

BAZI BAZİK İLAÇ MADDELERİNİN İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİ YARDIMIYLA ANALİZİ VE BİYOLOJİK MATRİKSİN ANALİZE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

THE THIN LAYER CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF SOME BASIC DRUGS AND THE INVESTIGATION OF THE INFLUENCE OF THE BIOLOGICAL MATRIX ON THE ANALYSIS

Ömer ERSOY* ve R. Sema AYDEMİR*

SUMMARY

In this study, the analysis of some basic drugs was performed by means of thin layer chromatography. By choosing a suitable solvent system, the reproducibility of the results was investigated and it was tried to standardise the method in our laboratory conditions. Thin layer chromatographic studies were performed with 11 basic drug substances both on the plates prepared in our laboratory using silicagel 60 HF₂₅₄ and on the commercial chromatographic plates covered with the same adsorbent. The solvent system was Methanol: Ammonia, % 25 (100:1,5). In addition to the chromatography of the pure drug substances, urine samples spiked with these basic drugs were also after solvent extraction chromatographed and the influence of the biological matrix on the analysis was investigated.

In several trials, the averages of the R_f100 values and their standard deviations for the pure drugs and for the same substances but with the fractions after the solvent extraction from spiked urine samples were achieved, and the values obtained in the two types of chromatographic plates were compared. The differences between the averages of the R_f100 values of the pure basic drugs and those extracted from urine were found statistically significant for the 7 of the 11 substances on the chromatographic plates prepared in our laboratory and for the 5 on the commercial chromatographic plates. Therefore, it can be said that the biological matrix affects the thin layer chromatographic behaviour of these drugs in urine.

ÖZET

Bu çalışmada, bazı bazik özellikli ilaç maddelerinin ince tabaka kromatografik analizleri, bu maddeler için sıklıkla kullanılan bir sistemde yapılırken, elde edilen sonuçların tekrarlanabilirliği kullanılan yöntem kendi şartlarımız açısından standardize edilmeye çalışılarak araştırılmıştır. Ayrıca, bu ilaç maddelerinin biyolojik örnek olarak seçilen idrardan ekstraksiyonları sonucu elde edilen fraksiyonların kromatografisinde, biyolojik matriksin analizi güçleştirici ve hatalara sebebiyet verici etkisinin olup olmadığı incelenmiştir.

* Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı,
Nişantaşı/İSTANBUL.

Farklı zamanlarda gerek saf maddeler gerekse idrara katım sonucu ekstraksiyonla elde edilen fraksiyonlarla yapılan kromatografik çalışmalarda, maddelere ait R_f100 değeri ortalamaları ve standart sapmalar bulunmuş, laboratuvarında hazırlanan plaklarda ve hazır plaklarda elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. İdrardan ekstraksiyon sonucu elde edilen fraksiyonların analizinde biyolojik mat-riksin analize etkisi bulunduğu saptanmıştır.

GİRİŞ

Günlük hayatımızda çeşitli kimyasal maddelerin kullanımı ile birçok yararlar sağlanmakla birlikte, bu maddelerin değişik şekillerde zararlı etkilerine maruz kalma ile zehirlenme olayları da meydana gelebilmektedir. Kimyasal maddelerle zehirlenme olayları arasında ilaçlar ile oluşanların sayısı oldukça fazladır (1, 2).

Zehirlenme olaylarında, zehirlenmeye sebep olan maddenin teşhisi büyük önem taşır. Zehirlenme etkeninin ne olduğunun açığa çıkarılması, başta tedavisinin yönlendirilmesi açısından olmak üzere çeşitli yönlerden önem kazanır.

Zehirlenme etkenini teşhis etmek amacıyla kullanılan çeşitli yöntemler arasında ince tabaka kromatografisi (ITK) kolaylık, düşük maliyet, yüksek hız, etkili ayırma gücü, duran ve hareketli fazda kolaylıkla değişiklikler yapılabilmesi, az miktarda madde ile çalışılabilmesine olanak vermesi, gerekli düzeneğin basit olması gibi özelliklerinden dolayı toksikolojik çalışmalarda geniş çapta kullanılan tekniklerden biridir.

