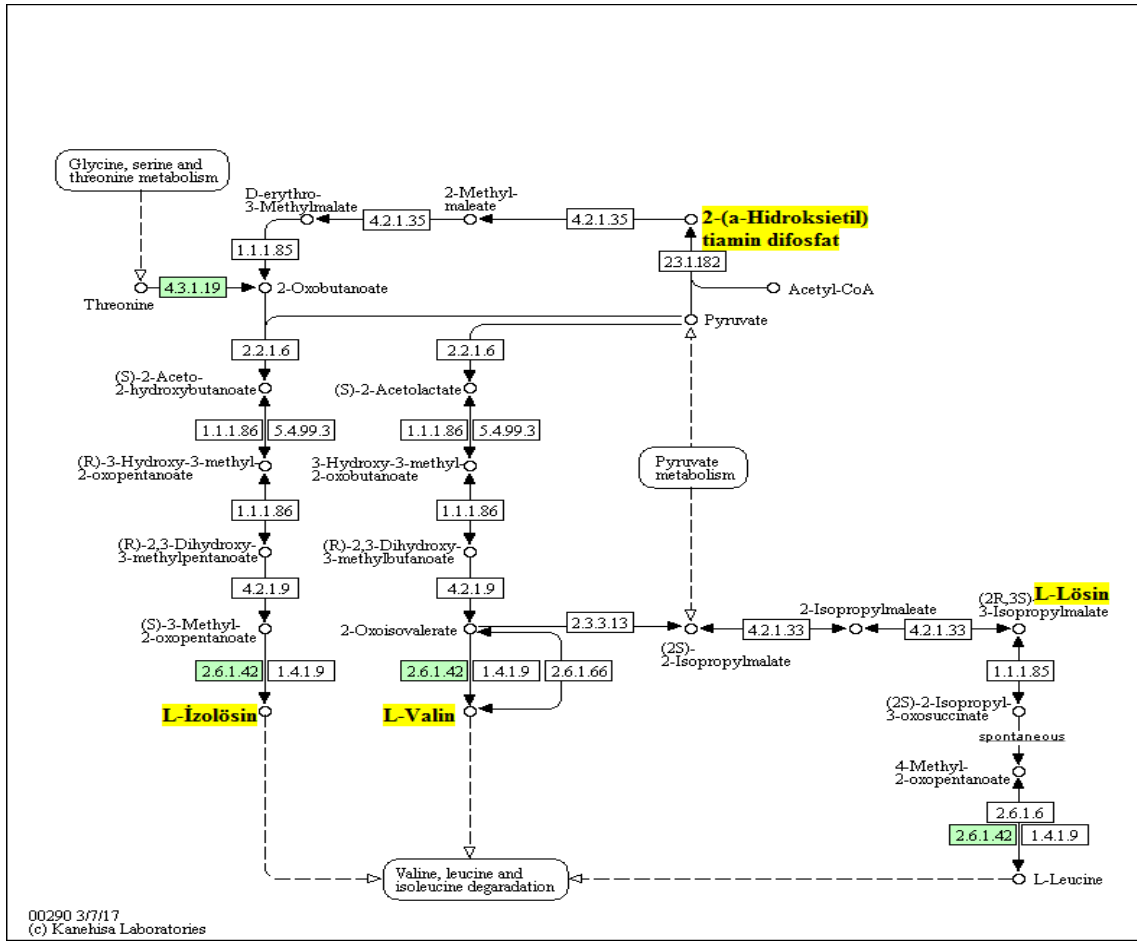
Bütanoat Metabolizması	1/20	0.35312	1.0409
Alanin, Aspartat Ve Glutamat Metabolizması	1/24	0.40754	0.8976
Glutasyon Metabolizması	1/26	0.43307	0.83686
Mitokondride Yağ Asidi Uzaması	1/27	0.44543	0.80872
Glisin, Serin Ve Treonin Metabolizması	1/32	0.50343	0.68632
Steroid Biyosentezi	1/35	0.53536	0.62481
Yağ Asidi Metabolizması	1/39	0.57487	0.55361
Pirimidin Metabolizması	1/41	0.59338	0.52191
Tirozin Metabolizması	1/42	0.60235	0.50692
Yağ Asidi Biyosentezi	1/43	0.61112	0.49247
Birincil Safra Asidi Biyosentezi	1/46	0.63633	0.45205
Purin Metabolizması	1/68	0.77856	0.25032

Metabolitlerin anlamlı derecede ilişkili oldukları yolların etki değerleri Şekil 4.40’da gösterildi.



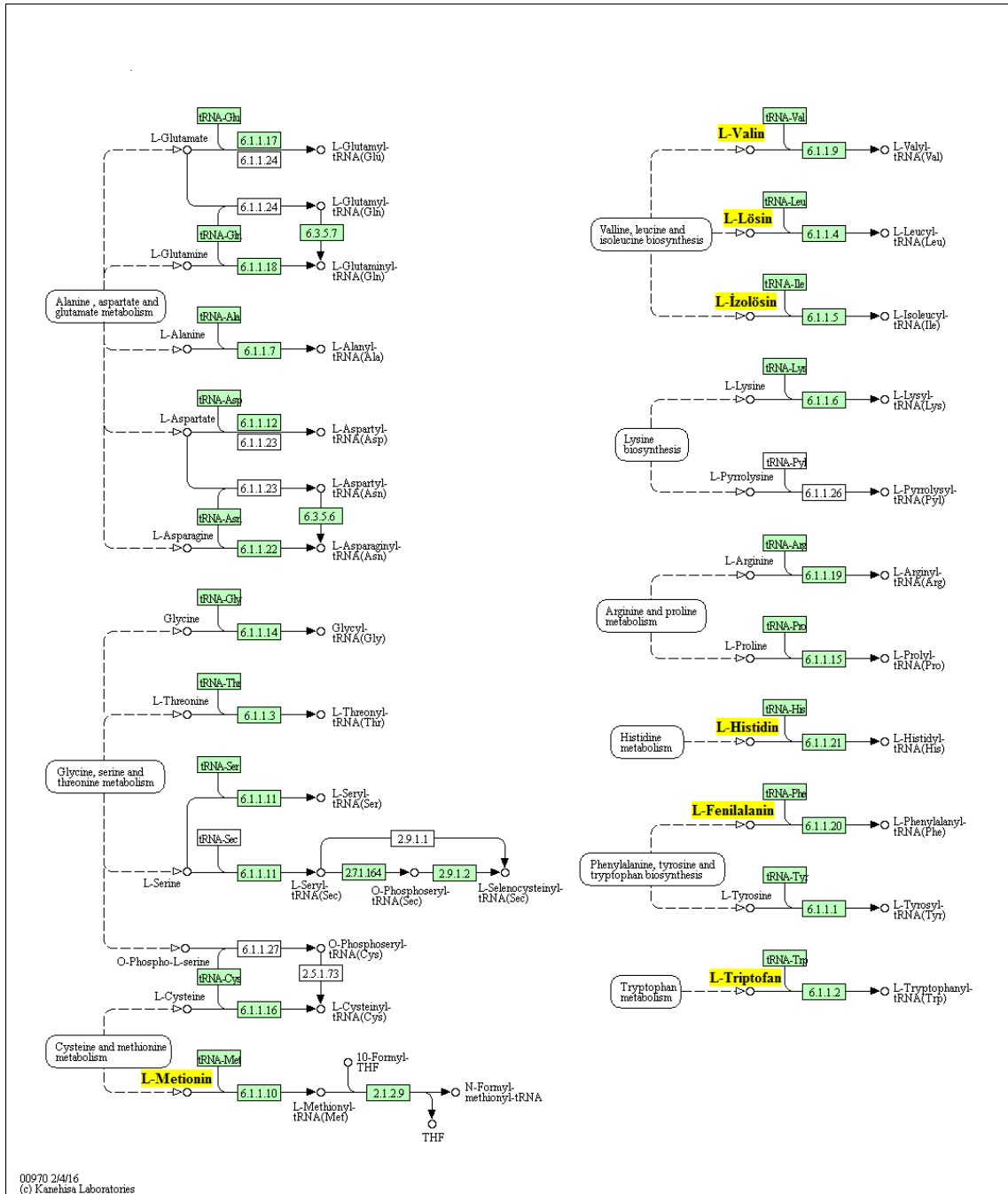
Şekil 4.39. Solifenasin süksinat plazma örneklerinin yolak etki değeri

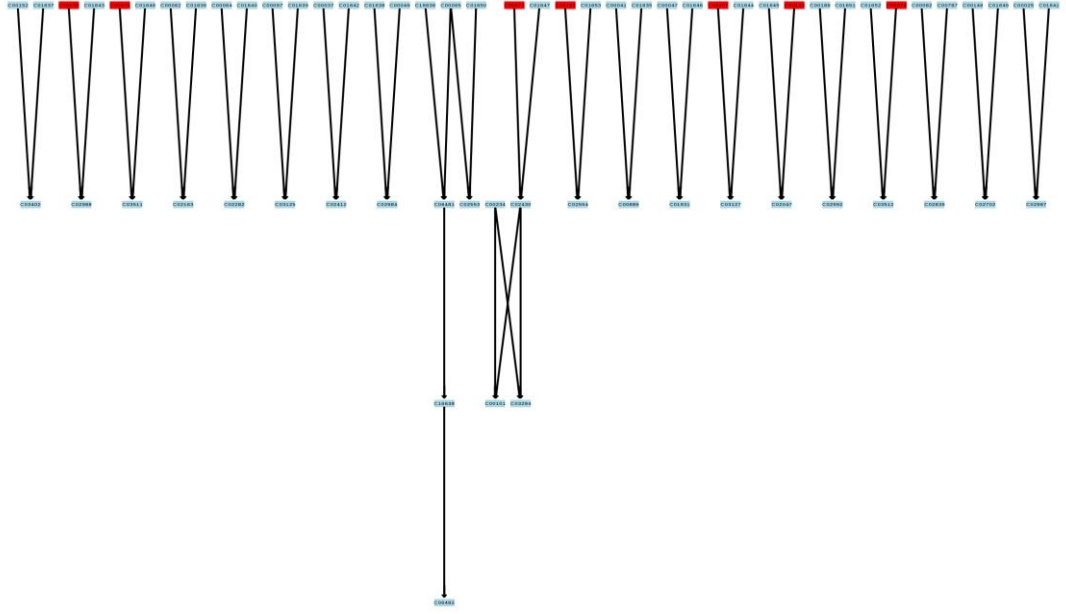
Valin, Lösin ve İzolösin Biyosentezi



Şekil 4.40. Solifenasin süksinat uygulanan ratlarda Valin, Lösin ve İzolösin Biyosentezinde rol alan metabolitler C00123 (L-Lösin), C00407 (L-İzolösin), C00183 (L-Valin), C05125 (2-(a-Hidroksietil)tiyamin difosfat)

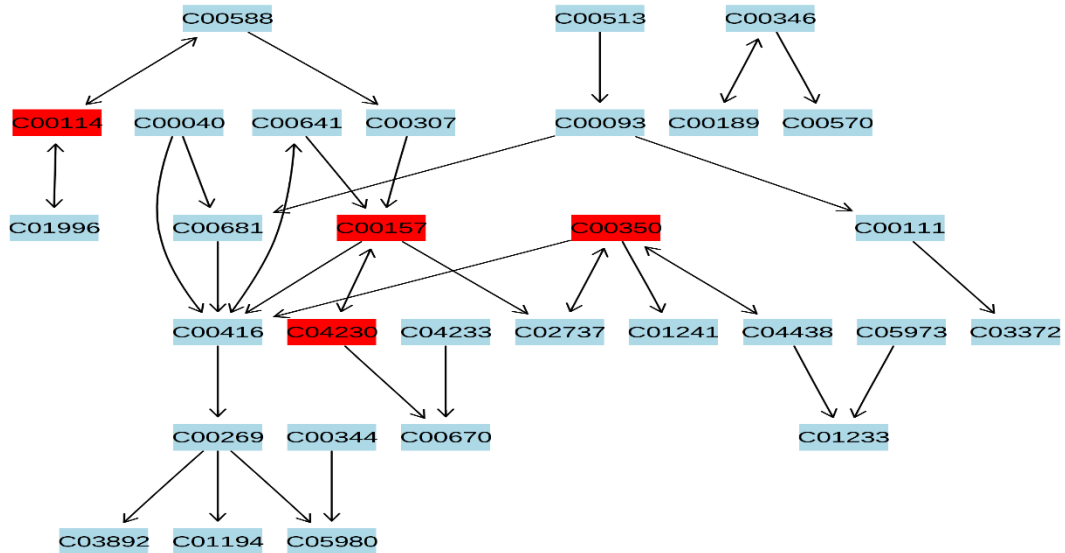
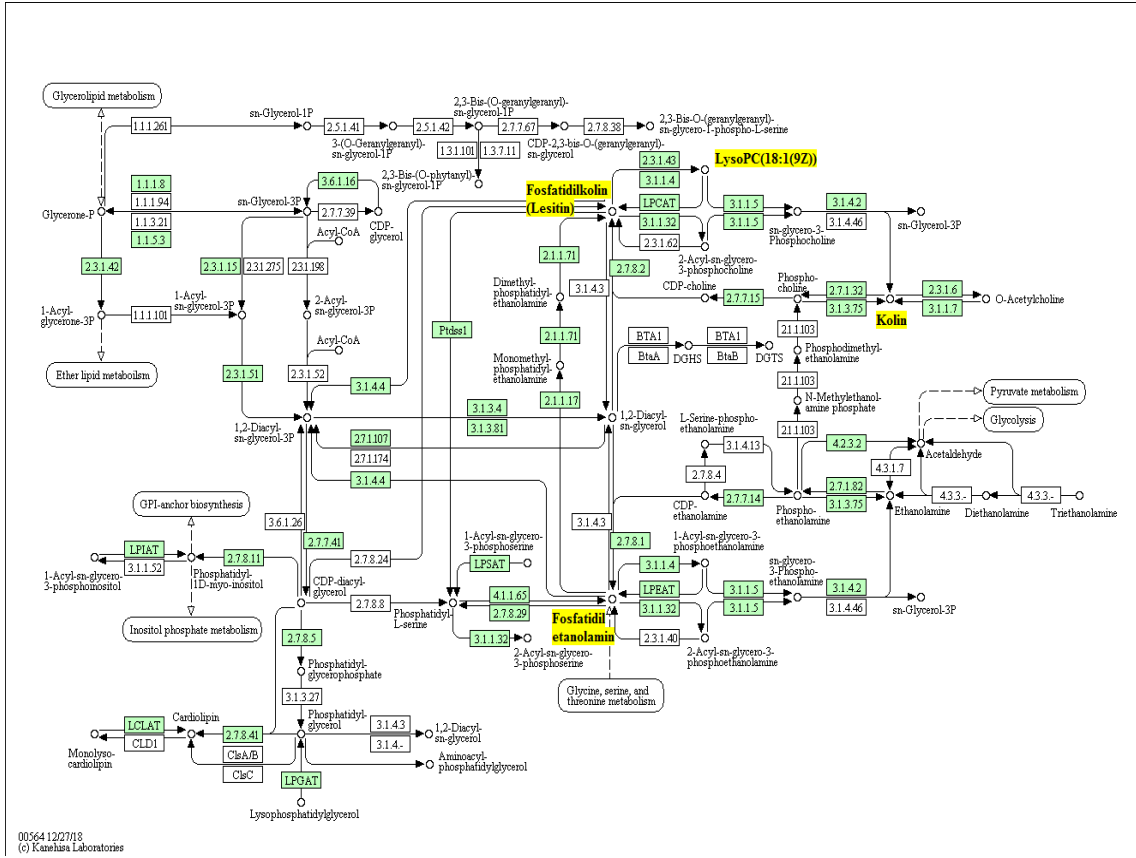
Aminoasıl-tRNA Biyosentezi





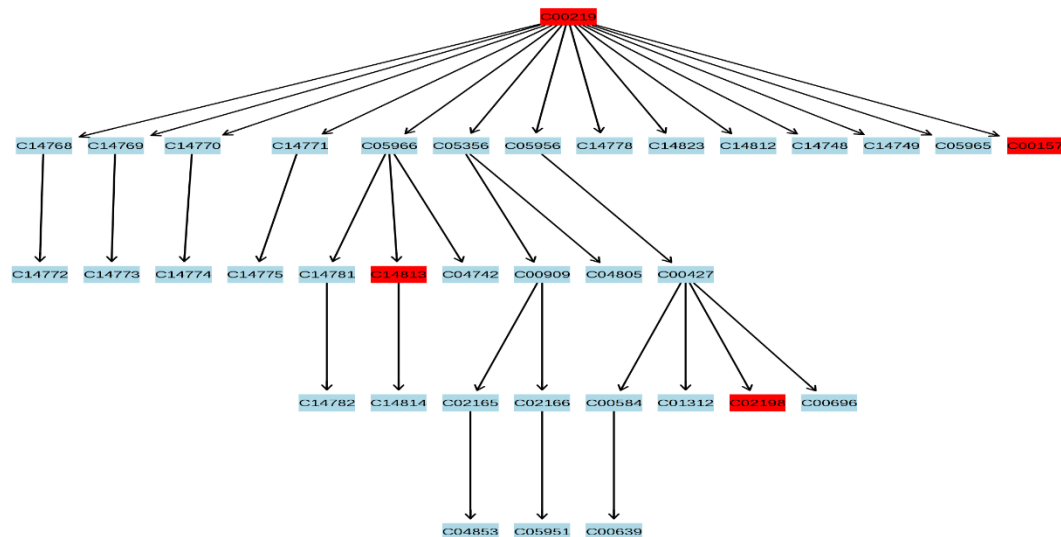
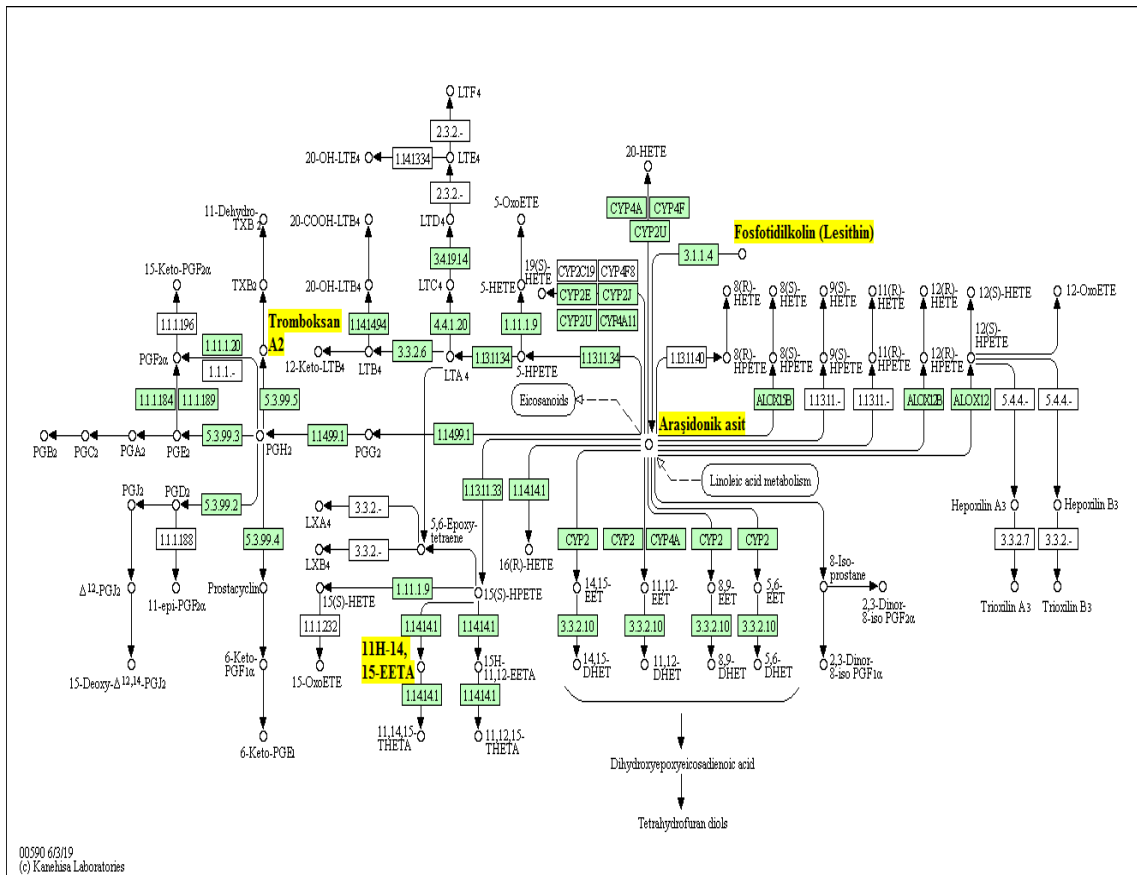
Şekil 4.41. Solifenasin süksinat uygulanan ratlarda Aminoasıl-tRNA Biyosentezinde rol alan metabolitler C00135 (L-Histidin), C00079 (L-Fenilalanin), C00073 (L-Metionin), C00183 (L-Valin) C00407 (L-İzolösin), C00123 (L-Lösin), C00078 (L-Triptofan)

