



Alınış tarihi (Received): 07.02.2017
Kabul tarihi (Accepted): 23.03.2017

Baş editor/Editors-in-Chief: Ebubekir ALTUNTAŞ
Alan editörü/Area Editor: Ömer İŞILDAK

Kolşisinin Zorlanmış Koşullar Altında Bozunurluk Ürünlerinin Belirlenmesi İçin LC-MS/MS Metodunun Geliştirilmesi ve Validasyonu

Süleyman GÖKCE^{a*}, İbrahim BULDUK^b, Hüseyin ENGİNAR^c

^a Uşak Üniversitesi, Bilimsel Analiz ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi, Uşak

^b Uşak Üniversitesi, Sağlık Yüksekokulu, Uşak

^c Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Afyon

*Corresponding author: Suleyman.gokce@usak.edu.tr

ÖZET: Kolşisin antik Yunan döneminden beri bilinen antifibrotik, anti-inflamatuar, antihistaminik, membran stabilizasyonu ve lipid peroksidasyon inhibisyonu etkileri olan bitkisel kökenli bir ilaçtır. Tüm bu özellikler inflammatuar olayların ve hücre bölünmesinin ön planda olduğu hastalıklarda bu ilacın etkili olabileceği düşüncesini gündeme getirmektedir. Yıllardır gut artritinde kullanılan kolşisin, son 50 yıldır, Behçet hastalığı, skleroderma, amiloidoz ve karaciğer sirozu için de başvurulan ilaç olmuştur (Dönmez M.). Ticari farmasötik formlar içinde bulunan ilaç moleküllerinin ve saflıklarının saptanması, toksikolojik ve farmakolojik bakımdan önemlidir. Farmasötik şekillerin hazırlanması sırasında saflık ve ilgili bozulma ürünlerinin izlenebilmesi için ileri metotlara ihtiyaç vardır (U.S. Food and Drug Administration 2003, 2006). Bu çalışmanın amacı farmasötik dozaj formlarında kolşisin ve bozunurluk ürünlerinin LC-MS/MS tekniği ile hızlı bir metot geliştirmektir. Ticari dozaj formlarındaki kolşisin ve bu preparatlarda zorlanmış koşullardaki bozunurluk ürünlerinin saptanması için bir LC-MS/MS metodu geliştirilmiştir (Liu et al. 2007). UPLC tekniği ile MS/MS analizleri için optimum koşullar belirlenmiş ve sistemin validasyonu yapılmıştır. Analizlerde ACE-C18 (250×4.6 mm, 5µ) kolonu kullanılmıştır. Ayırma 60:40 (v/v) metanol-su ve %0,1 formik asit ortamında gerçekleştirilmiştir. Beşeri İlaçların Ruhsatlandırma Teknik Gereksinimleri İçin Uluslararası Uyum Konseyinin Klavuzuna (ICH Klavuzu)'na uygun olarak kolşisinin parçalanma ürünleri; asidik, bazik, oksidatif, termal, UV ışık koşulları altındaki davranışı LC-MS/MS tekniği ile incelenerek belirlenmiştir (ICH guidelines 2003). Bu koşullar; 1 M HCl 100 °C -30 dk, 1M NaOH 100 °C -30 dk, %3-%30 H₂O₂ 100 °C -30 dk, 6-24 saat 100 °C termal bozunma, 6-24 saat 254 nm dalga boyunda-oda sıcaklığında UV ışık altında bozunma şartlarında; LC-MS/MS, EJS-ESI tekniği ve pozitif iyon modda bozunurluk ürünleri gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: – Kolşisin; UPLC; Validasyon; Bozunurluk; LC-MS/MS

Development and Validation of LC-MS/MS Method for Determination of Degradation Products of Colchicine Under Forced Conditions