İnce tabaka kromatografisinde maddelerin tanınmasında bunların değişik sistemlerdeki sürüklenme değerlerinden ve çeşitli belirteçlerden yararlanılır. Ancak, özellikle sürüklenme değerleri çeşitli faktörlerin etkisiyle değişiklikler gösterdiğinden, yöntemde standardizasyonun sağlanması gerekir. Diğer yandan, toksikolojik analizlerde çoğu zaman biyolojik materyel ile çalışma zorunluluğu vardır. İnce tabaka kromatografisinde biyolojik materyelden ekstraksiyonla elde edilen sorumlu maddelerin ise, saf etken maddelerle aynı davranışta bulunmadığı bildirilmektedir (3-6). Bu hususlar da aynı sistemle çalışan başka araştırmacıların elde ettiği verilerden yararlanmayı zorlaştırır. Bazen de imkansız hale getirir.

Bu çalışmada, bazı bazik özellikli ilaç maddelerinin, bu mad-

delerin ince tabaka kromatografisinde sıklıkla kullanılan bir sistemde (3,7 - 11) analizleri, laboratuvarında hazırlanan plaklar ve piyasadan temin edilen hazır plaklarda yapılırken, elde edilen sonuçların tekrarlanabilirliği gözlemlenmiş ve ilaç maddelerinin biyolojik örnek olarak seçilen idrardan ekstraksiyonları yapıldığında, bu analizi güçleştirici veya yanlış yöne sevkedici etkileri olup olmadığı araştırılmıştır.

MATERYEL VE METOD

Çalışmada kullanılan 11 saf bazik ilaç maddesi morfin hidroklorür, kodein, dionin hidroklorür, atropin sülfat, striknin, kokain hidroklorür, opipramol dihidroklorür*, klomipramin hidroklorür*, doksilamin süksinat*, maprotilin hidroklorür* ve ranitidin hidroklorür*'dür.

Çalışmada, silikajel 60 HF₂₅₄ (E.Merck) ile laboratuvarında hazırlanan plaklar (20 x 20 cm ve 20 x 10 cm, 0.25 mm tabaka kalınlığı) ve piyasadan temin edilen silikajel 60 F₂₅₄ (E.Merck) ile kaplı hazır plaklar (10 x 10 cm ve 20 x 10 cm, 0.2 mm tabaka kalınlığı) kullanıldı.

Laboratuvarında hazırlanan plaklar, kullanılmadan önce etüvde 110°C'da 1 saat aktive edildi.

Çözücü sistemi, Metanol: Amonyak, % 25 (100 : 1,5) idi.

Kromatografi işleminde saf maddelerin Kloroform: Metanol (1:1)'deki 5 mg/ml (baz üzerinden hesaplanmış) konsantrasyondaki çözeltileri kullanıldı.

İdrar örnekleri, ilaç kullanmayan kişilerden günlük olarak toplanan idrarın 24 ml'sine saf ilaç maddelerinin distile sudaki 5 mg/100 ml (baz üzerinden hesaplanmış) konsantrasyondaki çözeltilerinden 1 ml (50 µg madde) katılmak suretiyle hazırlandı. örneğin pH'sı 5N NH₃ ile 9'a ayarlandı; 10'ar ml kloroform ile bir-biri ardından 2 kez ekstre edildi. Birleştirilen kloroformlu fazlar susuz Na₂SO₄ yardımıyla kurutuldu. Kloroform uçurularak geriye kalan artık 100 µl Kloroform: Metanol (1:1) karışımı ile dikkatlice çözüldü. Her bir kromatografik deneme için ayrı bir idrar örneğinden farklı zamanlarda ekstraksiyon yapıldı.

* Saf ilaç maddelerini hediye eden (Ciba-Geigy, Pfizer ve Fako) ilaç firmalarına teşekkürü bir borç biliriz.

Laboratuvarda hazırlanan plaklar için kromatografi tankının (8 x 23 x 24) 30 dk süre ile, çözücü karışımı buharları ile doyması sağlandı. Bu plaklara, saf madde çözeltilerinden 8 µl (40 µg madde), idrardan ekstraksiyonla elde edilen madde çözeltisinin tamamı (40 - 50 µg madde) tek bir noktaya uygulandı. Hazır plaklar için de kromatografi tankının (5 x 13 x 14) hareketli faz ile 30 dk doyması sağlandı. Bu plaklara, saf madde çözeltilerinden 1 µl (5 µg madde), idrardan ekstraksiyonla elde edilen çözeltilerden 10 µl (~ 5 µg madde) yine tek bir noktaya uygulandı.