Gliserofosfolipit Metabolizması



Şekil 4.42. Solifenasin süksinat uygulanan ratlarda Gliserofosfolipit Metabolizmasında rol alan metabolitler C00114 (Kolin), C00157 (Fosfatidilkolin), C00350 (Fosfatidiletanolamin), C04230 (LysoPC(18:1(9Z)))

Araşidonik Asit Metabolizması



Şekil 4.43. Solifenasin süksinat uygulanan ratlarda Araşidonik Asit Metabolizmasında rol alan metabolitler C00219 (Araşidonik asit), C00157 (Fosfatidilkolin), C14183 (11H-14.15-EETA), C02198 (Tromboksan A2)

5. TARTIŞMA

Analitik kimya, bir numunenin bileşimini belirlemeyi ve bu bileşenlerin miktarını tayin etmeyi sağlayan yöntemler topluluğudur. Bu amaçla tercih edilebilecek tekniklerin avantaj ve dezavantajları iyi bilinmelidir. Diğer yandan çalışılacak analitler, uygulanacak deneysel prosedürler ve ulaşılmak istenen amaç hakkında da detaylı bilgiye sahip olunması gereklidir. İlaç analizlerinde kullanılan bir çok teknik arasından, analizin gerçekleşeceği ortam (biyolojik sıvılar, farmasötik formlar vb.) ve çalışma koşulları göz önünde tutularak iyi bir literatür taraması yapılmalı ve çalışma için en uygun olan teknik belirlenmelidir. Yöntem şartları optimize edildikten sonra, yöntem hatalarını en aza indirmek, sonuçların bilimsel bir değeri ve yöntemin uygulanabilir olduğunu göstermek için yöntem geçerlilik (validasyon) testlerini yapmak gereklidir. Bu sebeple, yöntemin doğruluk, kesinlik, spesifiklik, seçicilik, geri kazanım, teşhis tayin limiti (LOD) ve miktar tayin limiti (LOQ) gibi yöntem geçerlilik testlerinin yapılması gereklidir.¹⁷⁵

Farmasötik preparatlarda ilaç etken maddelerinin miktar analizinde sıklıkla basit bir teknik olması sebebiyle Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopi Yöntemi ilaç endüstrisinde çok tercih edilmektedir. Maddelerin belirli dalga boylarında verdiği absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle UV-Görünür Bölge spektrumları elde edilir.^{64, 93, 94, 97, 116} Türev spektrumlarının kullanılmasına dayanan Türev Spektroskopi Yöntemi, UV-Görünür Bölge Spektroskopi Yöntemine göre daha avantajlıdır. Çünkü Türev spektrumları; üst üste çakışan ve ayrıışmayan UV-Görünür Bölge spektrumlarının ayırım gücünü artırır ve maddelere özgü karakteristik piklerin elde edilmesine imkan tanır.⁶¹

Kromatografi, aynı ortamda karışım halinde bulunan ve birbirleri ile benzer özellik gösteren beileşenlerin ayrılması, tanınması ve miktar tayininde sıklıkla kullanılan bir analiz teknikler topluluğudur. Seçiciliği, kesinliği, doğruluğu oldukça yüksek ve hızlı

olan HPLC yöntemi yaygın kullanım alanına sahip olan tekniklerden birisidir. Çok düşük miktar seviyelerinde analiz yapmaya olanağına da sahip olduğu için biyolojik sıvılarda ve farmasötik preparatlarda ilaç etken madde miktar analizlerinde tercih edilmektedir.^{71, 79, 92, 120}

Novara ve ark.¹⁷⁶, benign prostat hiperplazisi ve aşırı aktif mesane sendromu nedeniyle eşlik eden idrar yolu semptomları gözlenen hastalarda, antimuskarinik ilaçların rolünü değerlendirmek için antimuskarinik ilaçları tek başlarına veya a-blokerlerle birlikte hastalara uygulamışlardır. Mevcut verilere dayanarak, a-blokerler ve antimuskarinik ajanların birlikte kullanılmasının tedavide güvenlik ve etkinlik açısından olumlu olduğu görülmüştür. Ancak, uzun vadeli güvenlik ve etkinliklerini değerlendirmek için iyi tasarlanmış, plasebo kontrollü, uzun süreli randomize kontrollü çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle, rutin kalite kontrol ve farmasötik preparatlarda etken madde analizlerinde, uzun süreli kombine tedavisinin plasebo çalışmalarında, farmasötik preparat tasarlama ve geliştirme sürecinde kullanmak üzere solifenasin süksinatın eşzamanlı olarak silodosin ve tamsulosin ile miktar tayini için kısa analiz süresine sahip, basit, tekrarlanabilir ve hassas analitik yöntemler çalışmamızda geliştirildi ve yöntem geçerlilik testleri yapıldı. Literatürü incelediğimizde, solifenasin süksinat ve silodosinin aynı anda eş zamanlı miktar tayini ile ilgili herhangi bir çalışmaya ulaşamamıştır. Bundan dolayı solifenasin süksinat ve silodosinin eşzamanlı miktar tayini için önerdiğimiz HPLC yöntemi bildirilen ilk analitik yöntem olması hasabiyle özgünlük değerine sahiptir. Ayrıca, solifenasin süksinat ve tamsulosin'in eşzamanlı tayini için bildirilen çalışmalara göre bizim analiz yöntemimiz daha kısa analiz süresine sahiptir. Bu çalışmamın amacı silodosin, solifenasin süksinat, tamsulosin farmasötik preparatlarda ve plazmada literatürden farklı olarak türevlendirme yapmadan, doğru, seçici ve hassas bir HPLC yöntemi geliştirildi ve yöntem geçerlilik testleri yapıldı.¹²⁶⁻¹³⁰

Ayrıca silodosin-solifenasin süksinat veya tamsulosin-solifenasin süksinat ilaçları hastalar tarafından aynı anda kullanıldığından dolayı silodosin-solifenasin süksinat ve tamsulosin-solifenasin süksinat karışımlarının eş zamanlı olarak plazmada miktar tayinleri için HPLC yöntemi geliştirildi ve yöntem geçerlilik testleri yapıldı. HPLC yönteminde, 30 °C sıcaklık, 1.0 mL/dk akış hızı, 10 mM amonyum format tamponu (ph:4):asetonitril:metanol (55:32.5:12.5 h/h/h) hareketli fazı, izokratik elüsyon, Agilent C18 (5 µm, 150 x 4.6 mm) kolon, UV dedektör ve 210 nm dalga boyundan oluşan çalışma parametreleri kullanıldı. Geliştirilen HPLC yöntemiyle silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat etken maddelerini içeren farmasötik preparatlardan sırasıyla Urorec® Kapsül, Flomax® Kapsül ve Kinzy® Tabletlerinde her üç etken madde miktar tayinleri gerçekleştirildi.

Plazmada bu etken maddelerin analizi için etkili, tekrarlanabilir ve matriks etkisi gözlenmeyen, aynı anda hem analitler hem de iç standart için yüksek geri kazanım sağlayan ekstraksiyon prosedürü geliştirmek için birçok denemeler gerçekleştirildi ve “3.3.4.3. Silodosin, Tamsulosin ve Solifenasin Süksinatın Plazmadan Ekstraksiyon Prosesi” kısmında verilen ekstraksiyon yöntemi geliştirildi ve çalışmalarımıza uygulandı. Ekstraksiyon yöntemi 0.1 mL plazma örneklerine uygulandı ve her üç etken madde içinde %90’dan fazla plazmadan geri kazanım elde edildi. Literatürlerde solifenasin süksinatın silodosin ve tamsulosin ile eşzamanlı plazmadan ekstraksiyonu için herhangi bir çalışmaya ulaşılmamıştır. Literatürde ki çalışmalarda, plazmadan ekstraksiyon prosedürlerinde silodosin için metil tert-butil eter (2.5 mL)⁷⁰, etil asetat ve metil tert-butil eter karışımı (5.0 mL)⁶⁷, dikloro metan (2.0 mL)⁶⁶ tamsulosin için metil tert-butil eter (2.0 mL)⁵⁷, dikloro metan ve dietileter karışımı (2.0 mL)¹¹¹, etil asetat (5.0 mL)¹⁰⁸, butil asetat (4.0 mL)⁷⁹, dietileter ve diklorometan karışımı (4.0 mL)⁷⁷ solifenasin süksinat için metil tert-butil eter (3.0 mL)^{124, 177}, metanol (1.0 mL)¹²⁵ ve metil tert-butil eter (5.0 mL)¹²⁰

organik çözücülerini kullanılmıştır. Bildirilen tüm bu çalışmalarda 0.1 mL’de fazla plazma örnekleri, 1mL’den fazla organik çözücü, 0.3 mL’den fazla protein çöktürmek için alkali çözeltiler kullanılmıştır. Bu çalışmalarda bildirilen plazmadan geri kazanım değerleri %70-89 arasında verilmektedir. Tüm bu bilgiler ışığında geliştirdiğimiz ekstraksiyon yöntemi düşük hacimde insan plazması, protein denatürasyonu ajanı ve organik çözücü sarfiyatı ile matriks etkisi olmaksızın silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinatın eş zamanlı olarak daha yüksek verimle plazmadan geri kazanımına imkan tanımaktadır.

Bu çalışmada ayrıca, standart çözeltilerde ve farmasötik preparatlarda silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat etken maddelerin miktar tayinleri için UV-Görünür Bölge, 1D-Türev ve 2D-Türev Spektroskopi Yöntemleri geliştirildi ve yöntem geçerlilik testleri yapıldı. Spektroskopi yöntemlerinin uygulanmasında kullanılan yöntem şartları ve çözelti hazırlamaları “3.3.1.UV-Görünür Bölge Spektroskopi Yöntemi” ve “3.3.2. 1D-Türev ve 2D-Türev Spektroskopi Yöntemleri” bölümlerinde ayrıntılı olarak verildi. Silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinatın UV-Görünür Bölge spektroskopi çalışmalarında en iyi spektrum ve yüksek absorbans değerini elde etmek için metanol, asetonitril, su, %1.0 HCl içeren su, %3.0’lük metilen mavisi ve fenol ftalein çözeltileri gibi çözücü ortamlarında her üç etken maddenin spektrumları alındı. %1.0 HCl içeren su, %3.0’lük metilen mavisi ve fenol ftalein çözeltileri ile hazırlanan çözeltilerde uygun pikler gözlenmedi. Literatürde üç madde içinde çözücü olarak metanol, asetonitril veya suyun kullanıldığı çalışmalar bulunduğu için farklı bir yöntem geliştirilmesi amaçlandı. Bu amaçla metanol ile hazırlanan 1.0 mg/mL derişimine sahip silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat çözeltileri metanol, su ve %1.0 TFA çözeltisi gibi farklı çözücülerle ile seyreltilerek 200.0 µg/mL’lık silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat çözeltileri hazırlandı. Metanol ile seyreltilen çözeltilerde numunelerin derişimi arttıkça maksimum

absorbansın gözlediği dalga boylarında sağa kayma (batokromik kayma) gözlenirken, su ile seyreltilen çözeltilerde ise sola kayma (hipsokromik kayma) gözlemlendi. Bu sebeple 200.0 µg/mL’lık silodosin, tamsulosin, solifenasin süksinat stok çözeltileri ve standart çalışma çözeltileri %1.0 TFA çözeltisi ile seyreltilerek hazırlandı. Ayrıca bu çözeltiler 80 °C’lik su banyosunda 1 saat bekletildi sonra mevcut yöntemlerle spektrumları alındı ve absorbans değerleri kaydedildi.

Silodosin

Yukarıda anlatılan işlemlerden sonra 30. dakikada 200.0 µg/mL’lık silodosin çözeltisinden hazırlanan 50.0 µg/mL’lık numune 223 nm dalga boyunda maksimum absorbans gösterdi. 200.0 µg/mL’lık silodosin çözeltisinden hareketle 0.25-150.0 µg/mL arasında bir seri standart çalışma çözeltisi hazırlandı. Silodosin çözeltilerinin derişimlerine karşı okunan absorbans değerleri grafiğe geçirilerek 1.0-60.0 µg/mL derişimleri arasında yöntemin doğrusal olduğu belirlendi. Aynı çözeltilerin 1D-Türev spektrumlarında 218 ve 281 nm’de, 2D-Türev spektrumlarında 278 ve 283 nm’de 1.0-60.0 µg/mL derişimleri arasında yöntem doğrusallık gösterdi. Kalibrasyon eğrilerinin regresyon analizi ile, kalibrasyon eğrilerinin denklemleri ve korelasyon katsayıları (r) $A_{223nm} = 0.0226x + 0.1271$ (r= 0.999), $1D_{218nm} = 0.1241x + 0.9218$ (r= 0.9984), $1D_{281nm} = 0.0296x - 0.037$ (r= 0.9992), $2D_{278nm} = 0.0009x + 0.0002$ (r= 0.9989) ve $2D_{283nm} = 0.0006x - 0.0004$ (r= 0.999) olarak bulundu. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.3 ve 1.0 µg/mL olarak belirlendi. Güniçi ve günler arası bağıl standart sapması (BSS), %6.32’den küçük bulundu. Yöntem Urorec® Kapsül’de bulunan silodosinin miktar tayininde başarı ile uygulandı ve yöntemin ticari farmasötik preparattan analitik geri kazanım değeri %98.33-99.93 olarak hesaplandı.

Literatürde silodosinin tayini için birkaç UV-Görünür Bölge spektroskopi yöntemine ulaşılmıştır.^{61, 62, 64} Boltia ve ark⁶¹ çift dalga boyu yöntemi, indüklenmiş çift

dalga boyu teorisi, oran farkı yöntemi, 0. ve 1. Dereceden Türev Spektroskopik tekniklere dayanan yöntemler geliştirmişlerdir. Bu yöntemlerin doğrusal olduğu çalışma aralığı 5.0-70.0 µg/mL'dir. LOD değeri ise; çift dalga boyu yöntemi, indüklenmiş çift dalga boyu teorisi, oran farkı yöntemi, 0. ve 1. dereceden Türev Spektroskopik tekniklere göre sırasıyla; 1.45, 1.18, 1.59, 1.41 ve 1.42 µg/mL'dir. Çalışma aralıkları ise %100.67, 99.06, 98.90, 99.37 ve 100.16'dir. Mounika ve ark⁶² oksidasyon, kompleks oluşumu ve şelatlanmaya dayanarak geliştirdikleri 3 yöntemin sırasıyla çalışma aralığı 10.0-50.0, 300.0-500.0 ve 10.0-50.0 µg/mL, farmasötik preparattan geri kazanımları ise %102.37, 128, 102.9 olarak bulunmuştur. Rasheed ve ark⁶⁴ geliştirdikleri 3 farklı yöntem de ise 2.0-120.0, 2.0-120.0 ve 10.0-120.0 µg/mL olarak belirlenmiştir. Bu yöntemlerden hiçbiri geliştirdiğimiz UV-Görünür Bölge, 1D-Türev ve 2D-Türev spektroskopik yöntemleri kadar hassas değildir. Geliştirdiğimiz yöntemde hem daha düşük derişimlerde hem de geniş çalışma aralığında silodosin tayinine imkan vermektedir. Ayrıca yöntemimiz Boltia⁶¹ ve Mounika ark⁶² çalışma grubunun yayınladığı yöntemlerde uzun ve karmaşık işlemler gerçekleştirildiği için yöntemimiz daha kolay bir yöntem olma özelliğine sahiptir. Farmasötik preparattan analitik geri kazanım değerleri literatürde bildirilen çalışmalara göre büyük bir farklılık göstermemektedir.^{61, 62, 64}

HPLC çalışmalarında, yöntemin doğrusallık gösterdiği 1.0-90.0 µg/mL çalışma aralığında 50.0 µg/mL iç standart içeren bir seri silodosin standart çalışma çözeltisinin (1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0, 70.0, 90.0 µg/mL) HPLC kromatogramları alındı. Silodosin derişimlerine karşı pik alan oranları (silodosin pik alanı/IS pik alanı) grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri türetildi. Kalibrasyon eğrisinin regresyon analizinde, kalibrasyon eğrisinin denklemi $y = 0.1467x - 0.0271$ (x: derişim, y: pik alanları oranı) ve korelasyon katsayısı (r) 0.9998 olarak bulundu. Sinyal/Gürültü (S/G) oranı 3'e karşılık gelen ve teşhis edilebilen en küçük silodosin derişimi olarak tanımlanan teşhis limiti

(LOD) 0.33 µg/mL, S/G oranı 10'a karşılık gelen, uygun doğruluk ve kesinlikle miktarı tayin edilen en küçük silodosin derişimi olarak tanımlanan miktar tayin limiti (LOQ) 1.0 µg/mL olarak belirlendi. Güniçi ve günler arası bağıl standart sapması (BSS) %1.76'dan ve bağıl hatası (BH) %5.86'dan küçük bulundu. Yöntem Urorec® Kapsül'de bulunan silodosin miktar tayinine başarıyla uygulandı ve yöntemin ticari farmasötik preparattan analitik geri kazanım değeri %99.9-102.8 ve plazmadan geri kazanım değeri ise %92.9-99.4 olarak hesaplandı.