ABSTRACT: Colchicine is a plant-based drug with antifibrotic, anti-inflammatory, antihistaminic, membrane stabilization and lipid peroxidation inhibitory effects known since ancient Greece. All of these features make the idea that inflammation may be effective in inflammatory events and diseases in which cell division is anterior. Colchicine used for years in gout arthritis has been the drug of choice for, Behçet's disease, scleroderma, amyloidosis and liver cirrhosis for the past 50 years (Dönmez M.). The identification of drug molecules and their purity in commercial pharmaceutical forms is important from a toxicological and pharmacological point of view. Advanced methods for monitoring purity and related degradation products during the preparation of pharmaceutical forms are needed (U.S. Food and Drug Administration 2003, 2006). The object of this study is to develop a rapid method of LC-MS / MS technique of colchicine and degradation products in the intended pharmaceutical dosage forms. An LC-MS / MS method has been developed to detect

colchicine in commercial dosage forms and degradation products in forced conditions in these preparations (Liu et al. 2007). Optimum conditions for MS/MS analysis with UPLC technique were determined and the system was validated. ACE-C18 (250×4.6 mm, 5µ) column was used in these analyzes. The separation was carried out in a 60:40 (v/v) methanol-water and 0.1% formic acid medium. Colchicine degradation products in accordance with The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH Guidelines); Behavior under acidic, basic, oxidative, thermal, UV light conditions were determined by LC-MS / MS technique (ICH guidelines 2003). These conditions include; 1 M HCl 100 °C -30 min, 1 M NaOH 100 °C -30 min, 3% -30% H₂O₂ 100 °C -30 min, 6-24 hours 100 °C thermal decomposition, 6-24 hours at 254 nm wavelength- Under the conditions of under light; LC-MS/MS, EJS-ESI techniques and degradation products in positive ion mode have been observed.

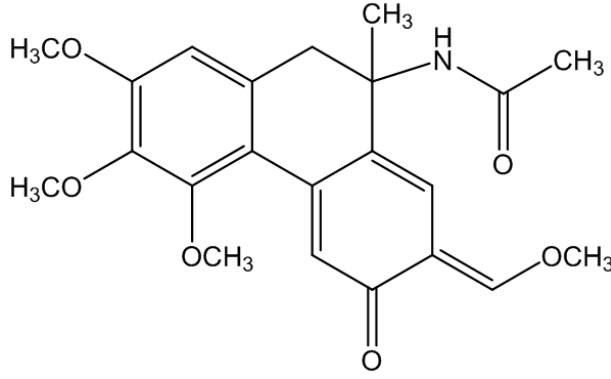
Key Words: – Colchicine; UPLC; Validation; Degradation; LC-MS/MS

1. Giriş

Kolşisin yağda çözünen bir alkaloid olup hızlı bir şekilde gastrointestinal sistemden absorbe olur. Uygulamadan otuz dakika ile iki saat sonra plazmada “peak” konsantrasyonlara ulaşır. Yaklaşık olarak %50’si plazma proteinlerine bağlanır (Wallace ve Ertel 1973). Dağılım hacmi 2.2 L/kg’dır ki bu değer toplam vücut sıvısından daha büyük bir hacimdir. Bu özellik, kolşisin zehirlenmesinin tedavisinde hemodiyaliz kullanımını ve yararını kısıtlamaktadır. Kolşisin esas olarak karaciğerde deasetilasyona uğramaktadır (Hunter ve Klaassen 1974). Uygulanılan dozun %30’u idrarla değişmeden atılır. Kolşisin ve metabolitleri safra ve bağırsak sekresyonlarıyla atılarak, enterohepatik sirkülasyona girer. Sonuç olarak kolşisin hızla absorbe olmakta, ancak belli dokularda uzun süre kalmaktadır (Murray et al. 1983).

Kolşisinin < 0.5 mg/kg dozlarında minör toksisite geliştiği ve %100 iyileşme olduğu, 0.5-0.8 mg/kg arasındaki dozlarda majör toksisite geliştiği ve %10 mortalite gözlemlendiği ve > 0.8 mg/kg dozlarda hastaların 72 saat içinde kardiyojenik şok sonucu kaybedildiği bildirilmiştir (Bismuth et al. 1983, Weakley et al. 2001). Ancak alınan ilaç miktarı ile klinik bulguların ciddiyeti ve prognoz doğru orantılı değildir. Kolşisinin total 7 ve 7.5 mg alındığı durumda ölüm ve tahmini 350 mg alındığı durumda ise düzelme meydana geldiği rapor edilmiştir (Jarvie et al. 1979, Gooneratne 1966).