Çözücünün yürüme mesafesi, laboratuvarda hazırlanan plaklarda 17-18 cm (90 dk), hazır plaklarda ise 7-8 cm (30 dk)'dir.

Kromatografi işleminden sonra, maddelerin yerleri UV ışık altında 254 nm'de belirlendi. Ayrıca, Dragendorff belirteci püskürtülerek lekeler görünür hale getirildi ve Rfx100 değerleri hesaplandı.

BULGULAR

Değişik zamanlarda 11 saf ilaç maddesi ile yapılan çalışmalarda maddelerin Rfx100 değeri ortalamalarından oluşan sapmalar laboratuvarda hazırlanan plaklarda \pm % 2-8 arasında, hazır plaklarda yapılan çalışmalarda ise \pm % 2-11 arasında değişmektedir (Tablo 1).

Saf ilaç maddeleri ile her iki tip plakta elde edilen Rfx100 değerlerine ait % SD'lar karşılaştırıldığında maddeler için elde edilen Rfx100 değerlerinin kesinlikleri her iki tip plakta değişiklikler göstermekle birlikte, tüm maddeler için % SD'ların ortalaması alınarak karşılaştırıldığında laboratuvarda hazırlanan plaklarda % 4,5, hazır plaklarda ise % 4,2 olarak bulunmuştur. 11 maddenin 6'sı için laboratuvarda hazırlanan plaklarda, 4'ü için ise hazır plaklarda daha büyük bir % SD değeri saptanmış, 1 madde için ise fark görülmemiştir.

Yine aynı sistemde, ilaç maddelerinin idrardan ekstraksiyonu sonucu elde edilen fraksiyonların analizi laboratuvarda hazırlanan plaklar ve hazır plaklarda olmak üzere iki şekilde yapılmıştır. Saf ilaç maddeleri ile yapılan çalışmalara benzer şekilde her iki tip plakta yapılan çalışmalarda maddelere ait Rfx100 değeri ortalamalarından meydana gelen sapmalar gerek laboratuvarda hazırlanan

plaklarda gerekse hazır plaklarda \pm % 2-10 arasında değişmiştir. (Tablo 2).

Tablo-1 : 11 saf ilaç maddesinin kendi hazırladığımız plaklarda ve hazır plaklardaki ince tabaka kromatografisi sonuçları

Madde	Dökme plak		Hazır plak	
	Ort. \pm SD	% SD	Ort. \pm SD	% SD
Atropin	21 \pm 1.30	\pm % 6	19 \pm 2.16	\pm % 11
Maprotilin	24 \pm 1.95	\pm % 8	20 \pm 0.83	\pm % 4
Striknin	27 \pm 2.16	\pm % 8	21 \pm 1.30	\pm % 6
Doksilamin	38 \pm 1.41	\pm % 4	39 \pm 1.41	\pm % 4
Ranitidin	39 \pm 1.51	\pm % 4	43 \pm 0.83	\pm % 2
Morfin	44 \pm 1.67	\pm % 4	36 \pm 1.22	\pm % 3
Dionin	45 \pm 1.78	\pm % 4	36 \pm 1.14	\pm % 3
Kodein	45 \pm 1.09	\pm % 2	35 \pm 1.22	\pm % 3
Klomipramin	54 \pm 3.20	\pm % 6	47 \pm 0.89	\pm % 2
Kokain	59 \pm 1.22	\pm % 2	61 \pm 2.30	\pm % 4
Opipramol	63 \pm 1.51	\pm % 2	54 \pm 2.30	\pm % 4
		ort. % SD		Ort. % SD
		% 4,5		% 4.2

Çözücü sistemi - Metanol : amonyak, % 25 (10 : 1,5)

İdrardan ekstre edilen maddeler için saf maddelere oranla genellikle daha düşük Rfx100 değeri bulunması nedeniyle saf maddeler ve idrardan ekstraksiyon sonucu elde edilen fraksiyonların her iki tip plaktaki ince tabaka kromatografilerinde bulunan Rfx100 değerleri ortalamaları, biyolojik matriksin Rfx100 değerlerine etkisi bulunup bulunmadığını açığa çıkarmak için karşılaştırıldığında ortaya Tablo 3 ve 4'deki durum çıkmaktadır.