Kromatografik yöntem geliştirmek için, silodosinin tek başına ve solifenasin süksinat ile birlikte eşzamanlı tayini için en iyi koşullar belirlendi. Kısa analiz süresinde, en iyi pik rezolüsyonu elde edebilmek için hareketli faz, kolon, sıcaklık, pH, akış hızı ve dalga boyu gibi parametrelerin farklı varyasyonları denendi. Hareketli faz seçiminde su, %0.1 trifloro asetik asit içeren su, %0.1 formik asit içeren su, farklı derişim ve pH'lara sahip amonyum asetat ve amonyum format tamponları, metanol ve asetonitril ile birlikte farklı oranlarda denendi. Amonyum format tamponu dışında kalan diğer sulu fazlar piklerin kuyruklanmasına, çatallanmasına ve analiz süresinin uzamasına sebep oldu. Amonyum format tamponu, metanol ve asetonitrilden oluşan hareketli faz ile silodosin için 2.6. dk'da alıkonma zamanı ve iyi bir pik rezolüsyonu elde edildi. Pik şiddetlerini artırmak ve şekillerini düzeltmek için tampon çözeltinin derişimi ve pH'sı, kolon sıcaklığı, dedektörün dalga boyu ve numune çözücüleri değıştirildi. Böylece iyi bir ayırım için kromatografik şartlar optimize edilmiş oldu.

Literatürde Aneesh⁷¹, Harischandran⁷², Goud⁷⁶ ve ark silodosinin HPLC ile tayini için bildirdikleri yöntemlerin LOQ değeri 16.57, 0.010 ve 9.91 µg/mL belirlenirken, yöntemin doğrusallık gösterdiği çalışma aralıkları ise 10.0-60.0, 10.0-100.0 ve 50.0-90.0 µg/mL olarak bulunmuştur. Bildirilen bu yöntemlerden^{71-74,76} daha hassas ve geniş çalışma aralığına sahip olan yöntemimiz, Shaik ve ark'nın⁷⁴ geliştirdiği UPLC

yönteminde belirtilen 3.94 dk olan silodosinin alıkonma zamanından daha kısa alıkonma zamanına sahiptir. Er ve Erk⁷³ akış hızı 1.3 mL/dk kullanmaları çözücü sarfiyatının artışına sebep olmaktadır. Farmsötik preparatlarda silodosin tayini için bildirilen Aneesh⁷¹, Goud⁷⁶ ve ark geliştirdikleri yöntemlerin geri kazanım yüzdeleri bizim elde ettiğimiz farmasötik preparattan geri kazanım yüzdesinden büyük bir farklılık göstermedi. Vishnuvardhan⁶⁵, Shah⁶⁷, Nair⁶⁸, Wang⁶⁹ ve ark silodosinin plazmadan ekstraksiyonu için bildirdikleri prosedürlerde 0.25-1.0 mL arasında plazma ve 2.0-5.0 mL arasında organik faz kullanmışlardır. Geliştirdiğimiz ekstraksiyon yöntemi bildiren ekstraksiyon prosedürlerine göre daha az çözücü sarfiyatı ve biyolojik materyal kullanımı ile daha yüksek geri kazanım elde etmeye olanak sağlamış oldu.

Tamsulosin

UV-Görünür Bölge spektroskopisi çalışmasında, 30. dakikada 200.0 µg/mL'lık tamsulosin çözeltisinden hazırlanan 50.0 µg/mL'lık numune 226 nm dalga boyunda maksimum absorbans gözlemlendi. 200.0 µg/mL'lık tamsulosin çözeltisinden hareketle 0.25-150.0 µg/mL arasında bir seri standart çalışma çözeltisi hazırlandı. Tamsulosin çözeltilerinin derişimlerine karşı okunan absorbans değerleri grafiğe geçirilerek 5.0-40.0 µg/mL derişimleri arasında yöntemin doğrusal olduğu belirlendi. Aynı çözeltilerin 1D-Türev spektrumlarında 218, 235 ve 299 nm'de, 2D-Türev spektrumlarında 229, 237 ve 279 nm'de 5.0-40.0 µg/mL derişimleri arasında yöntem doğrusallık gösterdi. Kalibrasyon eğrilerinin regresyon analizi ile, kalibrasyon eğrilerinin denklemleri ve korelasyon katsayıları (r) $A_{226nm} = 0.0286x + 0.0468$ (r= 0.9992), $1D_{218nm} = 0.1711x + 0.2843$ (r= 0.9984), $1D_{235nm} = 0.208x - 0.1689$ (r= 0.998), $1D_{299nm} = 0.0481x - 0.0799$ (r= 0.9984) $2D_{229nm} = 0.0044x - 0.0046$ (r= 0.9979), $2D_{237nm} = 0.0041x - 0.0014$ (r= 0.999) ve $2D_{279nm} = 0.0011x - 0.0014$ (r= 0.998); LOD ve LOQ değerleri ise sırasıyla 1.75 ve 5.0 µg/mL olarak belirlendi. Güniçi ve günler arası bağıl standart sapması (BSS), %2.05'den küçük

bulundu. Yöntem Flomax® MR Kapsül’de bulunan tamsulosin etken maddesinin miktar tayinine başarı ile uygulandı ve yöntemin ticari farmasötik preparattan analitik geri kazanım değerleri %100.48-101.25 arasında hesaplandı.

UV-Görünür Bölge Spektroskopi yöntemiyle tamsulosin tayini için bildirilen birçok yöntem bulunmaktadır.^{93-97, 99, 102} Nanda ve ark⁹³ tamsulosin’in tayini bildirdikleri üç farklı spektroskopi yöntemlerine ait çalışma aralığı her 3 yöntem için 5.0-25.0 µg/mL olarak belirlenmiştir. Gadhave⁹⁴, Bari⁹⁵, Chaudhari⁹⁷, Katagaonkar¹⁰² ve ark’nın çalışmalarında doğrusallık sırasıyla 1.0-6.0, 10.0-90.0, 2.0-12.0 ve 2.0-10.0 µg/mL derişimleri arasında bulunurken, Raghubabu ve ark⁹⁹ tamsulosin tayininde iki farklı reaktifle renkli kompleks oluşumuna dayanan yöntemlerinde ise 16.0-48.0 ve 8.0-24.0 µg/mL derişim aralıklarında ve %99.54±0.73 ve 99.4±0.389 farmasötik preparattan geri kazanım gözlenmiştir. Yöntemimiz bildirilen bu yöntemlerden daha geniş bir çalışma aralığında, farklı dalga boyunda doğru ve kesin sonuçlarla tamsulosin’in tayinine olanak sağlamaktadır. Shrivastava⁹⁶, Chaudhari ve ark⁹⁷, Saradhi¹⁰⁰ ve Raghubabu’nun⁹⁹ arkadaşlarının UV-Görünür Bölge Spektroskopi yöntemleri karmaşık türevlendirme, kompleks oluşumu ve numune hazırlama prosedürlerine sahiptir. Bizim çalışmamızda daha basit işlemlerle numune hazırlanıp spektroskopik ölçüm yapılabilmektedir. Yöntemimizin farmasötik preparatlardan analitik geri kazanım değerleri Katagaonkar¹⁰², Thimmaraju¹⁰¹ ve Saradhi’nin¹⁰⁰ arkadaşları ile geliştirdikleri yöntemlerin geri kazanım değerlerinden daha yüksektir. Yöntemimizin bir diğer avantajı ise 1D-Türev ve 2D-Türev spektrumlarını kullanarak tamsulosin’in miktar tayinine imkan tanımasıdır.¹⁰²

HPLC çalışmalarında, 50.0 µg/mL iç standart içeren bir seri tamsulosin standart çalışma çözeltisinin 210 nm’de analizleri sonucunda, tamsulosin standart çalışma çözelti derişimlerine karşı pik alan oranlarının (tamsulosin pik alan oranı/IS pik alan oranı) grafiğe geçirilmesi ile kalibrasyon eğrileri oluşturuldu. Bunun sonucunda tamsulosin için

geliştirilen yöntemimiz 1.0-90.0 µg/mL derişimleri arasında doğrusallık gösterdi. Kalibrasyon eğrisinin regresyon analizinde, kalibrasyon eğrisinin denklemi $y = 0.1535x + 0.1232$ (x: derişim, y: pik alanları oranı) ve korelasyon karsayısı (r) 0.9999 olarak bulundu. Tamsulosin için teşhis limitinin (LOD) 0.33 µg/mL, miktar tayin limitinin (LOQ) ise 1.0 µg/mL olarak tespit edildi. Yöntemin, günüçi ve günler arası bağıl hatası (BH) %2.27'den ve bağıl standart sapması ise (BSS) %0.71'den küçük bulundu. Yöntem 0.4 mg tamsulosin içeren Flomax® MR Kapsül'e başarıyla uygulandı ve yöntemin ticari farmasötik preparattan analitik geri kazanım değeri %99.6-100.9 ve tamsulosin spayk edilen plazmadan ekstraksiyon yönteminin geri kazanımı değeri ise %93.9-100.4 aralığında berlilendi.

Tamsulosin'in tek başına ve solifenasin süksinat ile birlikte eşzamanlı tayini amacıyla yöntem şartları optimize edildi. Silodosin için hareketli faz, kolon, sıcaklık, pH, akış hızı ve dalga boyu gibi parametreler üzerinde yapılan değışiklikler tamsulosin için de denendi. Silodosinde olduğu gibi tamsulosin için en iyi pik rezolüsyonu ve 2.3 dk gibi kısa alıkonma süresi amonyum format tamponu, metanol ve asetonitrilden oluşan hareketli faz ile elde edildi. Pik şiddetlerini artırmak, pik kuyruklanmasını azaltmak ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edebilmek için hareketli fazın pH'sı belirlendi ve standart çalışma çözeltileri hareketli fazla seyreltilerek hazırlandı.

Tamsulosin miktar tayini için geliştirdiğimiz HPLC yönteminde kullanılan dedektör, dalga boyu, hareketli faz, kolon, sıcaklık, akış hızı ve ekstraksiyon prosedürü olarak literartürde bildirilen kromatografik çalışmalardan farklılık göstermektedir. Walsh ve ark⁷⁷ kromatografik ayırım için fenil-heksil kolonu ile 1.2 mL/dk akış hızında asetonitril ve %0.25 fosforik asit içeren sudan (pH 3.0) (30:70, h/h) oluşan bir hareketli faz kullanılmıştır. Dedektör olarak floresans dedektör tercih edilmiştir. Tamsulosin'ün alıkonma zamanı 6.45 dk olarak bulunmuştur. Tamsulosin spayk edilmiş insan

plazmasından maddenin ekstraksiyonu için 400.0 µL plazma ve 4.0 mL dietil eter ve dikoloro metan (1:1) kullanılmıştır. Pashaei ve ark'nın⁷⁸ yaptıkları çalışmada hareketli faz, 0.8 mL/dk akış hızında bir fosfat tampon (6.8 g potasyum dihidrojen fosfat, pH 2.5): asetonitril (60:40 h/h) karışımıydı ve enjeksiyon hacmi 20.0 µL idi. Dalga boyu 292 nm, alıkonma süresi 5.02 dk. ve analiz süresi 12 dakikaydı. Plazma proteinlerinin denatürasyonu için bizim kullandığımız 3 M Na₂CO₃ yerine perklorik asit kullanmışlardır. Ekstraksiyon için katı faz kullanılırken, plazma örneklerine ait kromatogramlarda girişim pikleri gözlenmiştir. Macek ve ark⁷⁹ 1.0 mL insan plazması ve butil asetat kullanarak gerçekleştirdikleri ekstraksiyon yöntemi ile hazırladıkları numunelerin floresans dedektörle yapılan tamsulosin tayininde %85-95 geri kazanım elde etmişlerdir. Keski-Rahkonen ve ark¹⁰⁸ 1.0 mL serum numunesi ve 5.0 mL etil asetat ile tamsulosin'in ekstraksiyonunda %66-77 geri kazanım elde ettiklerini bildirmişlerdir. Nguyen ve ark¹¹¹ Vietnam'lı gönüllü hastaların kan numunelerine uygulanan tamsulosin ekstraksiyon prosedüründe 1.0 mL insan plazması ve 2.0 mL diklorometan:dieter (1:1) karışımı kullanarak %82.63-86.75 geri kazanım elde etmişlerdir. Ksycińska ve Rudzki¹⁰⁹ numune hazırlamak için, 0.5 mL plazmaya doymuş sodyum bikarbonat çözeltisinin eklenmesinden sonra heksan-etil asetat (1: 1) ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu yapılmıştır. Choi ve ark⁵⁷ ise 0.5 mL plazma ve 2 mL metil tert-butil eter kullanarak %77.8 geri kazanım elde etmişlerdir. Agarwal ve ark¹¹² 0.9 mL plazma numunesinin proteinlerini denature etmek için 0.2 mL 1 M NaOH ve organik çözücü olarakta 6.0 mL dieter:metilenklorid (7:3) kullanmışlardır ve %52.61 geri kazanım bildirmişlerdir. Bildirilen tüm bu ekstraksiyon yöntemlerine göre farklı basamaklardan oluşan ekstraksiyon yöntemimizde daha az biyolojik numune (0.1 mL) ve daha az organik çözücü (1.0 mL) kullanarak daha yüksek geri kazanımla (%93.9-100.4) tamsulosin plazmadan ayrıldı. Chandorkar ve ark⁸¹ yöntemlerinde C8 kolon kullanmışlardır. Jain⁸⁵ ve Patel⁸⁷ arkadaşları ile geliştirdikleri

yöntemlerde tamsulosin'in alıkonma süreleri sırası ile 3.3 ve 2.68. dakikalar olarak vermişlerdir. Jain⁸⁵, Kumar⁸², Thimmaraju⁸⁶ ve ark farmasötik preparatlarda tamsulosin tayini için bildirdikleri HPLC yönteminde farmasötik preparatlarda geri kazanım değerleri sırasıyla %98.85±1.15, 97.74±0.23 ve 98.5±0.5 olarak hesaplanmıştır. Kumari⁸⁰, Cheng⁹², Thimmaraju⁸⁶ ve ark bildirdikleri yöntemlerine ait 5.0-100.0, 5.0-130.0 ve 10.0-50.0 µg/mL çalışma aralığında doğrusallık gözlenmiştir. Ayrıca, Kumari⁸⁰, Thimmaraju⁸⁶ ve ark bu yöntemlerde sırası ile 1.5 ve 1.8 mL/dk akış hızı ile analitleri yürüttüklerini bildirmişlerdir. Yöntemimizde UV dedektör kullanılarak Krishna⁹¹, Macek⁷⁹, Walash⁷⁷ ve ark'nın yöntemlerine göre farklı dedektör tercih edilmiştir. Yöntemimizde tamsulosinin kromatografik ayrımı için literatürden farklı bir hareketli faz ve akış hızı kullanılarak bildirilen yöntemlerden^{77, 78, 80, 85, 86, 98} daha kısa alıkonma zamanı elde edildi. Bu sebeple çözücü sarfiyatının az ve analiz süresi kısa olması yöntemimizin bir avantajıdır. Diğer yandan yöntemimizin farmasötik preparatlardan analitik geri kazanım değerleri literatürdeki çalışmalardan^{82, 85, 86} daha yüksektir. Literatürde belirtilen çalışmalardan^{80, 86, 92} daha yüksek hassasiyete sahip bir yöntem geliştirmiş olmaktadır.

Solifenasin süksinat

Solifenasin süksinatın UV-Görünür Bölge Spektroskopi yöntemi ile miktar tayini için yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan 200.0 µg/mL'lık solifenasin süksinat çözeltisinden seyreltilerek hazırlanan bir seri standart çalışma çözeltisinin 222 nm'de absorbans değerleri kaydedildi. Çözelti derişimlerine karşı okunan absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri türetildi. Kalibrasyon grafiğinde gözlenen saplamalardan hareketle 5.0-80.0 µg/mL derişim aralığında doğrusallık gözlemlendi. Aynı çözeltilerin 1D-Türev spektrumlarında 219 nm dalga boyunda bir maksimum ve 228 ve 274 nm dalga boyunda ise iki minimum pik gözlenirken, 2D-Türev spektrumlarında herhangi bir pik gözlenmedi. 1D-Türev spektroskopisi yöntemi için 5.0-80.0 µg/mL derişim

aralığında doğrusallık gözlemlendi. Kalibrasyon eğrilerinin regresyon analizi ile, kalibrasyon eğrilerinin denklemleri ve korelasyon katsayıları (r) $A_{222\text{nm}} = 0.01x + 0.0786$ ($r = 0.9992$), $1D_{219\text{nm}} = 0.0812x + 1.1714$ ($r = 0.999$), $1D_{228\text{nm}} = 0.0558x + 0.4228$ ($r = 0.9988$) ve $1D_{274\text{nm}} = 0.0088x + 0.0092$ ($r = 0.9984$), LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 1.75 ve 5.0 µg/mL olarak belirlendi. UV-Görünür Bölge Spektroskopi yönteminin günüçi ve günler arası bağıl standart sapması (BSS), %4.42'den, bağıl hata ise %3.6'dan küçük bulundu. Yöntem Kinzy® 5 mg Tablet ticari formülasyonuna başarı ile uygulandı ve farmasötik preparattan analitik geri kazanım değeri %98.08-101.80 olarak hesaplandı.

Singh ve Nanda¹¹³ farmasötik preparatlarda solifenasin süksinat tayini için geliştirdikleri iki farklı UV-Görünür Bölge Spektroskopi yönteminin 415.6 ve 412 nm dalga boyunda çalışma aralığı 10.0-60.0 µg/mL olduğu bildirilmiştir. Saiyed ve ark¹¹⁴ ise metanol ile hazırlanan solifenasin süksinat içeren farmasötik preparat çözeltileri 1D-Türev spektrumları 3.0-18.0 µg/mL derişimleri arasında doğrusallık gösterirken, geri kazanım ise %95.08-102.12 olarak bulunmuştur. Madhu Kiran ve Rambabu¹¹⁵ solifenasin süksinatın saf ve oral dozaj formlarında tayini için 615 ve 620 nm dalga boyunda maksimum absorbans veren iki farklı yöntem geliştirmişlerdir. 2.0-10.0 µg/mL çalışma aralığına sahip yöntemlerde, bazik boyalarla kompleks oluşturma ve kloroformla ekstraksiyon işlemi yapılmaktadır. Rakesh¹¹⁶, Teja¹¹⁷ ve ark spektroskopi yöntemlerinde absorbanslar sırasıyla 215 nm'de 5.0-15.0 µg/mL ve 220 nm'de 2.0-10.0 µg/mL çalışma aralığında doğrusallık göstermişlerdir. Ayrıca farmasötik preparattan geri kazanımları değerleri sırasıyla %98.38-101.45 ve %99.174-101.01 hesaplanmıştır. Bildirilen tüm bu yöntemlere¹¹³⁻¹¹⁷ göre geliştirdiğimiz UV-Görünür Bölge Spektroskopi yöntemi farklı dalga boyunda daha geniş bir çalışma aralığında doğrusallık gösterdi. Farmasötik preparatlardan geri kazanım yüzdeleri arasında büyük farklılıklar gözlemlenmedi. Madhu Kiran ve Rambabu¹¹⁵ uyguladıkları numune hazırlama prosedürlerine göre organik

çözücü sarfiyatı ile ekstraksiyon yapmadan daha basit bir prosedürü yöntemimizde kullandık. Böylece solifenasin süksinatın farmasötik preparat ve standart çözeltilerde tayini için geliştirdiğimiz UV- Görünür Bölge, 1D- ve 2D-Türev Spektroskopi yöntemleri literatürden farklı, basit, doğru, kesin, hassas ve geri kazanım değerine sahiptir.