Farmasötik ürünlerin tedariği formülasyondaki etken bileşenin saklama stabilitesine bağlıdır. Bu nedenle, aktif bileşenin bozunma davranışı farmasötik ürünün raf ömrünün belirlenmesinde önemlidir. Aktif bileşenin bozunma ürünlerinin bilinmesi, depolama sırasında meydana gelen istenmeyen yan ürünlerin oluşumundan kaçınmaya yardım etmek için faydalıdır. Bir ilaç maddesinin safsızlık profili ve kararlılığı, güvenlik değerlendirmesi ve üretim sürecinde de ayrıca önemlidir. Stress testleri, ilaç etken maddelerin zorlanmış koşullardaki parçalanma ürünleri ve parçalanma mekanizmaları hakkında bilgi edinmek için yapılır (Nicolas et al. 1998). Bu konu ile ilgili literatürler ve kaynaklar incelendiğinde kolşisin bozunma ürünlerinin analitik tespiti ile ilgili bildiğimiz kadarıyla çalışma yoktur. Bu yüzden kolşisinin bozunurluk ürünlerinin tayini için güvenilir ve kullanışlı bir yöntemin geliştirilmesi gereklidir. Bu amaçla, etken maddelerin asidik, bazik, oksidatif, termal ve fotolitik koşullardaki bozunma ürünleri m/z değerleri ve parçacık örneklerine dayanarak tespit edilmiştir.



Şekil 1. Kolşisin
Figure 1. Colchicine

2. Materyal ve Metot

2.1. Kimyasallar

Analizlerde HPLC saflıkta kimyasallar kullanılmıştır. kullanılan tüm kimyasal maddeler ve çözücüler analitik kullanılmıştır. Metanol, formik asit, hidroklorik asit, sodyum hidroksit, hidrojen peroksit MERCK firmasından temin edilmiştir. Ultrasaf su Thermo marka ultrasaf su cihazından temin edilmiştir. Mobil faz solüsyonlarını filtre etmek için 0.45 µm membran (Millipore, Bedford, MA, USA) filtre kullanıldı. Kolşisin standardı Sigma Aldrich firmasından satın alındı.

2.2. UPLC Analiz Metodu

Kromatografik analizler için Agilent 1200 İfinity UPLC sistemi kullanılmıştır. UPLC sistemi yüksek basınç pompası, DAD dedektör, oto örnekleyici, degazer, kolon fırını, ve soğutucu dan oluşmuştur. Dedeksiyon 250 nm dir. ACE-C18 (250×4.6 mm, 5µ) kolonu kullanılmıştır, sabit faz 40 °C'de tutulmuştur. Enjeksiyon hacmi 1 µL, mobil faz akış hızı 1.2 mL/dk olarak metod oluşturulup uygulanmıştır. Analitik metodun validasyonu için kolşisin standardından 100 mg bir beher içerisinde bir miktar su içerisinde çözünmesi sağlandı. 100 mL lik balonjojeye aktarıldı. Hacim 100 mL ye suyla tamamlandı. Hazırlanan bu 1000 ppm konsantrasyondaki stok standart solüsyondan seyreltme yolu ile 0,5 ppm, 1 ppm, 4 ppm, 8 ppm, 12 ppm ve 15 ppm konsantrasyonlarında 6 standart solüsyon hazırlandı Tablo 1. Hazırlanan standart solüsyonlar her biri beşer kez olmak üzere üç gün boyunca UPLC cihazına enjekte edildi. Tüm çözelti ve standartlar +4 °C de muhafaza edilmiştir.

Tablo 1. Validasyon için kullanılan kolşisin standartlarının konsantrasyonları
Table 1. Concentrations of colchicine standards used for validation

Validasyon İçin Kullanılan Colchicine Standartlarının Konsantrasyonları (ppm)					
0,5	1	4	8	12	15

2.3. UPLC Analiz Metodunun Validasyonu

Keskinlik

Pik alanının ölçümü ve numune uygulamanın tekrarlanabilirliği aynı numunenin beş kez kullanılmasıyla gerçekleştirildi ve %RSD olarak ifade edildi.

Geri Kazanım Çalışmaları

Analiz edilen numunelere kolşisin stok solüsyonundan % 80, %100, %120 oranında ilave edildi ve karışım tekrar analiz edildi. Kolşisinin numunelerdeki farklı düzeylerinde geri kazanımını kontrol etmek için deney altı farklı konsantrasyonda beş tekrar olarak yapıldı.

Özgünlük

Metodun özgünlüğü standart kolşisini analiz ederek tespit edilmiştir. Numunelerdeki kolşisin piki standardın alıkonma zamanı ile standardın alıkonma zamanının kıyaslanması ile teyit edilmiştir. Kolşisin pikinin saflığı, pik başlangıç ve bitiş pozisyonları olmak üzere iki düzeyde tayflarının karşılaştırılması ile değerlendirilmiştir.