Tablo-2 : İdrardan ekstraksiyon sonucu elde edilen fraksiyonların kendi hazırladığımız plaklarda ve hazır plaklardaki ince tabaka kromatografisi sonuçları

Madde	Dökme plak		Hazır plak	
	Ort. \pm SD	% SD	Ort. \pm SD	% SD
Atropin	18 \pm 1.14	\pm % 6	16 \pm 1.64	\pm % 10
Maprotilin	23 \pm 1.14	\pm % 5	18 \pm 0.54	\pm % 3
Striknin	26 \pm 2.54	\pm % 10	18 \pm 1.51	\pm % 8
Doksilamin	36 \pm 2.55	\pm % 7	38 \pm 1.81	\pm % 5
Ranitidin	36 \pm 2.34	\pm % 7	42 \pm 1.30	\pm % 3
Morfin	40 \pm 1.48	\pm % 4	33 \pm 1.48	\pm % 4
Dionin	41 \pm 1.30	\pm % 3	35 \pm 1.51	\pm % 4
Kodein	42 \pm 1.30	\pm % 3	34 \pm 0.83	\pm % 2
Klomipramin	50 \pm 2.86	\pm % 6	45 \pm 1.22	\pm % 3
Kokain	56 \pm 1.30	\pm % 2	59 \pm 2.28	\pm % 4
Opipramol	60 \pm 1.81	\pm % 3	53 \pm 2.58	\pm % 5

Çözücü sistemi - Metanol : Amonyak, % 25 (100: 1,5)

SONUÇ VE TARTIŞMA

Bazık ilaç maddelerinin tek bir ince tabaka kromatografisi sisteminde analiziyle tüm maddelerin tanınması için yeterli bir ayırma elde edilemeyeceği açıktır. Amacı, bu maddelerin birbirinden ayrılarak tanınması olmayıp, çok kullanılan bir ince tabaka kromatografisi sisteminde standardizasyonun temin edilmesi, tekrar edilebilirliğin denenmesi ve biyolojik materyel olarak idrar ile çalışma söz konusu olduğunda, bu durumun analize etkisinin olup olmadığının araştırılması olan bu çalışmada, saf ilaç maddeleri ile laboratuvarında hazırlanan plaklar ve piyasadan temin edilen hazır plaklarla yapılan kromatografik çalışmalar sonucunda maddelere ait elde edilen Rfx100 değerlerinin kesinliklerinde, ortalama olarak, bariz bir fark bulunmadığı saptanmıştır. İdrardan ekstraksiyon sonucu elde edilen fraksiyonlarla da her iki tip plakla yapılan kromatografik çalışmalarda, maddelere ait Rfx100 değerlerinin kesinliğinde yine bir fark görülmemiştir.

Tablo-3 : Saf maddeler ve idrardan ekstraksiyon sonucu elde edilen fraksiyonların kendi hazırladığımız plaklarda yapılan ince tabaka kromatografisinde bulunan HRF değeri ortalamalarının karşılaştırılması

Madde	HR f Ort. \pm SD		t - Testi
	Saf madde	Ekstre edilen saf madde	$t_{n_1 + n_2 - 2, \% 5}$
Atropin	21 \pm 1.30	18 \pm 1.14	3.89 > 2.306*
Maprotilin	24 \pm 1.95	23 \pm 1.14	0.99 < 2.306
Striknin	27 \pm 2.16	26 \pm 2.54	0.67 < 2.306
Doksilamin	38 \pm 1.41	36 \pm 2.55	1.54 < 2.306
Ranitidin	39 \pm 1.51	36 \pm 2.34	2.42 > 2.306*
Morfin	44 \pm 1.67	40 \pm 1.48	4.04 > 2.306*
Kodein	45 \pm 1.09	41 \pm 1.30	4.00 > 2.306*
Dionin	45 \pm 1.78	42 \pm 1.30	4.08 > 2.306*
Klomipramin	54 \pm 3.20	50 \pm 2.86	2.09 < 2.306
Kokain	59 \pm 1.22	56 \pm 1.30	3.79 > 2.306*
Opipramol	63 \pm 1.51	60 \pm 1.81	2.84 > 2.306*

* Fark istatistiksel olarak anlamlıdır, $p < 0,05$

Sonuçlarda kesinlik açısından bariz bir fark bulunmamasına rağmen, hazır plakların kullanılmasında, daha az madde uygulanması, daha kısa mesafede ve daha az zamanda ayrılma olması, daha az çözücüye ihtiyaç göstermesi avantajları da gözardı edilemez.