Solifenasin süksinatın silodosin ve tamsulosin ile eşzamanlı tayini için amaçlanan HPLC yöntem geliştirme çalışmalarında, 50.0 µg/mL iç standart içeren bir seri solifenasin süksinat standart çalışma çözeltisinin 210 nm’de analizleri sonucunda analitlerin derişimlerine karşı pik alan oranları (silodosin pik alanı/IS pik alanı, tamsulosin pik alanı/IS pik alanı, solifenasin süksinat pik alanı/IS pik alanı) grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri türetildi. Üç madde içinde ortak optimize edilen yöntemle solifenasin süksinatın silodosin ve tamsulosin ile birlikte bulunduğu seri standart çalışma çözeltilerinde analizleri gerçekleştirildi. Hazırlanan kalite kontrol çözeltileri analiz edilerek yöntemlerin doğruluk ve kesinlik parametrelerinin kabul edilebilir olacağı gösterildi. Solifenasin süksinat seri standart çalışma çözeltilerine uygulanan HPLC yöntemi 3.0-60.0 µg/mL derişimleri arasında doğrusallık gösterdi. Solifenasin süksinatın tek başına, silodosin ve tamsulosin ile hazırlanan standart çözeltilerine ait kalibrasyon eğrilerinin regresyon analizinde, denklemler ve korelasyon katsayıları (r) sırası ile $y = 0.1412x - 0.0176$ (x: derişim, y: pik alanları oranı), 0.9998, $y = 0.143x - 0.0655$, 0.9998, $y = 0.1469x - 0.0613$, 0.9999 olarak bulunurken, gün-içi ve günler-arası bağıl hatası (BH) %2.95, 2.46 ve 1.63’den ve bağıl standart sapması ise (BSS) %0.97, 1.41 ve 1.12’den küçük bulundu. Üç gruba ait solifenasin süksinat için yöntemin teşhis limitinin (LOD) 1.0 µg/mL, miktar tayin limitinin (LOQ) ise 3.0 µg/mL’tür. Yöntem Kinzy® 5 mg Tablet’e başarı ile uygulandı ve yöntemin ticari farmasötik preparattan geri kazanımı %99.2-101.1 ve spayk edilen plazmadan ekstraksiyon yöntemi ile solifenasin

süksinat geri kazanımı %93.1-98.1'dür. Solifenasin süksinat için alıkonma zamanı ise 6.09 dakikadır.

Literatürden farklı olarak optimize ederek geliştirdiğimiz yöntem, farmasötik preparatlarda ve spayk edilmiş plazma numunelerinde solifenasin süksinatın hem silodosin hem de tamsulosin ile eşzamanlı miktar tayini için yöntemin uygulanabilirliği ve geçerliliği bu çalışmada ortaya konulmuş oldu. Belirlenen aynı kromatografik koşullar ve hareketli fazın kullanıldığı numune hazırlama prosedürü üç madde için de iyi bir ayırım, kısa bir analiz süresi, yüksek hassasiyet ve seçicilik sağladı. Shaik ve ark¹¹⁸ bildirdikleri kromatografik yöntemde 1.5 mL/dk akış hızında gradient elüsyonla 220 nm'de solifenasin süksinatın ayırımını ve tayinini gerçekleştirmişlerdir. Yöntemin doğrusal çalışma aralığı 10.0-100.0 µg/mL, LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.02 ve 10.0 µg/mL, yüzde geri kazanım ise ortalama %95.38 bulmuşlardır. Annapurna ve ark¹¹⁹ ise 254 nm dalga boyu ve 20.0 µL enjeksiyon hacmi kullanarak yöntemlerinde 20.0-200.0 µg/mL derişim aralığında doğrusallık belirlemişlerdir. Yanagihara ve ark¹²⁰ solifenasin süksinatın rat plazmasında tayini için geliştirdikleri yarı mikro HPLC yöntemi ile 18.2 dakikada solifenasin süksinatı tespit etmişlerdir. Rat plazmasından maddenin ekstraksiyonu için 1 mL plazma kullanıp, %83.2-88.1 aralığında plazmadan geri kazanım elde etmişlerdir. Attia ve ark¹²¹ 25 cm'lik C18 kolon, 0.05 M pentan sülfonik asit sodyum tuzu (pH 3.0 ± 0.05) ve asetonytrilden (50:50 h/h) oluşan hareketli faz ve 20.0 µL enjeksiyon hacmi ile farmasötik preparatlarda solifenasin süksinatın miktar tayinini gerçekleştirmişlerdir. Krishna ve ark¹²² 10 mM potasyum dihidrojen ortofosfat tamponu (pH: 7.0) ve asetonytril içeren hareketli faz sistemini gradient elüsyon ile kromatografik ayırimda kullanmış ve farmasötik preparatlardan %95-104 arasında geri kazanım elde etmişlerdir. Reddy ve ark¹²³ C18 kolon ve ortofosforik asitle pH'ı 3.5'e ayarlanmış 0.01 M fosfat tamponu:asetonytrilden (90:10, h/h) oluşan hareketli faz gradient elüsyon modda

kullanılarak solifenasin süksinat ve onun safsızlığı olan solifenasin N-oksidin ayrımını gerçekleştirmişlerdir. Solifenasin süksinatın alıkonma süresi 14. dakika olarak bulunmuştur. Mistri ve ark¹²⁴ C8 kolon ile gerçekleştirdikleri solifenasin süksinat tayini için geliştirdikleri LC-ESI-MS/MS yönteminde, maddenin plazmadan ekstraksiyonu için 0.5 mL plazma ve 3.0 mL metil tert-butil eter kullanmışlardır. Plazmadan geri kazanımı %90.9-95.1 olarak hesaplanmıştır. Macek ve ark¹²⁵ ise insan plazmasından ekstraksiyon için geliştirdikleri prosedürde 0.25 mL plazma ve 1.0 mL metanol kullanarak %70 plazmadan geri kazanım elde etmişlerdir. Yöntemimiz, literatürde bildirilen yöntemlerle kıyaslandığında daha geniş doğrusal çalışma aralığına^{118, 119} sahiptir. Geliştirdiğimiz yöntemde enjeksiyon hacminin^{119, 121} ve hareketli faz akış hızının¹¹⁸ düşük olmasının yanı sıra, solifenasin süksinata ait alıkonma süresinin diğer yöntemlerden^{120, 123, 126, 127} kısa olması daha az kimyasal sarfiyatı ile daha kısa sürede analize imkan tanıyarak, zaman ve bütçe olarak avantaj sağlamaktadır. Kullandığımız ekstraksiyon prosedürü bildirilen diğer yöntemler^{120, 124, 125} ile kıyaslandığında daha az miktarda biyolojik materyal, plazma denaturasyon ajanı ve organik çözücü kullanarak daha yüksek verimle plazmadan geri kazanım elde etmemiz ekstraksiyon prosedürümüzün büyük bir avantajıdır. Yöntemimiz, kullanılan dalga boyu, kolon, sıcaklık, dedektör, akış hızı gibi kromatografik parametreler, standart ve plazma numunelerinin hazırlanma prosedürleri göz önüne alındığında literatürde rapor edilen yöntemlerden^{118-127, 177} farklılık göstermektedir.

Literatürde solifenasin süksinatın silodosinle eşzamanlı tayini için herhangi bir çalışmaya ulaşılmamıştır, tamsulosin ile eşzamanlı tayini için birkaç yöntem tepit edilmiştir.¹²⁶⁻¹³⁰ Ganhi ve ark¹²⁶ gradient elüsyon modda C18 kolon ve %0.5 trietilamin içeren pH'ı fosforik asitle 6.6'ya ayarlanmış 20 mM potasyum fosfat tamponu ve su:asetonitril (10:90, h/h) içeren hareketli faz kullanarak 225 nm dalga boyunda iki

maddenin safsızlıkları ile tayinini gerçekleştirmişlerdir. Solifenasin süksinat ve tamsulosin'in alıkonma zamanları sırası ile 17.57. ve 11.64. dakikadır ve farmasötik preparatlardan geri kazanımları ise sırasıyla %98.7-100.6 ve 98.6-100.2 olarak hesaplanmıştır. Israel ve ark¹²⁷ bildirdikleri kromatografik yöntemde solifenasin süksinat ve tamsulosin için çalışma aralığı sırasıyla 15.0-75.0 ve 1.0-5.0 µg/mL, %BSS ise sırası ile 1.5 ve 1.0, alıkonma zamanları ise 10.95 ve 3.31 dakika olarak bulunmuştur. Geliştirdiğimiz yöntem, literatürde solifenasin süksinatın silodosin ile eşzamanlı tayini için bildirilen ilk yöntem olma özelliğine sahiptir. Ayrıca geliştirdiğimiz yöntem, solifenasin süksinatın tamsulosin ile eşzamanlı tayini için bildirilen yöntemlerden daha yüksek hassasiyete^{127, 128}, kesinliğe¹²⁷ ve daha geniş çalışma aralığına^{127, 128} sahiptir. Yöntemimizde her iki maddenin alıkonma zamanları bildirilen yöntemlerden daha kısa tespit edildi.^{126, 127} Yöntemimiz solifenasin süksinat ve tamsulosin'in eşzamanlı tayini için literatürde bildirilen yöntemlerden farklı, hassas, kesin, basit ve tekrarlanabilir olma özelliğine sahiptir.

Silodosin, tamsulosin ve solifeanzin süksinatın metabolom profilleri

–Omiks teknolojileri, doku ve biyolojik sıvılarda bulunan moleküllerin birbirleri ile ilişkilerini, görevlerini, miktarlarında meydana gelen farklılıkları genel bir yaklaşımla açıklayarak karmaşık biyolojik sistemler hakkında detaylı bilgi sahibi olmamızı sağlarlar. Genomiks, epigenomiks, transkriptomiks, proteomiks gibi omiks teknolojilerden biri olan metabolomiks ise küçük molekül yapısına sahip metabolitleri inceler. Metabolitler, biyolojik sistemlerin genetik veya çevresel değişikliklere tepki olarak sentezlediği hücre içi olayların son ürünleri olarak tanımlanmaktadır. Bir biyolojik sisteme ait metabolitlerin bir bütün olarak meydana getirdiği kümeye ise metabolom denir. Belirli bir süreçte doku, hücre ve biyolojik sıvılara ait metabolomları oluşturan lipid, karbohidrat, vitamin, hormon ve diğer hücre bileşenlerinin sentezlediği küçük molekül ağırlıklı metabolitlerin

yüksek analitik teknikler yardımı ile saptanması, miktarının ölçülmesi ve bu moleküllerin tanımlanması ise metabolomik teknolojisi ile sağlanmaktadır.^{156,178} Organizmanın genetik, hastalık, ilaç, diyet veya çevresel faktöre karşı gösterdiği tepki metabolom profillerinde değişikliklere yol açar. Metabolom profili, hem ilacın verildiği organizmaya ait hücre, doku ve biyolojik sıvılarında değişikliğe uğrayan metabolitler hakkında bilgi sahibi olmamıza hem de ilgili metabolik yolların detaylı yorumlanmasına olanak sağlar. Metabolomiks sayesinde, semptomatik veya kronik ilaç kullanımının terapötik veya toksik etkileri metabolit düzeyinde incelenebilir. Böylece hem tedavi etkinliği takip edilebilir hem de ilaca maruz bırakma sonucunda kalp, dalak, akciğer, karaciğer, böbrek ve kan gibi biyolojik materyallerin metabolik profillerinde meydana gelen değişiklikler incelenerek ilacın toksik etkileri hakkında detaylı bilgi sahibi olunabilmektedir. Bu amaçla “farmakometabolomiks” olarak adlandırılan metabolomiks temelli profillemeye tekniğine dayanan farmakoterapötik çalışmalar hız kazanmıştır.

Günümüzde, bütün bireylerin ilaç tedavisine aynı şekilde yanıt vermediği, genler ve çevre (ksenobiyotikler, bağırsak mikrobiyotası, polifarmasi) arasında bir etkileşim olduğu görülüyor. Bireysel değişkenlik, toksisite ve/veya etkinlik eksikliğinin belirlenmesi çok önemlidir. Metabolom profilleri, genetik, fizyolojik, kimyasal ve çevresel etkilerin net sonucu olan metabolik fenotipini belirleyerek bir bireyin biyokimyasal durumunu ifade eder. İlaçlara verilen farklı hasta yanıtlarından dolayı hastaya özgü tedavi önem kazanmaya başlamıştır. Hastaya özgü tedavide “ilaç etkinliğini en üst düzeye çıkarmak ve toksisiteyi en aza indirmek için” farmakometabolomiks çalışmaları ilaçlar hakkında büyük bir bilgi kaynağı olabilir. İlaç geliştirme ve yeni terapötik etkilerin araştırılması için farmakometabolomiks yöntemi kullanılmaya başlanmıştır.¹⁷⁹ Literatürde kronik ilaç kullanımının insan ve rat metabolizmasında meydana getirdiği terapötik ve toksik etkileri metabolom profilleri ile açıklayan birkaç

Çalışma rapor edilmiştir.¹³¹⁻¹⁴⁰ Silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinatın kronik kullanımının organizmada meydana getirdiği toksik etkilerini araştıran birçok klinik çalışmada ilaçların kronik kullanımına bağlı olarak hastalarda görülen retrograd boşalma, rinit, boşalma bozukluğu, baş dönmesi, ağız kuruluğu, burun tıkanıklığı, ejakülasyonda azalma, akut idrar retansiyonu riski gibi yan etkiler rapor edilmiştir.¹⁸⁰⁻¹⁸³ Grldği üzere literatürde yapılan çalışmalarda genellikle ilaçların etkinlik ve güvenilirliği ön planda tutulmuş olup, ilaçların uzun süreli kullanımına bağlı gelişebilecek yan etkiler ve toksisitesi detaylı olarak incelenmemiştir. Çalışmamızda, silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinatın rat metabolizmasında meydana getireceği biyokimyasal değişiklikler ve ilaçların toksisitesi moleküler düzeyde incelendi. Kontrol grubu ile ilaç grupları arasında anlamlı farklılık gösteren metabolitler tanımlanıp, hangi metabolik yollar üzerinde etkisinin olduğu ortaya konuldu. Farmakometabolomiks alışması silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinatın rat metabolizmasında yaptığı etkileri metabolit düzeyinde aydınlatan ilk farmakometabolomiks çalışmasıdır.

Bu çalışmada, doğru kütle ölçümü ile bilinmeyen metabolitlerin kimlik bilgilerini tanımlama ve bu metabolitlerin ilgili bileşiklerinin analizi için yüksek hassasiyet ile hedeflenmemiş metabolomiks çalışmalarını yapmak için LC-QTOF/MS cihazı kullanıldı. Hareketli faz olarak %0.1 formik asit içeren asetonitril ve %0.1 formik asit içeren ultra saf su karışımından oluşan hareketli faz ile bir gradient elüsyon programı kullanıldı. Q-TOF kütle spektrometre sistemi için Dual Agilent Jet Stream Elektrosprey İyonizasyon (AJS ESI) iyon modu seçildi. Yöntem geçerlilik testleri için kalite kontrol örnekleri hazırlandı. Silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinat gruplarına ait LC-QTOF/MS sonuçlarının veri analizleri, metabolik yolak analizleri ve kemometrik analiz sonuçları rapor edildi.

Silodosin

Silodosin uygulanan ve kontrol rat gruplarından elde edilen plazma örneklerinin LC-QTOF/MS analizinde 4581 farklı değer tespit edildi. Bu değerlerden fold değeri >1.5 ve p değeri $p < 0.01$ şartlarını taşıyarak kontrol grubuna göre anlamlı farklılık gösteren, HMDB ve METLIN gibi veri tabanları kullanılarak doğru kütle ve yapı bilgileri ortaya konan amino asitler, safra asitleri, karbonhidratlar, yağ asitleri ve organik asitlere ait 41 metabolit tanımlandı. Ortogonal projeksiyonlar diskriminant analizi (OPLS-DA) ile ilaç ve kontrol gruplarının tam olarak birbirinden farklı yerlerde kümелendiği ve bu grupların regresyon katsayıları gösterildi. OPLS-DA, bir iki öngörücü bileşen ve dört ortogonal bileşen kullanarak, iki grubun metabolik profilleri arasında belirgin bir ayrım olduğu gösterildi. Ticari veri tabanları ile tanımlanan metabolitlerin etkili olduğu metabolik yolak analizi, Metaboanalyst 4.0 ve Kyoto Genler ve Genom Ansiklopedisi (KEGG) veritabanları kullanılarak rapor edildi. Silodosin ve kontrol gruplarında farklılık gösteren metabolitlerin ilişkili olduğu yolaklar analiz edildiğinde gliserofosfolipid, fenilalanin, araşidonik asit, sistein ve metiyonin, tirozin, sfingolipid, linoleik asit, taurin ve hipotaurin, alfa-linoleik asit, arginin ve prolin, D-Glutamin ve D-glutamat, pürin, triptofan ve gliserolipid metabolizması, fenilalanin, tirozin ve triptofan, aminoasıl-tRNA, ubikinon ve kinon, glikosilfosfatidilinositol (GPI)–anchor, steroid, birincil safra asidi biyosentezi ile anlamlı derecede ilişkili olduğu ortaya çıktı.

Çalışmanın veri analizinde silodosin uygulanan rat plazma numunelerinde fosfolipit sınıfına ait kolin, fosfotidilkolin (lesitin) ve fosfotidiletanolamin (sefalin) seviyelerinde anlamlı derecede azalmaya bağli olarak gliserofosfolipit sentezinde bozulmalar meydana geldi. Gliserofosfolipitler akciğer yüzey aktif cisimlerinde, plazma zarlarına bağlanan proteinlerde, kardiyolipinin biyosentezinde, apoptoz, kan pıhtılaşması, proliferasyon ve protein kinaz C aktivasyonu gibi hayati hücresel fonksiyonların

düzenlenmesi dahil birçok biyolojik fonksiyonlarda önemli görevlere sahiptir. Gliserofosfolipitler, hücrelerin yapısal tanımlanmasına katkıda bulunan ve birçok hücresel işlemin düzenlenmesinde rol oynayan kilit moleküllerdir. Fosfolipid metabolizması hücrelerin büyümeleri boyunca kullandığı önemli bir aktivitedir. Bu amfifilik lipitler hücre zarının yapısına katılarak hücre zarı bütünlüğünü sağlar. Çalışmamızla, memeli canlılarda en önemli gliserofosfolipitler olan fosfatidilkolin ve fosfatidiletanolamin seviyelerinde silodosin uygulanmasına bağlı olarak meydana gelen değişiklikler rat metabolizmasında hücre membran akışkanlığı ve geçirgenliğinin bozulması, hücre içi ve hücre dışı lipit metabolizmasında yer alan genlerin ekspresyonu, nörodejenerasyon, lipit peroksitlerin birikmesi¹⁸⁴ gibi birçok biyokimyasal bozulmalara yol açtığı düşünülmektedir.