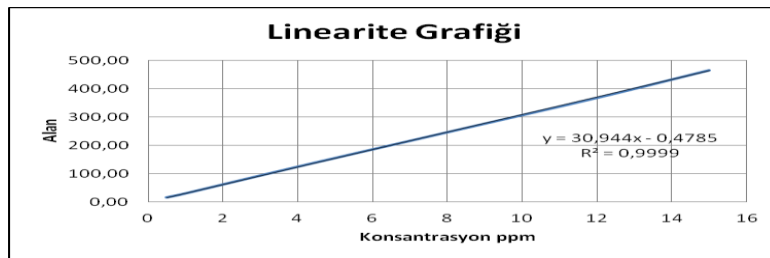
3. Bulgular

3.1. UPLC Metod Validasyonu Sonuçları

Stres koşulları altında bozundurulmuş kolşisin ve bozunma ürünlerinin analizi için sağlam bir LC-MS/MS metodu geliştirildi. Geliştirilen metod ile kolşisin ve ilgili ürünlerin iyi bir ayrımı gerçekleştirildi. Mobil faz olarak 60:40 (v/v) metanol-su ve %0,1 formik asit kullanıldı. Piklerin resolüsyonları çok iyi idi. Stres çalışmaları kolşisin ve muhtemel bozunma ürünleri arasında hiçbir girişim gözlenmedi. Metodun doğrusallığı, doğruluğu ve keskinliği araştırıldı.

Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık

Kalibrasyon eğrisi altı konsantrasyon seviyesi (0,5, 1, 4, 8, 12, 15 ppm) ile karşılık gelen pik alanlarından elde edilmiştir. Kalibrasyon eğrisi kolşisinin 0,5-15 ppm aralığında mükemmel bir doğrusallık gösterdi. Kalibrasyon eğrisi için doğru denklemi $R^2 = 0,9999$ korelasyon katsayısı ile $y = 30,944x - 0,4785$ idi. Şekil 2. kolşisin için 254 nm de kalibrasyon eğrisini göstermektedir.



Şekil 2. Kolşisin standart solüsyonlarının doğrusallık grafiği
Figure 2. Linearity graph of standard solutions of colchicine

Kesinlik

Altı farklı konsantrasyondaki kolşisin standart solüsyonu beş kez art arda UPLC Cihazına enjekte edildi. Elde edilen pik alanları kaydedildi ve %RSD değeri her bir konsantrasyon için hesaplandı. % RSD değerlerinin en yüksek %1 olduğu gözlemlendi. Pik alanları ve % RSD değerleri Tablo 2.'de verilmiştir.

Tablo 2. Kolşisin standartlarının konsantrasyonları ve pik alanları

Table 2. Concentrations and peak areas of colchicine standards

ENJEKSİYON	0,5 ppm	1 ppm	4 ppm	8 ppm	12 ppm	15 ppm
1	15,63	29,76	124,40	246,38	368,17	465,83
2	15,56	29,92	124,45	246,53	368,39	465,51
3	15,54	29,83	124,51	246,39	368,61	465,89
4	15,88	29,93	124,4	246,43	368,17	466,01
5	15,56	29,78	124,15	246,23	368,07	465,95
ORTALAMA	15,63	29,84	124,38	246,39	368,28	465,84
SD	0,1417	0,0783	0,1374	0,1083	0,2175	0,1952
%RSD	0,9064	0,2623	0,1104	0,0439	0,0591	0,0419

Geri Kazanım Çalışmaları

Analiz edilen numunelere kolşisin stok solüsyonundan % 80, %100, %120 oranında ilave edildi ve karışım tekrar analiz edildi. Kolşisinin numunelerdeki farklı düzeylerinde kolşisin geri kazanımını kontrol etmek için deney beş kez yapıldı. Geri Kazanım sonuçları yüksek verim göstermiştir. Kolşisin geri kazanımı %98.02-%99.10 aralığında değişmektedir. Bu önerilen metodun kolşisin analizi için kullanılabilirliğini doğrulamaktadır.

Özgünlük

Metodun özgünlüğü tekrar denemelerle analiz ederek tespit edilmiştir. Numunelerdeki kolşisin piki standardın alıkonma zamanı ile standardın alıkonma zamanının kıyaslanması ile teyit edilmiştir. Kolşisin pikinin saflığı, pik başlangıç ve bitiş pozisyonları olmak üzere iki düzeyde tayflarının karşılaştırılması ile değerlendirilmiştir.

