

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

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

Buket ALPERTUNGA* - Emel SARIAHMETOĞLU*

SUMMARY

In this study, the thin layer chromatographic behaviour of some acidic and neutral drugs and the reproducibility of R_f values obtained were investigated. In addition, when urin was selected as a biological material, the influence of the biological matrix on the results of chromatographic analysis was also investigated after solvent extraction of drug substances from spiked urine samples. Chromatographic studies were performed on the plates prepared in laboratory and obtained commercially too, by using chloroform-acetone (4:1) solvent system.

ÖZET

Bu çalışmada, bazı asidik ve nötral ilaç maddelerinin ince tabaka üzerindeki kromatografik davranışları ve elde edilen R_f değerlerinin tekrarlanabilirliği incelenmiştir. Bu ilaç maddelerinin idrarda bulunmaları halinde, katım yapılmış idrar örneklerinden elde edilen ektstreler ile yapılan ince tabaka kromatografisi çalışmalarında biyolojik matriksin analiz sonuçlarına etkisi araştırılmıştır. İnce tabaka kromatografisi çalışmalarında silikajel kaplı dökme ve hazır plaklar ile kloroform-aseton (4:1) çözücü sistemi kullanılmıştır.

GİRİŞ

İnce tabaka kromatografisi (İTK), toksikolojik analiz laboratuvarlarında zehirlerin saptanması amacıyla geniş çapta kullanılan basit, hızlı ve duyarlı bir yöntemdir (1-6). İTK nin toksikolojik alandaki

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

yaygın kullanımı bu yöntemde bir standardizasyonun sağlanması gerektiğini düşündürmüş ve bu alanda yapılan çalışmalar sonucunda sistematik toksikolojik analizde kullanılacak bir çok standart çözücü sistemi ile çeşitli ilaçların ve kimyasal maddelerin bu sistemlerdeki Rfx100 değerleri listeler halinde bildirilmiştir (7-9).

İTK yöntemi ile toz, tablet ve çözelti artıkları, mide yıkama suları, dializ çözeltileri gibi komplike olmayan örnekler ile kan, idrar gibi vücut sıvıları ve otopsi materyelinin klinik ve forensik toksikolojik incelenmesi mümkün olmaktadır. Biyolojik örnek ile çalışılması halinde örnek matriksinin doğasından ekstreye geçebilen bazı girişimler, analizi istenen maddelerin kromatografik davranışlarını değiştirebilmektedir. Nitekim, Bogusz ve arkadaşları (10-12) çeşitli ilaç maddeleri katılmış karaciğer ve kan örnekleri ile yaptıkları çalışmalarda, biyolojik matriksin kromatografik değerleri önemli ölçüde etkilediğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, bazı asidik ve nötral ilaç maddelerinin ve bu maddeler katılmış idrardan elde edilen ekstrelerin laboratuvarında hazırlanan plaklarda ve hazır plaklardaki kromatografik davranışları karşılaştırıldı ve biyolojik matriksin deney sonuçlarına etkisi incelendi.

MATERYEL VE METOD

Kimyasal maddeler: Çalışmada kullanılan fenobarbital¹, barbita², allobarbita³, aminofenazon³, asetaminofen⁴, fenazon⁵, salisilamid⁶, klordiazepoksid⁷, diazepam⁷, nitrazepam⁷ ve oksazepam⁷ ilaç maddeleri bildirilen firmalardan sağlandı. Analitik saflıktaki organik çözücüler¹ ve diğer kimyasal maddeler¹ piyasadan temin edildi.

İTK işleminde 0.2 mm kalınlığında 10x10 cm boyutlarında, silikajel 60 F₂₅₄ ile kaplanmış hazır alüminyum plaklardan¹ (Art.No.5554) yararlanıldı. Dökme plaklar ise, 0.25 mm kalınlığında, 20x20 cm boyutlarında ve silikajel 60 HF₂₅₄¹ kullanılarak hazırlandı.

¹ E.Merck, Darmstadt

² Abdi İbrahim

³ Eczacıbaşı

⁴ Bilim

⁵ Bayer

⁶ Pfizer

⁷ Roche

İTK çalışmalarında kullanılan çözücü sistemleri:

- I- Kloroform-Metanol (9:1)
- II - Kloroform-Aseton (4:1)
- III - Kloroform
- IV - Kloroform-Etilasetat (9:1)
- V - Etilasetat-Metanol-Amonyak, %25 (85:10:5)

Püskürtme belirteçleri:

Cıva (I) nitrat belirteci: 0.5 g cıva (I) nitrat, 50 ml distile suda çözüldürüldü, berrak oluncaya kadar nitrik asit damlatıldı.

Demir (III) klorür-potasyum ferrisiyanür belirteci: 10 ml %10 luk potasyum ferrisiyanür ile 2 ml % 10 luk demir (III) klorür çözeltisi karıştırılarak hazırlandı.