Silodosin kullanımına bağlı olarak L-arginin seviyesinde azalma gözlemlendi. Ribozomal protein sentezinin bir parçası olarak kodlanan 20 amino asitten biri olan L-arginin, birçok proteinin yapısal bir bileşeni olmasının yanında metabolizma için hayati önem taşıyan birçok yaşamsal faaliyette rol alır. L-arginin krebs döngüsünde bulunan bazı kimyasal ara maddelerin oluşumunda, glutamatin alfa-keto-glutarata dönüşümü ile birlikte üre döngüsünde azot taşıyıcısı olarak rol alır. Bu görevlerinin yanı sıra asit/baz döngüsü, T hücresi proliferasyonu, immünojenik savunma için anahtar olan nitrik oksit üretiminde, yara iyileşmelerinin en önemli parçası olan kollajen sentezinde L-arginin aktif rol almaktadır. L-arginin, nitrik oksit sentazları ile nitrik oksite ve L-sitrüline veya arginaz ile üre ve L-ornitine metabolize edilir. L-ornitin ise hücre çoğalması için gerekli olan poliaminler ve kollajenin temel bir bileşeni olan prolin için öncüdür.¹⁸⁵ Silodosinin rat metabolizmasındaki etkilerinden biri olduğu görülen L-argininin ekspresyonunun artması, L-argininin proline dönüşümünü artırdı. L-arginin seviyesinde görülen azalmalar

glutamat sentezini azaltarak alanin, aspartat ve glutamat metabolizmasında bozulmalara yol açabilir.

L-metionin ve S-adenozilmetioninde görülen artış, insanlar için önemli metionin ve sistein metabolizmasında değişiklikler meydana geldiğini göstermektedir. Proteinlerden izole edilebilen tek kükürt içeren L-metionin, metiyonin siklusu ve transsülfürasyon isimli iki farklı yolla metabolize olur. Bu yollar sonucunda ara ürün olarak S-adenozilmetionin ve homosisteini adenozin ve sistein gibi aminoasitler üretilir. Metiyonin ve ATP'den sentezlenen S-Adenosilmetilionin (SAM), gen ekspresyonunun düzenlenmesi için DNA metilasyonu dâhil olmak üzere birçok önemli transfer reaksiyonunda bir metil grubu donörüdür. L-metionin, ATP kullanılarak S-adenozilmetionine dönüştürülerek, epinefrin, melatonin, kolin, kreatin ve nükleotitlerin sentezinde rol alır. Metionin, metil B₁₂'nin B₁₂'ye dönüşmesini metil donörü görevi ile gerçekleştirir. Metionini dönüşen homosistein diğer yandan sistein ve süksinil-CoA sentezini başlatır. Süksinil-CoA canlı hücrelerin besinlerden enerji edilmesini sağlayan ve bütün metabolizmalarda önemli bir yere sahip sitrik asit (krebs) döngüsünün başlamasına öncülük eder.¹⁸⁶ Silodosin kullanımının; rat metabolizmasında enerji üretimi ile ilgili sitrik asit döngüsünde, birçok amino asit ve B12 vitamini sentezinde, protein yapılı hücresel yapıların oluşturulmasında rol alan metionin ve sistein metabolizmasını değiştirdiği çalışmamızla ortaya konmuş oldu.

Silodosin grubunda kontrol grubuna göre araşidonik asit metabolizmasında rol alan tromboksan A₂, prostaglandin G₂ ve H₂ gibi bazı ara metabolitlerin seviyelerinde anlamlı azalmalar görüldü. Bu metabolitlerin azalması insan metabolizması için çok önemli bir bileşen olan araşidonik asidin sentezinde bozulmalar olduğunun göstergesidir. Uzun zincirli doymamış yağ asidi olan araşidonik asit hücre zarının ayrılmaz bir bileşeni olarak hücreye akışkanlık ve esneklik sağlar. Bu nedenle tüm hücrelerin özellikle sinir,

iskelet ve bağışıklık sistemlerinin çalışması için gereklidir. İyon kanallarının birçok reseptörün ve enzimin fonksiyonunu modüle eder. Araşidonik asit sırası ile prostaglandinlerin ve lökotrienlerin sentezi ile sonuçlanan siklooksigenaz (COX) ve 5-lipoksijenaz ile metabolize edilir. Bu hücre içi haberciler, ağrı ve iltihaplı tepkilerde yer alan sinyal iletiminin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Fosfolipaz A2 ile hücre zarından kurtulan araşidonik asidin oksidasyonu ile oluşan 14.15-EET, tromboksan A2, prostaglandin G2 ve H2, iltihap oluşumundan ve yara iyileşmesinden sorumlu mediatörlerin oluşumuna öncülük ederler. Birçok fizyolojik olayda görevli olan prostaglandinlerin oluşumu araşidonik asit metabolizması ile gerçekleşir.^{187, 188} Silodosinin kronik uygulandığının metabolizma için gerekli olan birçok molekülün sentezinde ve sinir, bağışıklık ve iskelet gibi sistemlerinde etkili olan araşidonik asit metabolizmasında anlamlı değişikliklere yol açtığı çalışmamızla ortaya konulmuş oldu.

Silodosinin, rat plazmasında bulunan sfinganin ve sfingozin metabolit seviyelerini artırdığı görüldü. Palmitoil-CoA ve serinden oluşabilen sfingosin, hücreler tarafından uzun zincirli yağ asitleri ile birleştirilerek, karmaşık lipidler grubu olan sfingolipitlerin sentezine öncülük eden seramidleri (N-asilsfingosin) oluşturur. Sfingolipitler, hücre membranların ve lipoproteinlerin yapısal özelliklerini tanımlamaya, hücre büyümesini ve farklılaşmasını düzenlemeye ve akciğer, damar hastalıkları ve ateroskleroz gibi birçok hastalığı önlemeye yardımcı olurken, diğer yandan hücre-hücre ve hücre-substrat etkileşimi ve diğer hücre tanıma biçimlerinde önemli rollere sahiptir. Sfingolipidler, kolesterol ile birlikte plazma zarının ana bileşeni olan lipid bölgelerini meydana getirerek ve sinyal iletim yollarını kullanarak hücrelerde bulunan sinyal ileten reseptörlerle etkileşime girerler. Lipid bölgelerinin sadece hücresel sinyal iletimi için değil, aynı zamanda hücre dışı lipidlerin veya besinlerin emiliminde de önemli olduğu düşünülmektedir. Sfingolipid biyosentezinin inhibisyonu, lipid mikro alanlar yoluyla yağ

asidi alımında önemli olduğunu gösterdi.¹⁸⁹⁻¹⁹¹ Herhangi bir aşamada sfingolipid biyosentezinin bozulması, memeli hücrelerinde büyümenin durmasına neden olur. Öte yandan, fazla miktarda sfingolipid veya sfingolipid öncüsü de toksiktir. Bu nedenle, sfingolipidlerin biyosentezi sıkı bir düzenlemeye tabidir.¹⁹² Silodosin rat grubuna ait metabolom profili, silodosinin hücre beslenmesinde, büyümesinde, hücreler arası iletişimde ve birçok hastalığı önlemede hayati öneme sahip sfingolipitlerin sentezinde ve metabolizmasında etkili olduğunu ortaya koyulmuş oldu.

Tamsulosin

Beş gün boyunca oral yoldan tamsulosin verilen ve aynı şartlarda ilaç verilmeyen kontrol rat gruplarından elde edilen plazma örneklerinin LC-QTOF/MS analizinde 4776 farklı metabolit kolon yardımı ile birbirinden ayrılarak kütle dedektörüyle tespit edildi. Bu değerlerden fold değeri >1.5 ve p değeri $p < 0.01$ olarak kontrol grubundan ayrılan, HMDB ve METLIN ile kütleleri belirlenen 35 metabolit tanımlandı. OPLS-DA ile ilaç ve kontrol gruplarının metabolom profillerinin iyi bir seçicilik ve hassasiyet ile birbirlerinden ayrıldığı gösterildi. Tanımlanan metabolitlerin seviyelerinde meydana gelen değişikliğin etkilediği metabolik yollar Metaboanalyst 4.0 ile etki değerlerine göre listelendi. Buna göre ilaç verilen rat grubunda retinol, D-Glutamin ve D-glutamat, sfingolipid, alanin, aspartat ve glutamat, gliserofosfolipid, biyotin, glisin, serin ve treonin, tiamin, azot, alfa-linoleik asit, selenoamino asit, glutatyon, yağ asidi, pirimidin, triptofan, arjinin, prolin ve pürin metabolizması ile aminoasil-tRNA, steroid, yağ asidi biyosentezinde rol alan bazı metabolitlerde görülen anlamlı değişiklikler çalışmamızla ortaya kondu.

Çalışmamızda tamsulosin uygulanan ratlara ait plazmalarda retinal, retinoik asit ve retinil ester seviyelerinde azalma görüldü. Normal büyüme, gelişme, görme ve üreme fonksiyonları, sağlıklı bir bağışıklık sistemi, sağlıklı cilt ve bariyer fonksiyonları dahil

olmak üzere vücutta birçok temel fizyolojik işlemin sürdürülmesi için vitaminlerin proformları olan retinoidler gereklidir. 1000'e yakın genin retinoik asit tarafından düzenlendiği düşünülmektedir. 11-*cis*-retinal görme işlevi için retinal görsel pigmentlerin kromofor görevine sahiptir. Retinol, retinal, retinoik asit, retinil esterler, retinol ile retinoik asidin konjuge ve oksitlenmiş metabolitleri gibi birçok retinoid formunun yanısıra çok sayıda taşıyıcı protein ve enzimler retinol metabolizmasında rol alır.^{193, 194} Retinol metabolizmasında meydana gelen düzensizlikler ve bu retinoid formlarının sentezinde görülen azalmalar metabolizma için gerekli taşıyıcı protein ve retinalin retinole dönüşümünü sağlayan retinol dehidrogenaz ve retinal redüktaz gibi önemli enzimlerin eksikliğine yol açabilir. Bunun sonucu olarak gece körlüğü, retinada beyaz lekeler, koni distrofisi gibi göz hastalıkları görülür. Retinoidler, melanositlerin ve melanom hücrelerinin çoğalmasını inhibe eder ve transkripsiyon aktivasyonu için retinoid bağlayıcı proteinleri, retinoid metabolitleri ve nükleer retinoid reseptörleri etkileyerek hipo ve hiperpigmentasyon bozukluklarına yol açmaktadır.^{194,195} Tamsulosin'in metabolizma için önemli işlevleri bulunan retinol metabolizmasında bozulmalara yol açtığı çalışmamızla belirlendi.

İlaç uygulanan ve kontrol rat gruplarının metabolik profilleri karşılaştırıldığında ilaç kullanımının plazma L-glutamin, L-alanin seviyelerinde artışa sebep olurken, L-triptofan ve vücutta üretilmeden diyetle dışarıdan alınan L-lizin seviyelerini azalttı. Metabolik yolak analizinde tamsulosin aminoasil-tRNA biyosentezini bozarak belirtilen amino asit plazma seviyelerini değiştirdiği görüldü. L-alanin seviyesinde görülen artış hücresel sinyal iletimi, metabolizma, gen regülasyonu, protein sentezi, apoptoz ve hücresel stres tepkisi gibi fonksiyonları etkilediği literatürde mevcuttur. L-alaninin apoptozdan koruduğu, hücre içi antioksidan oluşumunu artırdığı ve gen ekspresyonunu, salgılama fonksiyonunu ve insülin salgılayan hücrelerin bütünlüğünü düzenlemede

önemli uzun vadeli etkileri olduğu bulundu.¹⁹⁶ Vücut tarafından üretilen L-glutamin ise irritabl bağırsak sendromunda mannitol geçirgenliğini ve nitrik oksit salınımını inhibe ederek kolonik mukozanın epitel onarım mekanizmalarının uyarılmasını sağladı. Böylece kolonda bulunan dokuların onarılmasında ve rejenerasyonunda etkili olduğu görüldü.¹⁹⁷⁻¹⁹⁹ L-triptofan serotonin sentezini artırır. Hem serotonin hem de nörokimyasal birçok sistemi etkilediği için L-triptofanın depresif ve bipolar efektif bozukluğu olan hastalarda kısmi antidepresan ve antimanik etkileri olduğu görüldü.²⁰⁰ L-triptofanın azalmasına bağlı olarak beyin serotonin seviyesinde görülen düşüş; anksiyete, depresyon hali, özgüven eksikliği gibi psikolojik semptomların yanında, melatonin gibi birçok sistemi etkileyen hormonların sentezini de inhibe eder. Böylece akciğer, böbrek, endotel hücreleri, mast hücreleri, nöronlar ve astrosit hücrelerinin çoğalması, olgunlaşması ve apoptoz engellenerek epitel yapı bozulur, kardiyovasküler, bağışıklık ve sindirim sisteminde düzensizlikler meydana gelir.^{201, 202} Herpes simplex tedavisi veya takviye olarak alınan L-lizin'in azalması L-arginin gibi birçok aminoasitin taşınması, NO üretimi, kalsiyum Emilimi vb. metabolik fonksiyonları engelleyebilir.²⁰³⁻²⁰⁵

Tamsulosin uygulanan ratların plazmalarında tiamin seviyeleri artış gösterdi. Bu artışın sebebi tamsulosin kullanımına bağlı olarak tirozin biyosentezinin, glisin, pürin, sistein ve B6 vitamini metabolizmasında meydana gelen değişikliklerden kaynaklandığı düşünülebilir. Veya tamsulosin'in tiaminin fosforilasyonunda rol alan enzimlerin inhibe etmesinden ortaya çıkabilir. B1 vitamini olarakta bilinen tiamin serbest radikaller ve hidroperoksitlerle etkileşime girip, oleik asitin serbest radikal oksidasyonu ve lipid peroksidasyonu inhibe ederek, antioksidan aktivite gösterir.²⁰⁶ Tiamin metabolizmasının değişikliği tiamine duyarlı megaloblastik anemi hastalığının gelişmesine yol açabilir.²⁰⁷ Diğer yandan ilaç kullanımının tiamin seviyesini artırması tiamin eksikliğine bağlı

demans gelişmesine engel olabilir.²⁰⁸ Çalışmamızla kronik tamsulosin kullanımının tiamin metabolizmasında yüksek etki değerine sahip olduğu belirlendi.

Tamsulosin, silodosinin aksine sfingolipit metabolizmasında rol alan bazı enzimlerin inhibe olması veya glisin, serin ve tironin metabolizmasının bozulması rat plazmasında bulunan sfinganin ve sfingosin-1-fosfat seviyelerinde düşüşe sebep oldu. Sfingozin seviyesinin azalması birçok biyolojik aktivitede rol alan seramidlerin sentezini inhibe eder. Sfingolipid metabolizmasının inhibisyonu hücre büyümesi, hücreler arası iletişim ve etkileşimi, hücreye besin emilimi ve yağ asidi alımı, hücre membranının oluşumu ile ilgili sorunlar meydana gelir. Ayrıca akciğer, kalp ve damar hastalıklarının görülmesi seramid eksikliği sonucu ortaya çıkabilir.¹⁸⁹⁻¹⁹¹ Tamsulosin kullanımının hücrelerin hayati fonksiyonları için önemli olan sfingolipit metabolizmasında anlamlı değişikliklere yol açtığı metabolik profillemeye modeli ile belirlendi.

Tamsulosin rat metabolizmasında birçok metabolik yolağı etkileyen alanin, aspartat ve glutamat metabolizmasında bulunan L-alanin ve L-glutamin seviyelerinde anlamlı azalmalara sebep oldu. Bunun sonucu olarak metabolizmaya enerji sağlayana krebs döngüsü başta olmak üzere birçok triptofan, arginin, aspartat gibi birçok aminoasitin metabolizmasında ve sentezinde değişikliklere yol açacağı görülmektedir.

Solifenasin Süksinat

Solifenasin süksinatın kronik oral kullanımı ilaç ve kontrol gruplarının plazma örneklerine ait metabolom profillerinde büyük değişikliklere yol açtığı görüldü. Plazma örneklerinin LC-QTOF/MS analizinde 4441 farklı metabolit kütle dedektörü ile tespit edildi. Bu değerlerden fold değeri >1.5 ve p değeri $p < 0.01$ olarak kontrol grubundan ayrılan, HMDB ve METLIN ile kütleleri belirlenen 43 adet metabolit tanımlandı. OPLS-DA ile ilaç ve kontrol gruplarının metabolom profillerinin iyi bir seçicilik ve hassasiyet ile birbirlerinden ayrıldığı gösterildi. Tanımlanan metabolitlerin seviyelerinde meydana

gelen değişikliğin etkilediği metabolik yolaklar Metaboanalyst 4.0 ile etki değerlerine göre listelendi. Buna göre solifenasin süksinatın ratlara ait gliserofosfolipid, araşidonik asit, piruvat, linoleik asit, sistein ve metiyonin, alfa-linoleik asit, azot, fenilalanin, triptofan, histidin, retinol, beta-alanin, propanoat, b tanoat, alanin, aspartat ve glutamat, glutatyon, glisin, serin ve treonin, yağ asidi, pirimidin, tirozin metabolizmalarında, aminoasil-tRNA, steroid, yağ asidi, fenilalanin, tirozin ve triptofan, glikosilfosfatidilinositol (GPI) –anchor ve birincil safra asidi biyosentezi ve sitrat (TCA) döngüsü metabolik yolaklarında rol alan 43 metabolitin plazma seviyelerini değiştirdi.