Sonuçlar göstermektedir ki sistem uygunluğu gereklilikleri geçmiştir ve sonuç olarak sistemin ileri kromatografik parametreleri incelenebilir. Sistem uygunluk solüsyonunun ve resolüsyon solüsyonunun tekrarlı enjeksiyonları validasyon prosesi süresince yapıldı.

Hazırlanan standart solüsyonlar her biri beşer kez olmak üzere üç gün boyunca UPLC cihazına enjekte edildi. Elde edilen pik alanları kaydedildi. Enjeksiyonlarda elde edilen pik alanları Tablo 3 te verilmiştir. 0,5-15 ppm aralığında pik alanlarına karşılık konsantrasyon grafiği çizildi. Doğrusallığı değerlendirmek üzere korelasyon katsayısı kullanıldı. Doğrusallık grafiği Şekil 2 de verilmiştir. Kolşisin için Tayin limiti (LOD) ve Ölçüm limiti (LOQ) sinyal/gürültü (S/N) oranı ile saptandı. Validasyon süresince farklı test parametrelerinden elde edilen sonuçlar Tablo 3'te ve tekrarlanabilirlik sonuçları Tablo 4'te verilmiştir. Elde edilen MS pikleri Şekil 4'te gösterilmiştir.

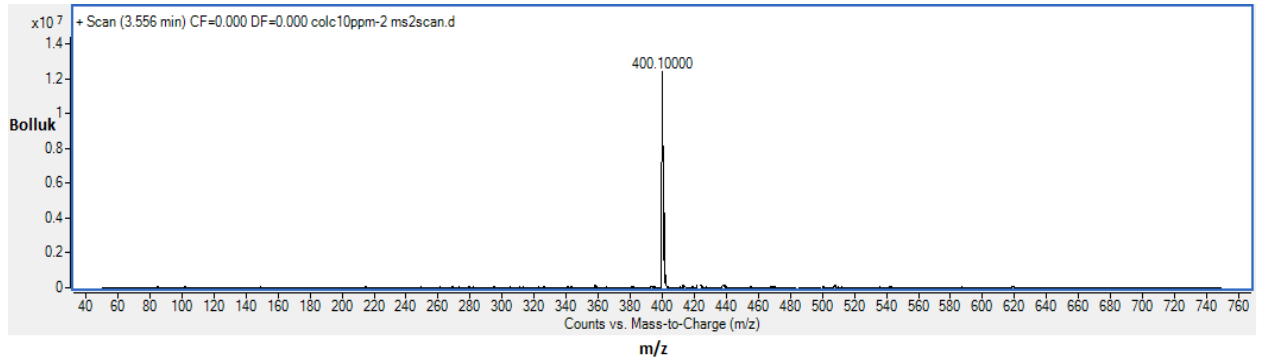
3.2. LC-MS/MS Sonuçları

LC-MS/MS analizleri Agilent 6460 triple quad kütle spektrometresiyle yapılmıştır. Elektrospray Jet Stream iyonlaştırma tekniği kullanılarak pozitif iyon modda bozunurluk

ürünleri belirlenmiştir. Kütle taraması sonucunda kolşisinin kütle spektrumu 400 ([M+H]⁺ m/z olarak gözlemlenmiştir Şekil 3. Kütle spektrometresi koşulları Tablo 5’te verilmiştir.

2.4. Kolşisinin Bozundurulma Prosedürü

ICH Klavuzuna uygun olarak kolşisinin parçalanma ürünleri; asidik, bazik, oksidatif, termal, UV ışık, koşulları altındaki davranışı LC-MS/MS tekniği ile incelenerek belirlenmiştir. Bu koşullar; 1 M HCl 100 °C -30 dk, 1M NaOH 100 °C -30 dk, %3-%30 H₂O₂ 100 °C -30 dk, 6-24 saat 100 °C termal bozunma, 6-24 saat 254 nm dalga boyunda-oda sıcaklığında UV ışık altında bozunma şartlarında gerçekleştirilmiştir MS piklerinden de açıkça anlaşıldığı gibi; kolşisin en fazla asidik koşulda olmak üzere, tüm stres testlerinde parçalanmış, stabil kalmamıştır.