Dragendorf belirteci: 0.85 g bizmut subnitratın 10 ml glasiyel asetik asit ve 40 ml sudaki çözeltisi ile 8 g potasyum iyodürün 20 ml sudaki çözeltisinden 10 ar ml alındı, 20 ml glasiyel asetik asit ilave edilerek su ile 100 ml e tamamlandı.

Saf ilaç maddesi çözeltileri: Maddelerin kloroform-metanol (1:1) de ve 2 mg/ml konsantrasyondaki çözeltisi kullanıldı.

İdrar örneklerinin hazırlanması ve ekstraksiyon: İlaç kullanmayan kişilerden toplanan idrar örneğine ilaç maddelerinin sudaki çözeltilerinden son konsantrasyon 2 µg/ml olacak şekilde katım yapıldı. Katım yapılmış idrar örneğinin 25 ml si bir ayırma hunisine alındı, 0.1 M HCl ile çözeltinin pH sı 3 e ayarlandı. Karışım 2 kez 10 ar ml kloroform ile ekstre edildi. Birleştirilen organik fazlar susuz sodyum sülfat üzerinden süzülerek kurutuldu, su banyosunda çözücüsü buharlaştırıldı. Artık 100 µl kloroform-metanol (1:1) karışımında çözümlenerek kromatografi plağına uygulandı.

Boş idrar ekstresi ise, ilaç maddeleri katılmamış 25 ml idrar örneği aynı şekilde çalışılarak hazırlandı.

Kromatografi işlemi: Deneylere başlamadan önce kromatografi tankları çözücü buharı ile 30 dk doyuruldu. Dökme plaklarla yapılan çalışmalarda, 12 µl saf madde çözeltisi, 50 µl idrar ekstresi ve 50 µl boş idrar ekstresi uygulandı. Hazır plaklara ise, 6 µl saf madde çözeltisi, 25 er µl idrar ekstresi ve boş idrar ekstresi uygulandı. Kro-

matografi işlemine çözücü dökme plaklarda 17-18 cm (90 dk), hazır plaklarda ise 7-8 cm (30 dk) mesafeye ulaşıncaya kadar devam edildi. Çözücüsü uzaklaştırılan plaklar, UV ışık (254 nm) altında incelendi. Lekelerin yerlerinin daha iyi belirlenmesi amacıyla plaklara, barbitüratlar için cıva (I) nitrat; fenolik maddeler için demir (III) klorür-potasyum ferrisiyanür; nötr karakterli maddeler için Dragendorff belirteci püskürtüldü. Maddelere ait lekelerin Rfx100 (HRf) değerleri hesaplandı.

TARTIŞMA VE SONUÇ

İnce tabaka kromatografisi çalışmalarında kullanılan çözücü sisteminin seçiminde, asidik ve nötral karakterli maddeler için literatürlerde bildirilen çözücü sistemlerinden 5 tanesi (13,14) denendi ve bu çözücü sistemlerinin ayırma güçleri hesaplandı (8,15) (Tablo 1). Maddelerin plak üzerinde düzgün şekilde ve etrafa yayılmayan bir leke oluşturmaları, sürüklenme izi oluşturmamaları gibi özellikleri de değerlendirilerek ayırma gücü en yüksek olan ve HRf değerlerinin en iyi dağılım gösterdiği kloroform-aseton (4:1) sistemi en uygun çözücü sistemi olarak seçildi ve bundan sonraki çalışmalarda bu sistem kullanıldı.

Tablo-1 : İnce tabaka kromatografisinde kullanılan çözücü sistemlerinin ayırma gücü

	Çözücü No.				
	I	II	III	IV	V
Ayırma gücü	0.71	0.87	0.57	0.75	0.80
En büyük ve en küçük HRf değerleri arasındaki fark	54	36	21	32	36

Yöntemde standardizasyonun sağlanabilmesi ve tekrarlanabilirliğin kontrolü amacıyla, saf ilaç maddeleri ile yapılan ince tabaka kromatografisi çalışmalarında HRf değerlerinde oluşan sapmalar dökme plaklarda \pm % 2-7, hazır plaklarda ise \pm % 1-10 arasında değişmektedir (Tablo 2). Saf ilaç maddelerinin ortalama HRf değerleri ile bu değerlerdeki sapmalar her iki tip plakta farklılık göstermesine rağmen, tüm maddeler için hesaplandığında, dökme plaklarda ortalama \pm % 4.3, hazır plaklarda ise, ortalama \pm % 4.2 olarak bulunmuştur.