Solifenasin süksinat kronik kullanımına bağlı aminoasil-tRNA biyosentezinde meydana gelen bozulmalar L-Lösin L- z l sin L-Valin 2-(a-Hidroksietil)tiamin difosfat aminoasitlerinin taşınmasının ve sentezinin inhibe olmasına sebep oldu. Bunun sonucunda ilgili aminoasitlerin plazma seviyeleri azalarak valin, lösin ve izolösin biyosentezinde değişikliğe sebep oldu. Bu metabolik yolakta rol alan bazı metabolitler ve enzimler obezite, insülin direnci, yüksek tansiyon ve dislipidemi hastalıklarının risk faktörleri ile ilişkilidir.²⁰⁹ L-fenilalanin ve L-triptofan plazma miktarlarında görülen değişiklikler protein sentezinin engellenmesine bağlı olarak psikolojik semptomlara, hormon sentezlerinin inhibisyonuna, hücrelerin gelişip büyümesini bozarak epitel yapının bozulmasına yol açabilir.^{201, 202} Alyuvar ve hemoglobin gibi biokimyasal ürünlerin sentezinde, bağışıklık ve dolaşım sisteminde, iskelet kası hasarı, kalp hastalıkları, enflamasyon ve oksidatif stresin önlenmesinde ve alerjik reaksiyonlarda²¹⁰ öncül rol oynayan L-histidin seviyelerinde artış görüldü. L-metionin plazma seviyesinin azalması B12 eksikliğine bağlı olarak gelişir ve azot metabolizması, DNA yapımı için gerekli olan timidilat sentezi, purin ve pirimidin sentezi ve serinden glisin oluşumu olumsuz yönde etkilenir. Solifenasin süksinat kullanımına bağlı olarak azalan aminoasit sentezleri ve artan protein katabolizması negatif azot dengesine neden olmaktadır.^{211, 212} D vitamini

metabolizmasında oluşan ara ürünlerden kalsidiol, 1.25-dihidroksivitamin D3-26.23-lacton ve 23S.25-dihidroksivitamin D3 metabolitlerinin plazma seviyelerinde görülen azalma, solifenasin süksinatın D vitamini sentezini olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir. D vitamini eksikliğinin kardiyovasküler, metabolik sendrom, enfeksiyöz ve otoimmün hastalıkların dahil olduğu bir çok kronik hastalık ile bağlantılı olduğu literatürlerde belirtilmiştir.^{213, 214} Kükürt kaynağı olarak L-metionin metabolizması ile ilişkisi bulunan L-sistein, protein ve glutatyon sentezi için kullanılır. B6, B12 vitamini ve folik asit eksikliğı L-metionin gibi L-sistein eksikliğine de sebep olur. Sistein eksikliğı serbest radikallerle mücadele eden glutatyon seviyesini düşürür. Glutatyon karaciğer detoksifikasyonu, kalp hastalıkları, bronşit gibi mukus üreten solunum hastalıkları ve kansere karşı olumlu etkileri bulunur.²¹⁵⁻²¹⁹ Bağışıklık sistemi, bağırsaktan demir emilimi ve metabolizmanın serbest radikallerle mücadelesi gibi metabolik fonksiyonlarda gerekli olan L-sisteinin plazma seviyesi solifenasin süksinat kullanımına bağılı olarak azalmıştır. Bu sebeple solifenasin süksinat kullanan hastalara N-asetilsistein takviyesi yapılabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Alt üriner sistem semptomlarının tedavisinde mevcut ilaçların tek başına kullanılmasından ziyade, kombine olarak kullanılması gün geçtikçe daha çok tercih edilmektedir. Tedavinin etkinliğinin yanısıra uzun süre ilaç kullanımının metabolizmada meydana getirdiği toksik etkilerin belirlenmesi, ilaç yanıtlarındaki bireysel farklılıkları belirlenmesi amacıyla bir ilacın farmakokinetik profilinin ve terapötik etki mekanizmalarının tam olarak aydınlatılması için metabolom haritalarının ortaya çıkarılması gerekmektedir. Bu amaçla kan, idrar, doku gibi biyolojik ortamlarda bulunan metabolitleri inceleyen farmakometabolomiks yaklaşımı tercih edilmektedir. Ayrıca ilaçların in-vivo ortamda terapötik düzeyde kalıp kalmadığının izlenmesi ve kişiye özel tedavi ilkesi uyarınca kandaki derişiminin tespit edilmesi için basit, hassas, hızlı ve tekrarlanabilir analitik yöntemlere gereksinim duyulmaktadır. Çalışmamızda farmasötik preparatlarda silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinatın miktar tayini için literatürde bildirilen çalışmalara alternatif olarak geniş çalışma aralığına sahip, hassasiyeti ve seçiliği yüksek, doğruluğu ve kesinliği kabul edilebilir UV-Görünür Bölge, 1D-Türev ve 2D-Türev Spektroskopi Yöntemleri ve ultraviyole dedektörüne sahip yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemleri geliştirildi ve her bir yöntemin geçerlilik testleri yapıldı. HPLC yöntemimiz, solifenasin süksinatın silodosin ile eşzamanlı miktar tayini için geliştirilen literatürdeki ilk yöntem özelliğini taşımaktadır. Ayrıca solifenasin süksinatın tamsulosin ile eşzamanlı miktar tayini için bildirilen en kısa analiz süresine sahip HPLC yöntemidir. Geliştirdiğimiz UV-Görünür Bölge, 1D-Türev ve 2D-Türev spektroskopi, HPLC yöntemlerinin uygulanabilirliği etken maddelerin ticari farmasötik preparatları üzerinde gösterildi. Önerdiğimiz ekstraksiyon yöntemi silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinatın yüksek verimle plazmadan ekstraksiyonu için alternatif olacaktır. Yapılan hedeflenmemiş metabolom analizi ile birlikte bu ilaçların vücutta meydana

getidiği değişimlerin tespiti gerçekleştirildi. Kontrol grubuyla kronik ilaç verilen gruplar arasındaki farklar kemometrik olarak değerlendirildi ve kümeleme analizi ile şematize edildi. Metabolitler arası farklılıklar özellikle sfingolipit metabolizması, başta sistein, fenilalanin, metiyonin, triptofan, tirozin, valin, izolösin, L-alanin, L-glutamin amino asitleri başta olmak üzere birçok aminoasidin sentezi, D ve B vitamini metabolizması, tiamin sentezi, alanin, aspartat ve glutamat metabolizması, araşidonik asit metabolizması, retinol metabolizması, protein sentezi ve yağ asitleri biyosentezi metabolik yolaklarının değişmesine sebep oldu. Metabolomiks çalışmamız silodosin, tamsulosin ve solifenasin süksinatın metabolom profillerinin belirlendiği literatürdeki ilk farmakometabolomiks çalışmasıdır. Elde edilen sonuçlar ileri dönemde yapılacak olan hedeflenmiş metabolom analizi çalışmalarına ışık tutacaktır. İlaçların etki mekanizmalarının tespiti sayesinde bu etken maddelerin geniş bir profilde izlenmesi sağlanmış olup, farklı hastalıkların tedavisinde kullanılma ihtimalleri değerlendirilecektir. Bunlara ek olarak ilaçların etkinliği ve vücutta meydana getirdiği değişimler ile ilgili veriler ileri dönemde yapılacak olan çalışmalara kaynak olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, van Kerrebroeck P, Victor A, Wein A. The standardisation of terminology of lower urinary tract function: report from the Standardisation Sub-committee of the International Continence Society. *Neurourology and urodynamics*, 2002, 21: 167-178.
2. Ströberg P, Boman H, Gellerstedt M, Hedelin H. Relationships between lower urinary tract symptoms, the bother they induce and erectile dysfunction. *Scandinavian journal of urology and nephrology*, 2006, 40: 307-312.
3. Yol EAÜ. Semptomları/Benign Prostat Hiperplazisi. *Türkiye Klinikleri J Fam Med-Special Topics*, 2016, 7: 26-33.
4. Gratzke C, Bachmann A, Descaseaud A, Drake MJ, Madersbacher S, Mamoulakis C, Oelke M, Tikkinen KA, Gravas S. EAU guidelines on the assessment of non-neurogenic male lower urinary tract symptoms including benign prostatic obstruction. *European urology*, 2015, 67: 1099-1109.
5. Arikan N, Çetinel B, İlker Y, Koçak T, Tarcan T. Alt üriner sistem işlevi terminoloji standardizasyonunun Türkçe'ye çevirisi. *Türk Üroloji Derneği, İstanbul, Nöroüroloji ve Kadın Ürolojisi Çalışma Grubu*, 2003.
6. Tarcan T, Tanıdır Y. BPH ile ilişkili alt üriner sistem semptomlarının değerlendirilmesinde ürodinamik bulguların yeri nedir? *Üroonkoloji Bülteni*, 2009, 4: 3-8.
7. McConnell JD, Roehrborn CG, Bautista OM, Andriole Jr GL, Dixon CM, Kusek JW, Lepor H, McVary KT, Nyberg Jr LM, Clarke HS. The long-term effect of doxazosin, finasteride, and combination therapy on the clinical progression of benign prostatic hyperplasia. *New England Journal of Medicine*, 2003, 349: 2387-2398.

8. de Groat WC. A neurologic basis for the overactive bladder. *Urology*, 1997, 50: 36-52.
9. Drake M, Mills I, Gillespie J. Model of peripheral autonomous modules and a myovesical plexus in normal and overactive bladder function. *The Lancet*, 2001, 358: 401-403.
10. Mitterberger M, Pallwein L, Gradl J, Frauscher F, Neuwirt H, Leunhartsberger N, Strasser H, Bartsch G, Pinggera GM. Persistent detrusor overactivity after transurethral resection of the prostate is associated with reduced perfusion of the urinary bladder. *BJU international*, 2007, 99: 831-835.
11. Gosling JA, Kung L, Dixon JS, Horan P, Whitbeck C, LEVIN RM. Correlation between the structure and function of the rabbit urinary bladder following partial outlet obstruction. *The Journal of urology*, 2000, 163: 1349-1356.
12. Christ GJ, Venkateswarlu K, Day NS, Valcic M, Santizo C, Zhao W, Wang H-Z, Persson K, Andersson K-E. Intercellular communication and bladder function. *Bladder Disease, Part A*, Springer, 2003: 239-254.
13. O'reilly B, Kosaka A, Chang T, Ford A, Popert R, McMahon S. A quantitative analysis of purinoceptor expression in the bladders of patients with symptomatic outlet obstruction. *BJU international*, 2001, 87: 617-622.
14. Speakman M, Brading A, Gilpin C, Dixon J, Gilpin S, Gosling J. Bladder outflow obstruction—a cause of denervation supersensitivity. *The Journal of urology*, 1987, 138: 1461-1466.
15. Andersson K-E, Yoshida M. Antimuscarinics and the overactive detrusor—which is the main mechanism of action? *European urology*, 2003, 43: 1-5.

16. Oelke M, Baard J, Wijkstra H, Jean J, Jonas U, Höfner K. Age and bladder outlet obstruction are independently associated with detrusor overactivity in patients with benign prostatic hyperplasia. *European urology*, 2008, 54: 419-426.
17. Lee JY, Kim DK, Chancellor MB. When to use antimuscarinics in men who have lower urinary tract symptoms. *Urologic Clinics*, 2006, 33: 531-537.
18. Irwin DE, Milsom I, Hunskaar S, Reilly K, Kopp Z, Herschorn S, Coyne K, Kelleher C, Hampel C, Artibani W. Population-based survey of urinary incontinence, overactive bladder, and other lower urinary tract symptoms in five countries: results of the EPIC study. *European urology*, 2006, 50: 1306-1315.
19. Briganti A, Capitanio U, Suardi N, Gallina A, Salonia A, Bianchi M, Tutolo M, Di Girolamo V, Guazzoni G, Rigatti P. Benign prostatic hyperplasia and its aetiologies. *European Urology Supplements*, 2009, 8: 865-871.
20. McGowan CC, Krieger J. Prostatitis, epididymitis, and orchitis. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 2015. 1381-1387.
21. McVary KT, Roehrborn CG, Avins AL, Barry MJ, Bruskewitz RC, Donnell RF, Foster HE, Gonzalez CM, Kaplan SA, Penson DF. Update on AUA guideline on the management of benign prostatic hyperplasia. *The Journal of urology*, 2011, 185: 1793-1803.
22. Garraway W, Lee R, Collins G. High prevalence of benign prostatic hypertrophy in the community. *The Lancet*, 1991, 338: 469-471.
23. Eckhardt MD, van Venrooij GE, Boon TA. Symptoms, prostate volume, and urodynamic findings in elderly male volunteers without and with LUTS and in patients with LUTS suggestive of benign prostatic hyperplasia. *Urology*, 2001, 58: 966-971.
24. Konwar R, Chattopadhyay N, Bid HK. Genetic polymorphism and pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *BJU international*, 2008, 102: 536-544.

25. Parsons JK. Benign prostatic hyperplasia and male lower urinary tract symptoms: epidemiology and risk factors. *Current bladder dysfunction reports*, 2010, 5: 212-218.
26. Wei JT, Calhoun E, Jacobsen SJ. Urologic diseases in America project: benign prostatic hyperplasia. *The Journal of urology*, 2005, 173: 1256-1261.
27. Dönmez İ, Mungan A. BPH prevalansı ve ülke gerçekleri. *Üroonkoloji Bülteni*, 2011, 4: 11-14.
28. Roehrborn CG. Etiology, pathophysiology, epidemiology and natural history of benign prostatic hyperplasia. *Campbell's urology*, 2002: 1297-1330.
29. Kaplan SA, Roehrborn CG, Rovner ES, Carlsson M, Bavendam T, Guan Z. Tolterodine and tamsulosin for treatment of men with lower urinary tract symptoms and overactive bladder: a randomized controlled trial. *Jama*, 2006, 296: 2319-2328.
30. Emberton M, Fitzpatrick JM, Rees J. Risk stratification for benign prostatic hyperplasia (BPH) treatment. *BJU international*, 2011, 107: 876-880.
31. Barry MJ, Fowler FJ, O'Leary MP, Bruskewitz RC, Holtgrewe HL, Mebust WK, Cockett AT, Association* MCotAU. The American Urological Association symptom index for benign prostatic hyperplasia. *The Journal of urology*, 1992, 148: 1549-1557.
32. Atan A. Benign prostat hiperplazisi ile ilişkili alt üriner sistem yakınmalarının tedavisinde tadalafil 5 mg'ın etkinliği. *Androloji Bülteni* 19.1: 22-24.
33. Samarinas M, Gacci M, Taille A, Gravas S. Prostatic inflammation: a potential treatment target for male LUTS due to benign prostatic obstruction. *Prostate cancer and prostatic diseases*, 2018: 1.
34. Chess-Williams R, Chapple C, Yamanishi T, Yasuda K, Sellers D. The minor population of M3-receptors mediate contraction of human detrusor muscle in vitro. *Journal of autonomic pharmacology*, 2001, 21: 243-248.

35. Appell RA. Pharmacotherapy for overactive bladder. *Drugs*, 2006, 66: 1361-1370.
36. Thüroff J, Chartier-Kastler E, Corcus J, Humke J, Jonas U, Palmtag H, Tanagho E. Medical treatment and medical side effects in urinary incontinence in the elderly. *World journal of urology*, 1998, 16: S48-S61.
37. Gravas S, Bach T, Bachmann A, Drake M, Gacci M, Gratzke C. EAU guidelines on the management of non-neurogenic male lower urinary tract symptoms (LUTS), incl. benign prostatic obstruction (BPO), *European Association of Urology Guidelines*, 2018.
38. Caine M. The present role of alpha-adrenergic blockers in the treatment of benign prostatic hypertrophy. *The Journal of urology*, 1986, 136: 1-4.
39. Yono M, Tanaka T, Tsuji S, Irie S, Sakata Y, Otani M, Yoshida M, Latifpour J. Effects of age and hypertension on $\alpha 1$ -adrenoceptors in the major source arteries of the rat bladder and penis. *European journal of pharmacology*, 2011, 670: 260-265.
40. Hieble JP, Bylund DB, Clarke DE, Eikenburg DC, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Ruffolo R. International Union of Pharmacology. X. Recommendation for nomenclature of alpha 1-adrenoceptors: consensus update. *Pharmacological Reviews*, 1995, 47: 267-270.
41. Chapple C, Wyndaele J, Nordling J, Boeminghaus F, Ypma A, Abrams P. Tamsulosin, the first prostate-selective alpha 1A-adrenoceptor antagonist. A meta-analysis of two randomized, placebo-controlled, multicentre studies in patients with benign prostatic obstruction (symptomatic BPH). *European Tamsulosin Study Group*. 1996, 155-167.
42. Yamanishi T, Mizuno T, Kamai T, Yoshida KI, Sakakibara R, Uchiyama T. Management of benign prostatic hyperplasia with silodosin. *Open access journal of urology*, 2009, 1: 1.

43. Milani S, Djavan B. Lower urinary tract symptoms suggestive of benign prostatic hyperplasia: latest update on α 1-adrenoceptor antagonists. *BJU international*, 2005, 95: 29-36.
44. Tunçkiran A, Özkardeş H. Benign Prostat Hiperplazisinde Alfa Bloker Tedavisi ve Alfa Blokerlerin Geleceği. *Turk Urol Sem*, 2010, 1: 1-4.
45. Atan A, Tuncel A. Treatment options in benign prostate hyperplasia associated with lower urinary tract symptoms. *Turkish Journal of Urology*, 2012, 38: 228-32.
46. Oelke M, Bachmann A, Descaseaud A, Emberton M, Gravas S, Michel M, N'dow J, Nordling J, De la Rosette J. Guidelines on the management of male lower urinary tract symptoms (LUTS), incl. benign prostatic obstruction (BPO). *Eur Urol*, 2012.
47. Gravas S, Cornu J, Drake M, Gacci M, Gratzke C, Herrmann T, Madersbacher S, Mamoulakis C, Tikkinen K. Management of Non-Neurogenic Male Lower Urinary Tract Symptoms (LUTS), incl. Benign Prostatic Obstruction (BPO) *the European Association of Urology Guidelines*, 2012.
48. Lee SH, Byun SS, Lee SJ, Kim KH, Lee JY. Effects of initial combined tamsulosin and solifenacin therapy for overactive bladder and bladder outlet obstruction secondary to benign prostatic hyperplasia: a prospective, randomized, multicenter study. *International Urology and Nephrology*, 2014, 46: 523-529.
49. Lee S, Chung B, Kim S, Kim J, Kim J, Lee J. Initial combined treatment with anticholinergics and α -blockers for men with lower urinary tract symptoms related to BPH and overactive bladder: a prospective, randomized, multi-center, double-blind, placebo-controlled study. *Prostate cancer and prostatic diseases*, 2011, 14: 320.
50. MacDiarmid SA, Peters KM, Chen A, Armstrong RB, Orman C, Aquilina JW, Nitti VW. Efficacy and safety of extended-release oxybutynin in combination with tamsulosin for treatment of lower urinary tract symptoms in men: randomized, double-

blind, placebo-controlled study. *Mayo Clinic Proceedings, Elsevier*, 2008, 83: 1002-1010.

51. Athanasopoulos A, Chapple C, Fowler C, Gratzke C, Kaplan S, Stief C, Tubaro A. The role of antimuscarinics in the management of men with symptoms of overactive bladder associated with concomitant bladder outlet obstruction: an update. *European urology*, 2011, 60: 94-105.

52. Abrams P, Chapple C, Khoury S, Roehrborn C, De la Rosette J. International Consultation on New Developments in Prostate Cancer and Prostate Diseases. Evaluation and treatment of lower urinary tract symptoms in older men. *J Urol*, 2013, 189: 93-101.

53. Cramer JA, Roy A, Burrell A, Fairchild CJ, Fuldeore MJ, Ollendorf DA, Wong PK. Medication compliance and persistence: terminology and definitions. *Value in Health*, 2008, 11: 44-47.

54. Matsubara Y, Kanazawa T, Kojima Y, Abe Y, Kobayashi K, Kanbe H, Harada H, Momose Y, Terakado S, Adachi Y. Pharmacokinetics and disposition of silodosin (KMD-3213). *Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 2006, 126: 237-245.

55. Cantrell MA, Bream-Rouwenhorst HR, Hemerson P, Magera Jr JS. New drug approvals: silodosin for benign prostatic hyperplasia. *Annals of Pharmacotherapy*, 2010, 44: 302-310.

56. Wilde M, McTavish D. Tamsulosin. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in the management of distal ureteral stones. *Urology*, 2000, 56: 579.

57. Choi C-I, Lee H-I, Bae J-W, Lee Y-J, Byeon J-Y, Jang C-G, Lee S-Y. Determination of tamsulosin in human plasma by liquid chromatography/tandem mass

spectrometry and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*, 2012, 909: 65-69.

58. Maniscalco M, Singh-Franco D, Wolowich WR, Torres-Colón R. Solifenacin succinate for the treatment of symptoms of overactive bladder. *Clinical therapeutics*, 2006, 28: 1247-1272.

59. Masunaga K, Yoshida M, Inadome A, Murakami S, Sugiyama Y, Satoji Y, Maeda Y, Ueda S. Pharmacological effects of solifenacin on human isolated urinary bladder. *Pharmacology*, 2008, 82: 43-52.