İdrardan ekstraksiyon ile elde edilen fraksiyonların kromatografisinde, maddeler genellikle saf maddelerden daha düşük Rfx100 değerlerine sahip olmuşlardır.

Biyolojik matriksin Rfx100 değerleri üzerine olan etkisini açığa çıkarmak için uygulanan t-Testi'nde, laboratuvarında hazırlanan plaklarda 7 madde, hazır plaklarda ise 5 madde için, saf madde ve ekstraksiyon sonucu elde edilen maddelerin Rfx100 değeri ortalamalarının istatistiksel anlamlı farklı olduğu ($p < 0.05$) saptanmıştır. Bu sonuç, idrardan ekstraksiyon sonucu elde edilen fraksiyonların saf maddelerle kromatografik karşılaştırılmalarının her

zaman için doğru olmayacağını ve bu işlemlerde yine aynı analiz materyelinden ekstre edilmiş bulunan test maddeler kullanılması gerekeceğini göstermektedir.

Tablo-4: Saf maddeler ve idrardan ekstraksiyon sonucu elde edilen fraksiyonların hazır plaklarda yapılan ince tabaka kromatografisinde bulunan HRF değeri ortalamalarının karşılaştırılması

Madde	HR f Ort. \pm SD		t - Testi
	Saf madde	Ekstre edilen saf madde	$t_{n_1 + n_2 - 2, \% 5}$
Atropin	19 \pm 2.16	16 \pm 1.64	2.48 > 2.306*
Maprotilin	20 \pm 0.83	18 \pm 0.54	4.54 > 2.306*
Striknin	21 \pm 1.30	18 \pm 1.51	3.37 > 2.306*
Kodein	35 \pm 1.22	34 \pm 0.83	1.51 < 2.306
Dionin	36 \pm 1.14	35 \pm 1.51	1.19 < 2.306
Morfin	36 \pm 1.22	33 \pm 1.48	3.53 > 2.306*
Doksilamin	39 \pm 1.41	38 \pm 1.81	0.97 < 2.306
Ranitidin	43 \pm 0.83	42 \pm 1.30	1.45 < 2.306
Klomipramin	47 \pm 0.89	45 \pm 1.22	2.98 > 2.306*
Opipramol	54 \pm 2.30	53 \pm 2.58	0.65 < 2.306
Kokain	61 \pm 2.30	59 \pm 2.28	1.38 < 2.306

* Fark istatistiksel olarak anlamlıdır, $p < 0.05$

KAYNAKLAR

1. Temple, A.R.: "Poison Control" in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16 th Edition, s. 1828, Mack Publishing Company, Pennsylvania, 1980.
2. Vural, N., Karakaya, A.: *Ankara Ecz. Fak. Mec.*, **12**, 121-137 (1982).
3. Baeumler, J., Breiter, J.: *Lebensm. u. gerichtl. Chemie*, **31**, 47-50 (1977).
4. Bogusz, M., Klys, M., Wijsbeek, J., Franke, J.P., de Zeeuw, R.A.: *J. Anal. Toxicol.*, **8**, 149-154 (1984).
5. Bogusz, M., Gierz, J., de Zeeuw, R.A., Franke, J.P.: *J. Chromatogr.*, **342**, 241-244 (1985).
6. Bogusz, M., Franke, J.P., Wijsbeek, J., de Zeeuw, R.A.: *J. Anal. Toxicol.*, **10**, 245-249 (1986).
7. Zingales, I.: *J. Chromatogr.*, **31**, 405-419 (1967).
8. Berry, D.J., Grove, J.: *J. Chromatogr.*, **80**, 205-219 (1973).
9. Moffat, A.C., Clare, B.: *J. Pharm. Pharmac.*, **26**, 665-670 (1974).
10. Kröger, H., Bohn, G., Rücker, G.: *Dtsch. Apoth. Ztg.*, **117**, 1923-1925 (1977).
11. Stead, A.H., Gill, R., Wright, T., Gibbs, J.P., Moffat, A. C.: *Analyst*, **107**, 1106-1168 (1982).

(Received April 7, 1989)