Şekil 3. Kolşisin kütle spektrumu

Figure 3. Colchicine mass spectrum

Tablo 3. UPLC analiz metodu validasyon verileri istatistiksel değerlendirilmesi

Table 3. Statistical evaluation of UPLC analysis method validation data

Parametreler		Kolşisin
Doğrusallık	Konsantrasyon Aralığı (ppm)	0,5-15 ppm
	Korelasyon Katsayısı	0,9999
	Kayma	-0,4785
	Eğim	30,944
LOD Teşhis Limiti (ppb)		16
LOQ Tayin Limiti (ppb)		47
Alıkonma zamanı (dk)		3.5

Tablo 4. Tekrarlanabilirlik sonuçları

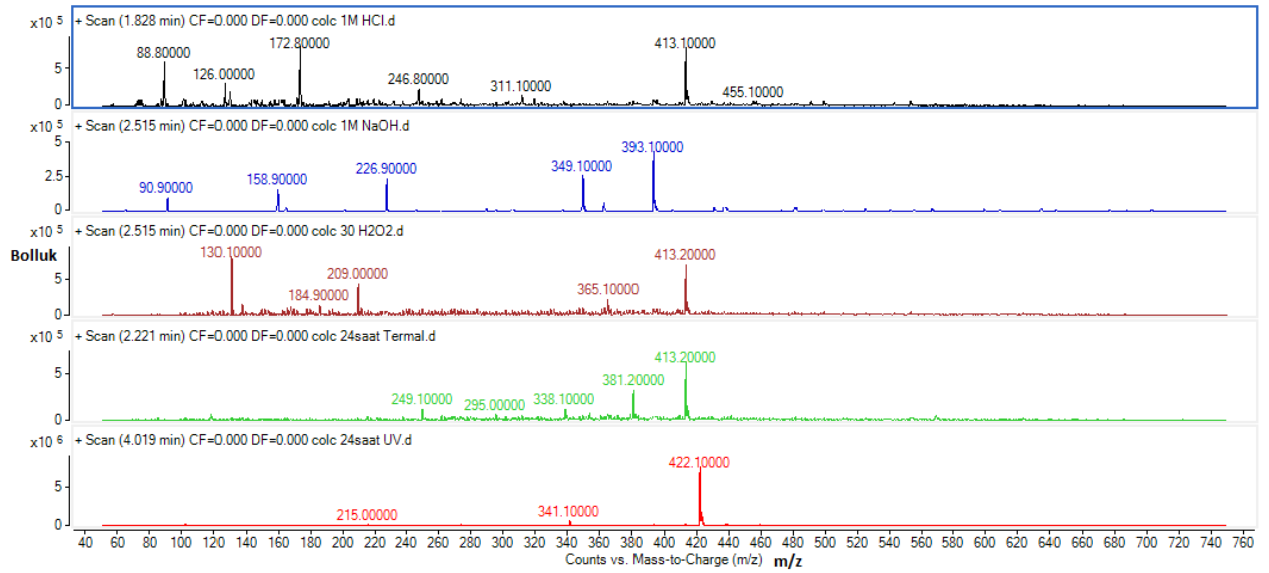
Table 4. Repeatability results

	% RSD 0,5 ppm	% RSD 1 ppm	% RSD 4 ppm	% RSD 8 ppm	% RSD 12 ppm	% RSD 15 ppm
1. GÜN	0,9064	0,2623	0,1104	0,0439	0,0591	0,0419
2. GÜN	0,6407	0,2087	0,0805	0,0708	0,0664	0,1121
3. GÜN	0,3150	0,2449	0,0807	0,0369	0,0560	0,1068

(ICH klavuzuna göre tekrarlanabilirlik testlerinin uygun olabilmesi için % RSD değerlerinin 2’den küçük olması istenir. Yukarıdaki tabloda görülen rakamların tümü 1’in altındadır.)