60. Uchida T, Krauwinkel WJ, Mulder H, Smulders RA. Food does not affect the pharmacokinetics of solifenacin, a new muscarinic receptor antagonist: results of a randomized crossover trial. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2004, 58: 4-7.

61. Boltia SA, Abdelkawy M, Mohammed TA, Mostafa NN. Validated stability-indicating spectrophotometric methods for the determination of Silodosin in the presence of its degradation products. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2018, 202: 131-145.

62. Mounika C, Umadevi N, Sudheerbabu I. New visible spectrophotometric methods for the estimation of silodosin in pharmaceutical formulations. *International Journal of Pharmacy and Chemistry*, 2013, 3: 595-597.

63. PrachiBhamre SJR. Spectrofluorimetric method for the determination of silodosin in bulk and pharmaceutical dosage form. *Indo Am. J. Pharm. Res.*, 2014, 4: 5106-5110.

64. Rasheed A, Mounika P, Azeem A, Prashanth S. Development and validation of Silodosin in tablet formulation by various UV spectrophotometric methods. *Inventi Rapid: Pharm Analysis & Quality Assurance*, 2013.

65. Vishnuvardhan C, Saibaba B, Allakonda L, Swain D, Gananadhamu S, Srinivas R, Satheeshkumar N. LC–ESI–MS/MS evaluation of forced degradation behaviour of

silodosin: In vitro anti cancer activity evaluation of silodosin and major degradation products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2017, 134: 1-10.

66. Belal F, Walash M, Fathy M, Zayed S, Borg H. Sensitive analysis of five alpha blockers in dosage forms and human plasma by field amplified sample injection combined with micellar electrokinetic chromatography. *Microchemical Journal*, 2019, 146: 1173-1180.

67. Shah PA, Shrivastav PS. Determination of silodosin and its active glucuronide metabolite KMD-3213G in human plasma by LC–MS/MS for a bioequivalence study. *Biomedical Chromatography*, 2018, 32: e4041.

68. Nair S, Kumar R, Sharma M, Karia D. Development and validation of high performance LCMS methods for estimation of silodosin and silodosin β -D-glucuronide in human plasma. *Pharm Anal Chem*, 2016, 3: 1.

69. Wang Z, Xiang Q, Cui Y, Zhao X, Zhou Y. The Influence of UGT 2B7, UGT1A8, MDR1, ALDH, ADH, CYP3A4 and CYP3A5 genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of silodosin in healthy Chinese volunteers. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 2012: DMPK-12-RG-106.

70. Zhao X, Liu Y, Xu J, Zhang D, Zhou Y, Gu J, Cui Y. Determination of silodosin in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2009, 877: 3724-3728.

71. Aneesh T, Rajasekaran A. Development and validation of HPLC method for the estimation of silodosin in bulk and pharmaceutical dosage form. *Int J Biol Pharm Res*, 2012, 3: 693-6.

72. Harischandran S, Iyer R, Raju R, Shibi A, Sayana P. Validated stability indicating RP-HPLC method for the determination of Silodosin in pharmaceutical dosage form. *Inter. J. Pharma. Res. Sch*, 2012, 1: 141-145.

73. Er E, Erk N. An effective and sensitive stability-indicating chromatographic approach based on HPLC for silodosin assay. *Journal of Analytical Science and Technology*, 2016, 7: 20.
74. Shaik JV, Saladi S, Sait SS. Development of stability-indicating UHPLC method for the quantitative determination of silodosin and its related substances. *Journal of Chromatographic Science*, 2013, 52: 646-653.
75. Toker B, Er E, Erk N. Development of voltammetric techniques for the determination of silodosin in pharmaceutical formulation at glassy carbon electrode. *Revue Roumaine de Chimie*, 2014, 59: 311-316.
76. Goud VM, Rao AS, Ranjan SP, Shalini S, Sowmya S, Bhoga B. Method development and validation of RP-HPLC method for assay of Sildosin in pharmaceutical dosage form. *Inter. J. Pharma. Sci*, 2013, 3: 194-196.
77. Walash M, Belal F, Fathy M, Zayed S, Borg H. Simultaneous HPLC determination of alfuzosin, tamsulosin and vardenafil in human plasma and pharmaceutical formulations using time programmed fluorescence detection, *Annales pharmaceutiques francaises, Elsevier*, 2019, 28-37.
78. Pashaei Y, Ghorbani-Bidkorbeh F, Shekarchi M. Superparamagnetic graphene oxide-based dispersive-solid phase extraction for preconcentration and determination of tamsulosin hydrochloride in human plasma by high performance liquid chromatography-ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A*, 2017, 1499: 21-29.
79. Macek J, Klima J, Ptáček P. Rapid determination of tamsulosin in human plasma by high-performance liquid chromatography using extraction with butyl acetate. *Journal of Chromatography B*, 2004, 809: 307-311.

80. Kumari R, Dash P, Lal V, Mishra A, Murthy P. RP–HPLC method for the estimation of Tamsulosin Hydrochloride in Tablet Dosage Form. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010, 72: 785.
81. Chandorkar J, Kotwal V, Dhande N, Gurav S, Pande V, Yadav P. A sensitive HPLC method for simultaneous estimation of tamsulosin hydrochloride and its impurity. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2008, 21.
82. Kumar G, Kumar BSP. Stability-indicating RP-HPLC method for determination of tamsulosin in pharmaceutical dosage form. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 2012, 3: 255.
83. Nithiyananthan T, Shankarananth V, Rajasekhar K, Ravikiran P, Vikram Kumar E, Jayanth Kumar Reddy G. RP-HPLC method for the estimation of tamsulosin hydrochloride in bulk and tablet dosage form. *Drug Invention Today*, 2009, 1.
84. Laha T, Mishra S, Sen S. RP-HPLC Method for the Determination of Tamsulosin in Bulk and Pharmaceutical Dosage Forms. *Asian Journal of Chemistry*, 2011, 23: 11.
85. Jain PS, Chaudhari AJ, Bari PR, Surana S. Validated stability-indicating RP-HPLC method for tamsulosin hydrochloride in pharmaceutical dosage form according to ICH guidelines: Application to stability studies. *Der Pharmacia Lettre*, 2012, 4: 1760-1767.
86. Thimmaraju MK, Rao V, Hemanth K, Kumar PS. RP HPLC Method for the determination of Tamsulosin in bulk and Pharmaceutical formulations. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2011, 1: 177.
87. Patel DB, Patel N. Validated reversed-phase high-performance liquid chromatographic and high-performance thin-layer chromatographic methods for simultaneous analysis of tamsulosin hydrochloride and dutasteride in pharmaceutical dosage forms. *Acta Chromatographica*, 2010, 22: 419-431.

88. Zhang Z, Yang G, Liang G, Liu H, Chen Y. Chiral separation of Tamsulosin isomers by HPLC using cellulose Tris (3, 5-dimethylphenylcarbamate) as a chiral stationary phase. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2004, 34: 689-693.
89. Kantor-Boruta M, Lisowska-Kuźmicz M, Jończyk A, Siedlecka J, Ocios-Bębenek A, Jarończyk M, Mazurek AP, Ksycińska H, Chilmonczyk Z, Jarosz M. The new HPLC methodology for the chiral separation of tamsulosin enantiomers on amylose tris (3, 5-dimethylphenylcarbamate) stationary phase. *Talanta*, 2012, 102: 75-78.
90. Rao MVB, Reddy B, Rao TS, Jha A. Development and validation of dissolution test for tamsulosin hydrochloride pellets. *Oriental Journal of Chemistry*, 2008, 24: 1049-1052.
91. Siva Rama Krishna G, Janardhan M, Rasool S. Development and validation of stability-indicating RP-HPLC method for estimation of tamsulosin pellets. *International Journal of Pharmaceutical Invention*, 2012, 2: 51-60.
92. Cheng Z-z, Gao Y, Li H. HPLC determination of content and related substances of tamsulosin hydrochloride and its sustained release capsules. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2008, 28: 2055-2058.
93. Nanda R, Gaikwad J, Prakash A. Simultaneous Spectrophotometric Estimation of Tamsulosin in Pharmaceutical Dosage Form. *Asian Journal of Research in Chemistry*, 2009, 2: 63-65.
94. Gadhave N, Sawant S, Ghante M, Nikam A. Spectrophotometric estimation of tamsulosin hydrochloride in tablet dosage form. *International Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 2011, 3: 87-92.

95. Bari S, Bakshi A, Jain P, Surana S. Application of UV-spectroscopy and first order derivative method for determination of tamsulosin hydrochloride in bulk and tablets. *Pharm Anal Acta*, 2011, 2: 2.
96. Shrivastava A, Saxena P, Gupta VB. Spectrophotometric estimation of tamsulosin hydrochloride by acid-dye method. *Pharmaceutical methods*, 2011, 2: 53-60.
97. Chaudhari B, Patel N, Patel D. Spectrophotometric method for estimation of tamsulosin hydrochloride in pharmaceutical dosage form using bromate-bromide and methyl orange reagent. *International Journal of Pharmaceutical Research Scholars*, 2012, 1: 104-111.
98. Patel D, Patel N, Chaudhari B. Validated spectrofluorimetric method for the determination of tamsulosin hydrochloride in tablet dosage form. *Der Pharmacia Sinica*, 2011, 2: 172-175.
99. Raghubabu K, Shanti Swarup L, Kalyanaramu B, Rao M, Ramdas C. Simple and inexpensive methods development for the estimation of tamsulosin hydrochloride as a single component from its solid dosage forms by Visible spectrophotometry. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 2012, 2: 12-19.
100. Saradhi SV, Meherjaha S, Jyothsna N, Priyanka A, Sirisha PB, Ramakrishna C, Sekaran CB. Novel spectroscopic methods for the determination of tamsulosin in bulk and capsules. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2012, 4: 1958.
101. Thimmaraju MK, Rao V, Gurralla S, Reddy GJ. UV spectrophotometric method for simultaneous determination of finasteride and tamsulosin in combined dosage form. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 2011, 1: 303-310.
102. Kategaonkar AH, Patel DM, Choudhari VP, Kuchekar BS, Nikalje AG. Simultaneous determination of Finasteride and Tamsulosin in pharmaceutical preparations by ratio derivative spectroscopy. *J Pharm Res*, 2009, 2: 1065-1067.

103. Nanda RK, Gaikwad J, Prakash A. Estimation of Tamsulosin and Tolterodine in its pharmaceutical dosage form by spectrophotometric method. *International Journal of PharmTech Research*, 2009, 1(3), 420-3.
104. Choudhari VP, Gite SR, Raut RP, Hable AA, Parekar SR, Kuchekar BS. Spectrophotometric simultaneous determination of dutasteride and tamsulosin in combined tablet dosage form by first order derivative spectroscopy and area under curve (AUC) spectrophotometric methods and its application to uniformity of content in tablet and capsule. *International Journal of Pharmaceutical Sciences, Review Research*, 2010, 2: 63-67.
105. Fan H, Gu Y, Si D, Liu C. Determination of tamsulosin in dog plasma by a high sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometric method. *Yao xue xue bao= Acta pharmaceutica Sinica*, 2007, 42: 872-876.
106. Matsushima H, Takanuki KI, Kamimura H, Watanabe T, Higuchi S. Highly sensitive method for the determination of tamsulosin hydrochloride in human plasma dialysate, plasma and urine by high-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1997, 695: 317-327.
107. Ding L, Li L, Tao P, Yang J, Zhang Z. Quantitation of tamsulosin in human plasma by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2002, 767: 75-81.
108. Keski-Rahkonen P, Pärssinen O, Leppänen E, Mauriala T, Lehtonen M, Auriola S. Determination of tamsulosin in human aqueous humor and serum by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2007, 43: 606-612.

109. Ksycińska H, Rudzki PJ. Validated LC-MS method for determination of tamsulosin in human plasma and its application to pharmacokinetic study. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 2006, 63 (5): 417-9.
110. Ramakrishna N, Vishwottam K, Manoj S, Koteshwara M, Wishu S, Varma D. Rapid, simple and highly sensitive LC-ESI-MS/MS method for the quantification of tamsulosin in human plasma. *Biomedical Chromatography*, 2005, 19: 709-719.
111. Nguyen G, Huynh D, Nguyen K, Tran H, Nguyen V. A LCMS-IT-TOF method for the quantification of tamsulosin in human plasma and application to a bioequivalence study in healthy Vietnamese volunteers. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2016, 43 (1): 17-27.
112. Agarwal S, Gowda KV, Sarkar AK, Ghosh D, Bhaumik U, Chattaraj TK, Pal TK. Simultaneous determination of tamsulosin and dutasteride in human plasma by LC–MS–MS. *Chromatographia*, 2008, 67: 893.
113. Singh L, Nanda S. Spectrophotometric estimation of solifenacin succinate in tablet formulations. *Pharmaceutical methods*, 2011, 2: 21-24.
114. Saiyed N, Patel D, Desai S. Development and validation of first order derivative spectrophotometric method for estimation of Alfuzosin hydrochloride and Solifenacin Succinate in combined dosage form. *Inter. J. Pharmacy. Pharma. Res*, 2015, 2: 175-183.
115. Madhu Kiran M, Rambabu C. Two Direct Simple Visible Spectrophotometric Assay Methods Of Solifenacin Succinate In Oral Tablet Formulations. *Rasayan Journal of Chemistry*, 2017, 10: 1068-1074.
116. Rakesh B, Bhargavi P, Reddy SR, Kumar AA. UV-Spectrophotometric method development and validation for the quantitative estimation of solifenacin succinate in tablets. *Int J Pharm Pharm Sci*, 2014, 6: 190-193.

117. Teja G, Dasu C, Srinivasa B, Ravisankar P. Quantitative analysis of solifenacin succinate in pharmaceutical dosage form using UV absorption spectroscopy. *J Chem Pharm Sci*, 2013, 6: 195-8.
118. Shaik RP, Puttagunta SB, Kothapalli Bannoth C, Challa BSR. Analytical method development and validation of solifenacin in pharmaceutical dosage forms by RP-HPLC. *ISRN Analytical Chemistry*, 2014, 2014.
119. Annapurna MM, Sowjanya G, Naidu MS, Lohithasu D. A validated liquid chromatographic method for the determination of solifenacin succinate (Urinary antispasmodic) in tablets. *Chem Sci Trans*, 2014, 3: 602-7.
120. Yanagihara T, Aoki T, Soeishi Y, Iwatsubo T, Kamimura H. Determination of solifenacin succinate, a novel muscarinic receptor antagonist, and its major metabolite in rat plasma by semi-micro high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 2007, 859: 241-245.
121. Attia AK, Frag EY, Mohamed GG, Ahmed HE. Liquid chromatographic determination of solifenacin succinate, flavoxate hydrochloride and tolterodine tartrate in bulk drugs and their pharmaceutical dosage forms. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 2016, 61: 2772-2776.
122. Krishna SR, Rao B, Rao NS. A validated rapid stability-indicating method for the determination of related substances in solifenacin succinate by ultra-fast liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 2010, 48: 807-810.
123. Reddy B, Reddy BS, Raman N, Reddy KS, Rambabu C. Development and validation of a specific stability indicating high performance liquid chromatographic methods for related compounds and assay of solifenacin succinate. *Journal of Chemistry*, 2012, 2013.

124. Mistri HN, Jangid AG, Pudage A, Rathod DM, Shrivastav PS. Highly sensitive and rapid LC–ESI-MS/MS method for the simultaneous quantification of uroselective α 1-blocker, alfuzosin and an antimuscarinic agent, solifenacin in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 2008, 876: 236-244.
125. Macek J, Ptáček P, Klíma J. Determination of solifenacin in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2010, 878: 3327-3330.
126. Ganthi HKR, Reddy R, Park YJ, Bapatu HR, Park SJ, Cho WH. Stability Indicating HPLC Method for Quantification of Solifenacin Succinate & Tamsulosin Hydrochloride along with Its Impurities in Tablet Dosage Form. *American Journal of Analytical Chemistry*, 2016, 7: 840-862.
127. Israel DS, Krishnachaitanya K, Gowrisankar D. RP-HPLC method for the estimation of tamsulosin and solifenacin in bulk and its dosage forms. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2013, 4: 4343.
128. Naraparaju S, Anumolu PKD, Gurralla S, Galennagari R. Quantification of tamsulosin hydrochloride and solifenacin succinate by discriminative derivative synchronous emission spectroscopy. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018, 15(2):149-155.
129. El-Kimary EI, Khamis EF, Belal SF, Abdel Moneim MM. Enhanced spectrofluorimetric determination of two novel combination therapies for the treatment of benign prostatic hyperplasia containing tamsulosin hydrochloride. *Luminescence*, 2018, 33: 771-779.
130. El-Kimary EI, Khamis EF, Belal SF, Abdel Moneim MM. Novel validated HPTLC method for the analysis of two binary mixtures containing tamsulosin

hydrochloride with antimuscarinic agents. *Journal of chromatographic science*, 2017, 56: 81-91.

131. Vargas DA, Prieto MD, Martínez AJ, Cossio A, Burgess KE, Burchmore R, Gómez MA. Pharmacometabolomics of meglumine antimoniate in patients with cutaneous leishmaniasis. *Frontiers in Pharmacology*, 2019, 10: 657.

132. Rotroff DM, Oki NO, Liang X, Yee SW, Stocker SL, Corum DG, Meisner M, Fiehn O, Motsinger-Reif AA, Giacomini KM. Pharmacometabolomic assessment of metformin in non-diabetic, African Americans. *Frontiers in Pharmacology*, 2016, 7: 135.

133. Yao Y, Zhang P, Wang J, Chen J, Wang Y, Huang Y, Zhang Z, Xu F. Dissecting target toxic tissue and tissue specific responses of irinotecan in rats using metabolomics approach. *Frontiers in pharmacology*, 2017, 8: 122.

134. Bordag N, Klie S, Jürchott K, Vierheller J, Schiewe H, Albrecht V, Tonn J-C, Schwartz C, Schichor C, Selbig J. Glucocorticoid (dexamethasone)-induced metabolome changes in healthy males suggest prediction of response and side effects. *Scientific Reports*, 2015, 5: 15954.

135. Amin AM, Sheau CL, Azri MND, Kader SA, Ali M, Kah HY, Ibrahim B. The personalization of clopidogrel antiplatelet therapy: The role of integrative pharmacogenetics and pharmacometabolomics. *Cardiology Research and Practice*, 2017, 2017.

136. Lewis T, Chalise P, Gauldin C, Truog W. Pharmacometabolomics of respiratory phenotypic response to dexamethasone in preterm infants at risk for bronchopulmonary dysplasia. *Clinical and Translational Science*, 2019.

137. Malkawi AK, Alzoubi KH, Jacob M, Matic G, Ali A, Al Faraj A, Almuhanha F, Dasouki M, Abdel Rahman AM. Metabolomics based profiling of dexamethasone side effects in rats. *Frontiers in Pharmacology*, 2018, 9: 46.