Tablo-2: Saf ilaç maddelerinin dökme plaklarda ve hazır plaklarda elde edilen HRF değerlerinin karşılaştırılması

Madde	Dökme plak		Hazır plak	
	Ort.±SD	% SD	Ort.±SD	% SD
Klordiazepoksid	19 ± 1.09	± % 6	13 ± 1.30	± % 10
Asetaminofen	20 ± 0.83	± % 4	13 ± 0.83	± % 6
Fenazon	23 ± 1.14	± % 5	18 ± 0.70	± % 4
Oksazepam	23 ± 1.78	± % 7	21 ± 1.67	± % 8
Aminofenazon	23 ± 0.83	± % 5	22 ± 0.89	± % 4
Nitrazepam	35 ± 2.07	± % 6	31 ± 1.14	± % 4
Salisilamid	34 ± 0.83	± % 2	32 ± 1.00	± % 3
Barbital	44 ± 1.67	± % 4	53 ± 0.54	± % 1
Fenobarbital	46 ± 1.51	± % 3	34 ± 0.83	± % 2
Allobarbital	51 ± 1.78	± % 3	57 ± 1.30	± % 2
Diazepam	55 ± 1.14	± % 2	47 ± 0.83	± % 2

Saf ilaç maddelerinin katım yapılmış idrar örneğinden kazanılan ekstreleri ile yapılan ince tabaka kromatografisi çalışmaları sonucunda, dökme plaklarda elde edilen HRF değeri ortalamalarındaki sapmalar \pm % 2-9, hazır plaklarda elde edilen değerlerdeki sapmalar ise, \pm % 1-13 arasında değişmektedir (Tablo 3). Her iki tip plakta da, idrar ekstresindeki maddelerin saf ilaç maddelerine oranla daha düşük HRF değerlerine sahip oldukları görülmektedir.

Tablo-3: İdrar ekstresindeki maddelerin dökme plaklarda ve hazır plaklarda elde edilen HRF değerlerinin karşılaştırılması

Madde	Dökme plak		Hazır plak	
	Ort.±SD	% SD	Ort.±SD	% SD
Klordiazepoksid	17 ± 1.22	± % 7	12 ± 1.51	± % 13
Asetaminofen	18 ± 1.09	± % 6	11 ± 0.89	± % 8
Fenazon	21 ± 1.00	± % 5	17 ± 0.83	± % 5
Oksazepam	22 ± 1.87	± % 9	20 ± 0.89	± % 4
Aminofenazon	22 ± 0.83	± % 4	20 ± 0.83	± % 4
Nitrazepam	33 ± 1.51	± % 5	30 ± 0.83	± % 3
Salisilamid	33 ± 1.58	± % 5	31 ± 0.89	± % 3
Barbital	42 ± 1.87	± % 4	50 ± 0.54	± % 1
Fenobarbital	44 ± 2.00	± % 5	32 ± 1.09	± % 3
Allobarbital	50 ± 1.30	± % 3	56 ± 1.34	± % 2
Diazepam	53 ± 1.30	± % 2	45 ± 0.54	± % 1

Analiz örneği olarak kullanılan idrarın bu değerleri ne ölçüde etkilediğini saptamak amacıyla, saf ilaç maddelerinin HRf değerleri ortalamaları ile idrar ekstresindeki maddelerin HRf değerleri ortalamaları karşılaştırıldı. Sonuçlar Tablo 4 ve 5 te görülmektedir.

Tablo-4: Saf ilaç maddeleri ile idrar ekstresindeki maddelerin dökme plaklardaki HRf ortalamalarının karşılaştırılması

Madde	HRf Ort. \pm SD		t-Testi $t_{n_1+n_2-2}, \%5$
	Saf madde	Ekstre edilen Saf madde	
Klördiazepoksid	19 \pm 1.09	17 \pm 1.22	3.38 > 2.306*
Asetaminofen	20 \pm 0.83	18 \pm 1.09	3.33 > 2.306*
Fenazon	23 \pm 1.14	21 \pm 1.00	2.98 > 2.306*
Oksazepam	23 \pm 1.78	22 \pm 1.87	0.90 < 2.306
Aminofenazon	23 \pm 0.83	22 \pm 0.83	1.92 < 2.306
Nitrazepam	35 \pm 2.07	33 \pm 1.51	1.75 < 2.306
Salisilamid	34 \pm 0.83	33 \pm 1.58	1.26 < 2.306
Barbital	44 \pm 1.67	42 \pm 1.87	1.80 < 2.306
Fenobarbital	46 \pm 1.51	44 \pm 2.00	0.78 < 2.306
Allobarbital	51 \pm 1.78	50 \pm 1.30	0.87 < 2.306
Diazepam	55 \pm 1.14	53 \pm 1.30	2.59 > 2.306*

*Fark istatistiksel olarak anlamlıdır, $p < 0.05$.