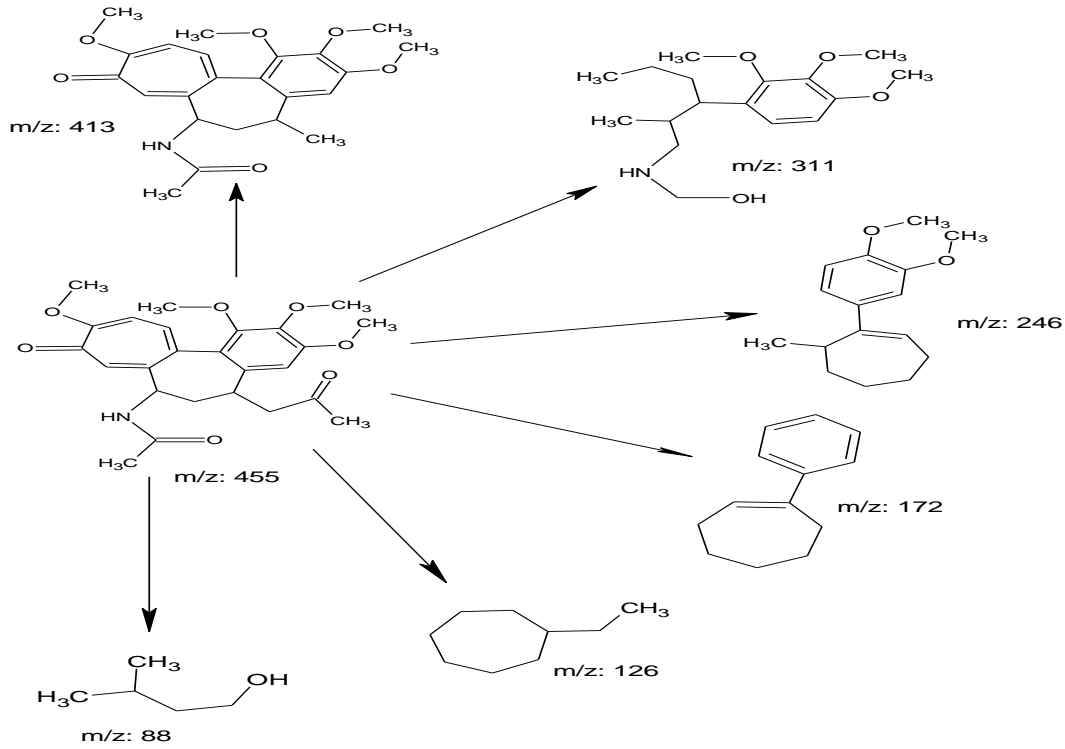
Tablo 5. Kütle spektrometresi koşulları**Table 5.** Colchicine mass spectrometry conditions

Genel Ayarlar	Değerler	Analiz Parametreleri	Değerler
Gaz Sıcaklığı	325 °C	Ana Kütle	295.0 m/z
Gaz Akış Hızı	11 L/dk	Tanınma Ürünleri Kütleleri	248.7-160.7 m/z
Püskürtme Basıncı	45 psi	Kütle İzleme Süresi	45 ms
Taşıyıcı Gaz Sıcaklığı	400 °C	Çarpışma Enerjisi	30
Taşıyıcı Gaz Akış Hızı	12 L/dk	Alınma Süresi	3.4 dk
Kapiler Voltajı			3000 Volt

**Şekil 4.** Kolşisin stres testi bozunma ürünleri MS pikleri**Figure 4.** MS peaks of degradation products of stress test

2.5. Kolşisinin Asidik Şartlardaki Bozundurulması

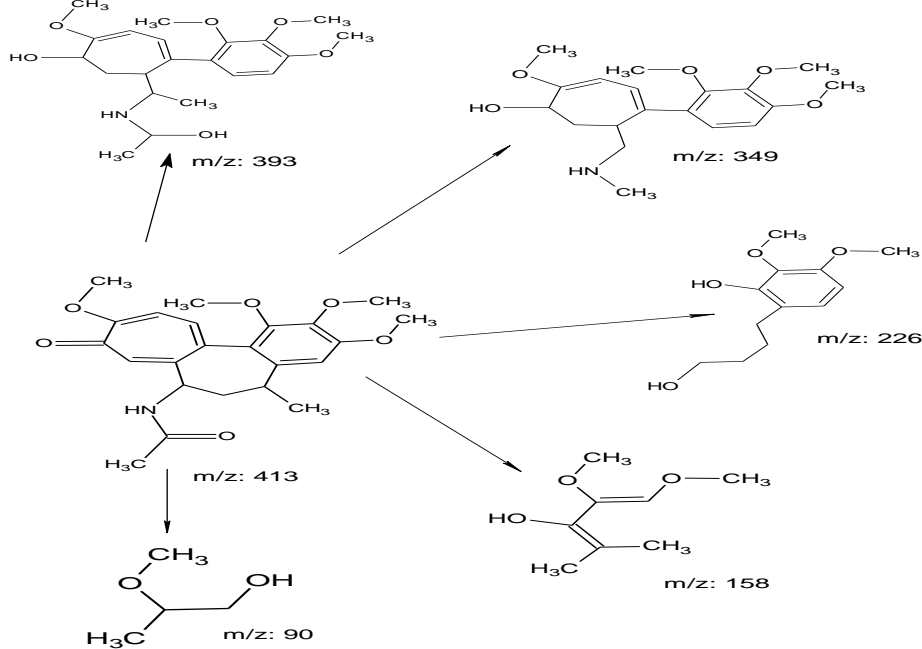
100 ppm olarak hazırlanan kolşisinin stok çözeltisinden 10 ppm'e 1 M HCl ile seyreltme yapıldı. Amber vial alınan bu çözelti 30 dakika 100 °C de etüv içerisinde bekletildi. 1 µL hacminde LC-MS/MS cihazına enjekte edildiğinde, kolşisinin tümüyle bozunmuş olduğu anlaşılmıştır. Oluşan ürünler Şekil 5.'te gösterilmiştir. Burada yapıya CH₃ ve O₂ grupları bağlanmış daha sonra parçalanma ürünleri oluşmuştur.