138. Kaddurah-Daouk R, Hankemeier T, Scholl EH, Baillie R, Harms A, Stage C, Dalhoff KP, Jürgens G, Taboureau O, Nzabonimpa GS. Pharmacometabolomics informs about pharmacokinetic profile of methylphenidate. *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology*, 2018, 7: 525-533.
139. Gao Y, Li W, Chen J, Wang X, Lv Y, Huang Y, Zhang Z, Xu F. Pharmacometabolomic prediction of individual differences of gastrointestinal toxicity complicating myelosuppression in rats induced by irinotecan. *Acta pharmaceutica sinica B*, 2019, 9: 157-166.
140. Kim JY, Park JY, Kim OY, Ham BM, Kim H-J, Kwon DY, Jang Y, Lee JH. Metabolic profiling of plasma in overweight/obese and lean men using ultra performance liquid chromatography and Q-TOF mass spectrometry (UPLC– Q-TOF MS). *Journal of Proteome Research*, 2010, 9: 4368-4375.
141. Martínez-Ávila J, Bartolomé AG, García I, Dapía I, Tong HY, Díaz L, Guerra P, Frías J, Sansuan AC, Borobia A. Pharmacometabolomics applied to zonisamide pharmacokinetic parameter prediction. *Metabolomics*, 2018, 14: 70.
142. Skoog DA, Leary J. *Principles of Instrumental analysis*, Fourth edition. 1997.
143. Gündüz T. *İnstrümental Analiz*, 10. Baskı. Ankara: Gazi Kitabevi, 2007.
144. Wiberg K. Multivariate spectroscopic methods for the analysis of solutions. Department of Analytical Chemistry. PhD Thesis, Stockholm: Stockholm University, 2004.
145. Majors RE, Przybyciel M. Columns for reversed-phase LC separations in highly aqueous mobile phases. *LC GC North America*, 2002, 20: 584-593.
146. Cody RB, Pramanik BN, Ganguly AK, Gross ML. Electrospray ionization mass spectrometry. *Applied electrospray mass spectrometry: practical spectroscopy series*, 2002, 32: 1-104.

147. Pitt JJ. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical Biochemist Reviews*, 2009, 30: 19.
148. Dougherty RC. Negative chemical ionization mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 1981, 53: 625-636.
149. Mora JF, Van Berkel GJ, Enke CG, Cole RB, Martinez-Sanchez M, Fenn JB. Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 2000, 35: 939-952.
150. Hillenkamp F, Lough DM, Higgins GS, Reuter D. (inventors) Method and apparatus for MALDI analysis, US5,777,324, 2004.
151. Ardrey RE. *Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction*. 2nd ed. John Wiley & Sons, 2003.
152. Al-Asmari AI, Anderson RA. Method for quantification of opioids and their metabolites in autopsy blood by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of analytical toxicology*, 2007, 31: 394-408.
153. Wu C, Dill AL, Eberlin LS, Cooks RG, Ifa DR. Mass spectrometry imaging under ambient conditions. *Mass spectrometry reviews*, 2013, 32: 218-243.
154. US Food and Drug Administration. Bioanalytical Method Validation, Guidance for Industry. *US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Rockville, MD*, 2001.
155. Hubert P, Nguyen-Huu J-J, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, Compagnon P-A, Dewé W, Feinberg M, Lallier M. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: a SFSTP proposal—part I. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2004, 36: 579-586.
156. Schneider MV, Orchard S. Omics technologies, data and bioinformatics principles. *Bioinformatics for omics Data*, Springer, 2011: 3-30.

157. Horgan RP, Kenny LC. 'Omic' technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. *The Obstetrician & Gynaecologist*, 2011, 13: 189-195.
158. Bren L. Metabolomics: working toward personalized medicine. *FDA consumer*, 2005, 39: 28-33.
159. Coşkun T. Nütrisyonel genomik. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 2007, 50: 47-66.
160. Kouremenos KA, Johansson M, Marriott PJ. Advances in gas chromatographic methods for the identification of biomarkers in cancer. *Journal of Cancer*, 2012, 3: 404.
161. Chan AW, Gill RS, Schiller D, Sawyer MB. Potential role of metabolomics in diagnosis and surveillance of gastric cancer. *World journal of gastroenterology: WJG*, 2014, 20: 12874.
162. Fiehn O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *International Journal of Genomics*, 2001, 2: 155-168.
163. Ryan D, Robards K. Metabolomics: the greatest omics of them all? *Analytical chemistry*, 2006, 78: 7954-7958.
164. Armitage EG, Barbas C. Metabolomics in cancer biomarker discovery: current trends and future perspectives. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2014, 87: 1-11.
165. Naz S, Vallejo M, García A, Barbas C. Method validation strategies involved in non-targeted metabolomics. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1353: 99-105.
166. Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass spectrometry reviews*, 2007, 26: 51-78.
167. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA. The sequence of the human genome. *science*, 2001, 291: 1304-1351.

168. Kaddurah-Daouk R, Weinshilboum R, Network PR. Metabolomic signatures for drug response phenotypes: pharmacometabolomics enables precision medicine. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2015, 98: 71-75.
169. Idle JR, Gonzalez FJ. Metabolomics. *Cell metabolism*, 2007, 6: 348-351.
170. Sussulini A. *Metabolomics: from fundamentals to clinical applications*. 1st ed. Springer, 2017.
171. Cambiaghi A, Ferrario M, Masseroli M. Analysis of metabolomic data: tools, current strategies and future challenges for omics data integration. *Briefings in Bioinformatics*, 2016, 18: 498-510.
172. Goodacre R, Broadhurst D, Smilde AK, Kristal BS, Baker JD, Beger R, Bessant C, Connor S, Capuani G, Craig A. Proposed minimum reporting standards for data analysis in metabolomics. *Metabolomics*, 2007, 3: 231-241.
173. Bartel J, Krumsiek J, Theis FJ. Statistical methods for the analysis of high-throughput metabolomics data. *Computational and structural biotechnology journal*, 2013, 4: e201301009.
174. Worley B, Powers R. Multivariate analysis in metabolomics. *Current Metabolomics*, 2013, 1: 92-107.
175. Branch SK. Guidelines from the international conference on harmonisation (ICH). *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2005, 38: 798-805.
176. Novara G, Galfano A, Ficarra V, Artibani W. Anticholinergic drugs in patients with bladder outlet obstruction and lower urinary tract symptoms: a systematic review. *European urology*, 2006, 50: 675-683.
177. Tóthos R, Balazsi J. Validated LC-MS/MS method for the determination of the muscarinic receptor antagonist (MRA) solifenacin from human plasma. *Studia Universitatis Babes-Bolyai, Chemia*, 2019, 64.

178. Bjerrum JT, Nielsen OH, Hao F, Tang H, Nicholson JK, Wang Y, Olsen J. Metabonomics in ulcerative colitis: diagnostics, biomarker identification, and insight into the pathophysiology. *Journal of proteome research*, 2009, 9: 954-962.
179. Everett JR. From metabonomics to pharmacometabonomics: the role of metabolic profiling in personalized medicine. *Frontiers in pharmacology*, 2016, 7: 297.
180. Montorsi F. Profile of silodosin. *European Urology Supplements*, 2010, 9: 491-495.
181. Choo MS, Song M, Kim JH, Lee K-S, Kim JC, Kim SW, Yang SK, Lee JG, Lee JZ, Kim DK. Safety and efficacy of 8-mg once-daily vs 4-mg twice-daily silodosin in patients with lower urinary tract symptoms suggestive of benign prostatic hyperplasia (SILVER Study): a 12-week, double-blind, randomized, parallel, multicenter study. *Urology*, 2014, 83: 875-881.
182. Wilt T, MacDonald R, Rutks I. Tamsulosin for benign prostatic hyperplasia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2002.
183. Chu F, Smith N, Uchida T. Efficacy and safety of solifenacin succinate 10 mg once daily: a multicenter, phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group trial in patients with overactive bladder. *Current therapeutic research*, 2009, 70: 405-420.
184. Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T. Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. *Chemistry and physics of lipids*, 2000, 106: 1-29.
185. Ketteler M, Ikegaya N, Brees DK, Border WA, Noble NA. L-arginine metabolism in immune-mediated glomerulonephritis in the rat. *American journal of kidney diseases*, 1996, 28: 878-887.

186. Pelley JW. *Elsevier's Integrated Review Biochemistry*. 2nd ed. Elsevier Health Sciences, 2011.
187. Coulson CJ. *Molecular mechanisms of drug action*. 2nd ed. CRC Press, 2014.
188. Norris DO, Carr JA. Synthesis, Metabolism, and Actions of Bioregulators. *Vertebrate Endocrinology*, 2007: 54-56.
189. Merrill Jr AH. Sphingosine and other long-chain bases that alter cell behavior. *Current Topics in Membranes, Elsevier*, 1994: 361-386.
190. Merrill Jr AH, Yusuf A. Sphingolipid metabolism and cell signaling, Part A and B. *Method Enzymol*, 2000, 311: 3-748.
191. Igarashi Y. Functional roles of sphingosine, sphingosine 1-phosphate, and methylsphingosines: in regard to membrane sphingolipid signaling pathways. *The Journal of Biochemistry*, 1997, 122: 1080-1087.
192. Malinsky J, Opekarová M. New insight into the roles of membrane microdomains in physiological activities of fungal cells. *International review of cell and molecular biology, Elsevier*, 2016: 119-180.
193. D'Ambrosio DN, Clugston RD, Blaner WS. Vitamin A metabolism: an update. *Nutrients*, 2011, 3: 63-103.
194. Lidén M, Eriksson U. Understanding retinol metabolism: structure and function of retinol dehydrogenases. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281: 13001-13004.
195. Rosdahl I, Andersson E, Kågedal B, Törma H. Vitamin A metabolism and mRNA expression of retinoid-binding protein and receptor genes in human epidermal melanocytes and melanoma cells. *Melanoma research*, 1997, 7: 267-274.
196. Cunningham GA, Mcclenaghan NH, Flatt PR, Newsholme P. L-Alanine induces changes in metabolic and signal transduction gene expression in a clonal rat pancreatic β -

cell line and protects from pro-inflammatory cytokine-induced apoptosis. *Clinical Science*, 2005, 109: 447-455.

197. Scheppach W, Dusel G, Kuhn T, Loges C, Karch H, Bartram H, Richter F, Christl S, Kasper H. Effect of L-glutamine and n-butyrate on the restitution of rat colonic mucosa after acid induced injury. *Gut*, 1996, 38: 878-885.

198. Kaya E, Ceylan A, Kara N, Gueven H, Yildiz L. The effect of L-glutamine on mucosal healing in experimental colitis is superior to short-chain fatty acids. *The Turkish Journal of Gastroenterology: The Official Journal of Turkish Society of Gastroenterology*, 2007, 18: 89-94.

199. Arnal JF, Münzel T, Venema RC, James NL, Bai CL, Mitch WE, Harrison DG. Interactions between L-arginine and L-glutamine change endothelial NO production. An effect independent of NO synthase substrate availability. *The Journal of Clinical Investigation*, 1995, 95: 2565-2572.

200. Murphy DL, Baker M, Goodwin FK, Miller H, Kotin J, Bunney WE. L-tryptophan in affective disorders: indoleamine changes and differential clinical effects. *Psychopharmacologia*, 1974, 34: 11-20.

201. Thor P, Krolczyk G, Gil K, Zurowski D, Nowak L. Melatonin and serotonin effects. *J Physiol Pharmacol*, 2007, 58: 97-105.

202. Azmitia EC. Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Research Bulletin*, 2001, 56: 413-424.

203. Pålsson E, Fejgin K, Wass C, Engel JA, Svensson L, Klamer D. The amino acid L-lysine blocks the disruptive effect of phencyclidine on prepulse inhibition in mice. *Psychopharmacology*, 2007, 192: 9-15.

204. Mailoo VJ, Rampes S. Lysine for Herpes Simplex Prophylaxis: A Review of the Evidence. *Integrative Medicine: A Clinician's Journal*, 2017, 16: 42.

205. Civitelli R, Villareal D, Agnusdei D, Nardi P, Avioli L, Gennari C. Dietary L-lysine and calcium metabolism in humans. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 1992, 8: 400-405.
206. Lukienko P, Mel'Nichenko N, Zverinskii I, Zabrodskaya S. Antioxidant properties of thiamine. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2000, 130: 874-876.
207. Poggi V, Rindi G, Patrini C, De Vizia B, Longo G, Andria G. Studies on thiamine metabolism in thiamine-responsive megaloblastic anaemia. *European Journal of Pediatrics*, 1989, 148: 307-311.
208. Barclay L, Gibson G, Blass J. Impairment of behavior and acetylcholine metabolism in thiamine deficiency. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1981, 217: 537-543.
209. Sookoian S, Pirola CJ. Alanine and aspartate aminotransferase and glutamine-cycling pathway: their roles in pathogenesis of metabolic syndrome. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 2012, 18: 3775.
210. Wade AM, Tucker HN. Antioxidant characteristics of L-histidine. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 1998, 9: 308-315.
211. Ma J, Stampfer MJ, Christensen B, Giovannucci E, Hunter DJ, Chen J, Willett WC, Selhub J, Hennekens CH, Gravel R. A polymorphism of the methionine synthase gene: association with plasma folate, vitamin B12, homocyst (e) ine, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 1999, 8: 825-829.
212. Borah MF, Schoenfeld PY, Gotch FA, Sargent JA, Wolfson M, Humphreys MH. Nitrogen balance during intermittent dialysis therapy of uremia. *Kidney international*, 1978, 14: 491-500.
213. Holick MF. Vitamin D: a D-Lightful health perspective. *Nutrition reviews*, 2008, 66: 182-194.

214. Hyppönen E, Boucher BJ, Berry DJ, Power C. 25-hydroxyvitamin D, IGF-1, and metabolic syndrome at 45 years of age: a cross-sectional study in the 1958 British Birth Cohort. *Diabetes*, 2008, 57: 298-305.
215. Saez G, Thornalley PJ, Hill H, Hems R, Bannister JV. The production of free radicals during the autoxidation of cysteine and their effect on isolated rat hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1982, 719: 24-31.
216. Taylor PG, Martinez-Torres C, Romano EL, Layrisse M. The effect of cysteine-containing peptides released during meat digestion on iron absorption in humans. *The American journal of clinical nutrition*, 1986, 43: 68-71.
217. Kheradmandi R, Jorsaraei SGA, Feizi F, Moghadamnia AA, Neamati N. Protective effect of N-acetyl cysteine on chlorpyrifos-induced testicular toxicity in mice. *Int J Fertil Steril*, 2019, 13.
218. Ghezzi P, Lemley KV, Andrus JP, De Rosa SC, Holmgren A, Jones D, Jahoor F, Kopke R, Cotgreave I, Bottiglieri T. Cysteine/Glutathione Deficiency: A Significant and Treatable Corollary of Disease. *The Therapeutic Use of N-Acetylcysteine (NAC) in Medicine*, Springer, 2019: 349-386.
219. Al-Salmi FA, Al-Eisa R, Hamza RZ, Khaled HE, El-Shenawy NS. Protective effect of L-cysteine against sodium valproate-induced oxidant injury in testis of rats. *Pharmacology*, 2019, 15: 248-256.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Tuğrul Çağrı AKMAN
Doğum tarihi:	03 Ocak 1987
Doğum Yeri:	Merkez/SAMSUN
Medeni Hali:	Evli / 1 çocuk
Uyruğu:	T.C.
Adres:	Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Tel:	0446 224 53 44
Faks:	0446 224 53 43
E-mail:	eczcagri87@gmail.com
Eğitim	
Lise:	Erzincan Nevzat Ayaz Fen Lisesi (2005)
Lisans:	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (2005-2010)
Yüksek lisans:	-
Doktora:	Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı (2014-...)
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	Orta derecede (YDS 55, IELTS 66, YÖK-DİL 70 Mart 2017)
Almanca:	-
Rusça:	-
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
13. Bölge Erzurum Eczacı Odası	
İlgi Alanları ve Hobiler	
Futbol, müzik dinlemek, doğa ve kültür gezisi, arıcılık.	

EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 75296309-050.01.04-E.1700196080
Konu : HADYEK Kararı.

11.07.2017

ECZACILIK FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İlgi : 23.06.2017 tarihli ve 93722986-000-E.1700183528 sayılı belge.

İlgide kayıtlı yazınız; Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 30.06.2017 tarih ve 5 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 75 no'lu kararı ile sözkonusu araştırma, çalışma kapsamında kullanılacak hayvan materyali kısmı kurulumuzca değerlendirilmiş ve etik kurallarına uygun olduğu kanaatine varılmıştır. Çalışma kapsamında kullanılacak insan materyali için de Tıp Fakültesi Dekanlığı, Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan da onay alınmasının gerektiğine mevcut oy birliğiyle karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz ederim.

Toplantı Tarihi: 30.06.2017

Toplantı Sayısı : 5

KARAR NO 75: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanlığı, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Yücel KADIOĞLU'nun yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında, 24.05.2017 tarih ve 4/52 sayılı kararımızla yürütülen "Benign Prostat Hiperplazisi ve Aşırı Aktif Mesane Hastahklarında Kullanılan Solifenazin Süksinat'ın Silodosin ve Tamsulosin İle Kombine Olarak veya Ayrı Rat Plazmasında Miktar Tayin Yöntemlerinin Geliştirilip Farmakokinetik Parametrelerinin Belirlenmesi ve Metabolom Analizinin Yapılması" başlıklı araştırma çalışmasının adının "Tamsulosin, Silodosin ve Solifenazin Süksinatın Tekli ve Kombine Kullanımında Farklı Ortamlarda (Boş İnsan Plazması, Hasta Plazması, Rat Plazması ve Farmasötik Preparatlarda) Miktar Tayin Yöntemlerinin Geliştirilip, Valide Edilmesi ve Metabolom Analizlerinin Yapılması" olarak değiştirilmesi ile ilgili Eczacılık Fakültesi Dekanlığının 23.06.2017 tarih ve 93722986-000-E.1700183528 sayılı yazısı ile ekleri görüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışma kapsamında kullanılacak

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 25240 Erzurum
Tel: +90 442 2317222
Elektronik Ad: <http://www.atauni.edu.tr/fbiletiriz-veteriner-fakultesi>
Kop Adresi: atauni@halki.kap.tr

Bilgi: Mehmet KÖKA
Faks: +90 442 2317244
E-Posta: vetbak@atauni.edu.tr



1 / 2

Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
www.atauni.edu.tr adresinden doğrulama yapabilirsiniz. Doğrulama Kodu: 3E55A9B

hayvan materyali kısmı kurulumuzca değerlendirilmiş ve etik kurallarına uygun olduğu kanaatine varılmıştır. Çalışma kapsamında kullanılacak insan materyali için de Tıp Fakültesi Dekanlığı, Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan da onay alınmasının gerektiğine, mevcut oy birliği ile; karar verildi.

Prof.Dr. Fikret ÇELEBİ
Kurul Başkanı



EK-3. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora tezi olarak Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU danışmanlığında sunulan “Tamsulosin, silodosin ve solifenazin süksinatın tekli ve kombine kullanımında farklı ortamlarda (boş insan plazması, hasta plazması, rat plazması ve farmasötik preparatlarda) miktar tayin yöntemlerinin geliştirilip, valide edilmesi ve metabolom analizlerinin yapılması” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	0	15
Genel Bilgiler	9	30
Materyal ve Metod	9	35
Bulgular	9	10
Tartışma	2	15

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz. 6./12/ 20.19

Tuğrul Çağrı AKMAN

Öğrenci Adı-Soyadı

İmza



Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU

Danışman Adı-Soyadı

İmza



* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☒ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.