Tablo-5: Saf ilaç maddeleri ile idrar ekstresindeki maddelerin hazır plaklardaki HRf ortalamalarının karşılaştırılması

Madde	HRf Ort. \pm SD		t-Testi $t_{n_1+n_2-2}, \%5$
	Saf madde	Ekstre edilen Saf madde	
Asetaminofen	13 \pm 1.30	12 \pm 1.51	1.12 < 2.306
Klördiazepoksid	13 \pm 0.83	11 \pm 0.89	3.70 > 2.306*
Fenazon	18 \pm 0.70	17 \pm 0.83	2.08 < 2.306
Oksazepam	21 \pm 1.67	20 \pm 0.89	1.19 < 2.306
Aminofenazon	22 \pm 0.89	20 \pm 0.83	3.77 > 2.306*
Nitrazepam	31 \pm 1.14	30 \pm 0.83	1.58 < 2.306
Salisilamid	32 \pm 1.00	31 \pm 0.89	1.69 < 2.306
Fenobarbital	47 \pm 0.83	45 \pm 0.54	4.54 > 2.306*
Diazepam	57 \pm 1.30	56 \pm 1.34	1.20 < 2.306
Barbital	34 \pm 0.83	32 \pm 1.09	3.27 > 2.306*
Allobarbital	53 \pm 0.54	50 \pm 0.54	8.82 > 2.306*

*Fark istatistiksel olarak anlamlıdır, $p < 0.05$.

t-Testi kullanılarak, saf ilaç maddelerinin ortalama HRf değerleri ile idrar ekstresindeki maddelerin ortalama HRf değerleri arasında istatistiksel anlamlı bir fark bulunup bulunmadığı araştırıldı. Dökme plaklarda 4 madde için, hazır plaklarda ise 5 madde için HRf değerleri ortalamaları arasında istatistiksel anlamlı bir fark bulundu.

Dökme plaklar ve hazır plaklarda elde edilen değerler dikkate alındığında, bu tür ince tabaka kromatografisi çalışmalarında hazır plakların, laboratuvar şartlarında hazırlanan dökme plaklara göre belirgin bir üstünlük sağlamadığı sonucuna varılabilir. Ancak, hazır plaklar daha az madde ile çalışabilme ve çabuk sonuç alabilme gibi üstünlükleri açısından genellikle tercih edilmektedir.

Biyolojik örnek olarak idrar kullanılması halinde, idrarın doğasından kaynaklanan bazı girişimlerin HRf değerlerini etkilediği görülmektedir. Bu durumda, biyolojik örnek ile yapılan ince tabaka kromatografisi çalışmalarında, plak üzerine örnek madde ile birlikte test maddelerinin aynı biyolojik matriksten hazırlanan ekstralarının uygulanması ile sonuçların doğruluğu ve tekrarlanabilirliği önemli ölçüde sağlanabilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Neuninger, H.: *Sci.Pharm.*, **55**, 1 (1987).
2. Kovar, K.-A., Noy, M., Pieper, R.: *Dtsch. Apoth. Ztg.*, **122**, 3 (1982).
3. Kaistha, K.K., Tadrus, R., Janda, R.: *J. Chromatogr.*, **107**, 359 (1975).
4. Blass, K.G., Thibert, R.J., Draisey, T.F.: *Ibid.*, **95**, 75 (1974).
5. Berry, D.J., Grove, J.: *Ibid.*, **80**, 205 (1973).
6. Kaistha, K.K., Jaffe, J.H.: *J.Pharm. Sci.*, **61**, 679 (1972).
7. Bäumlcr, J., Breiter, J.: *Lebensm. u. gerichtl. Chemie.*, **31**, 47 (1977).
8. Stead, A.H., Gill, R., Wright, T., Gibbs, J.P., Moffat, A.C.: *Analyst*, **107**, 1106 (1982).
9. Atasoy, S., Karakuş, Ü., Karakuş, Z.: *Adli Tıp Derg.* (ATD), **1**, 157 (1985).
10. Bogusz, M., Klys, M., Wijsbeek, J., Franke, J.P., de Zeeuw, R.A.: *J.Anal.Toxicol.*, **8**, 149 (1984).
11. Bogusz, M., Gierz, J., de Zeeuw, R.A., Franke, J.P.: *J.Chromatogr.*, **342**, 241 (1985).
12. Bogusz, M., Franke, J.P., Wijsbeek, J., de Zeeuw, R.A.: *J. Anal. Toxicol.*, **10**, 245 (1986).
13. Owen, P., Pendlebury, A., Moffat, A.C.: *J.Chromatogr.*, **161**, 187 (1978).
14. Owen, P., Pendlebury, A., Moffat, A.C.: *Ibid.*, **161**, 195 (1978).
15. Moffat, A.C., Smalldon, K.W., Brown, C.: *Ibid.*, **90**, 1 (1974).