Şekil 5. Kolşisin asidik koşuldaki bozunurluk ürünleri
Figure 5. Decomposition products of colchicine under acidic condition

2.6. Kolşisinin Bazik Şartlardaki Bozundurulması

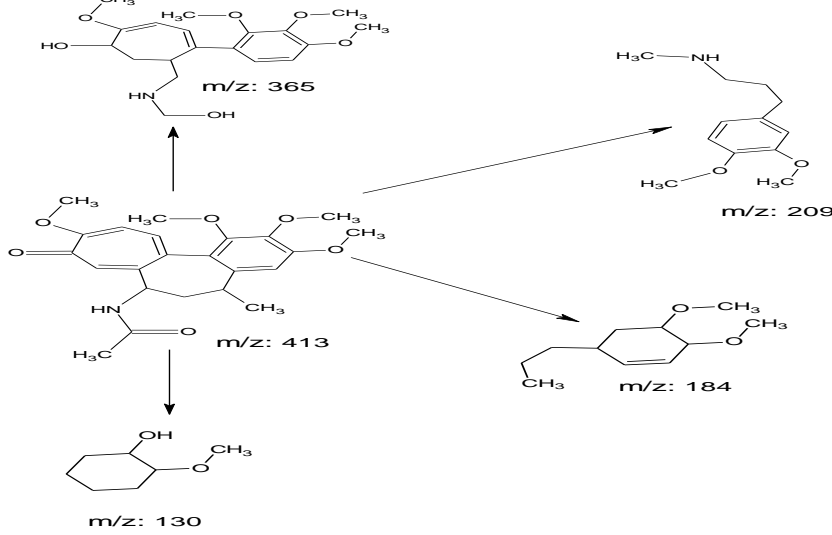
100 ppm olarak hazırlanan kolşisinin stok çözeltisinden 10 pmm'e 1 M NaOH ile seyreltme yapıldı. Amber viale alınan bu çözelti 30 dakika 100 °C de etüv içersinde bekletildi. 1 µL hacminde LC-MS/MS cihazına enjekte edildiğinde, kolşisinin tümüyle bozunmuş olduğu anlaşılmıştır. Oluşan ürünler Şekil 6.'da gösterilmiştir. Burada yapıya CH₃ bağlanmış daha sonra parçalanma ürünleri oluşmuştur.



Şekil 6. Kolşisin bazik koşuldaki bozunurluk ürünleri
Figure 6. Decomposition products of colchicine under alkaline condition

2.7. Kolşisinin Oksidatif Şartlardaki Bozundurulması

100 ppm olarak hazırlanan kolşisinin stok çözeltisinden 10 pmm'e %3 ve %30 luk H₂O₂ ile seyreltme yapıldı. Amber viale alınan bu çözeltiler 30 dakika 100 °C de etüv içersinde bekletildi. 1 µL hacminde LC-MS/MS cihazına enjekte edildiğinde, kolşisinin %3 H₂O₂ ile bozunmadığı %30 H₂O₂ ile tümüyle bozunmuş olduğu anlaşılmıştır. Oluşan ürünler Şekil 7.'de gösterilmiştir. Burada yapıya CH₃ bağlanmış daha sonra parçalanma ürünleri oluşmuştur.

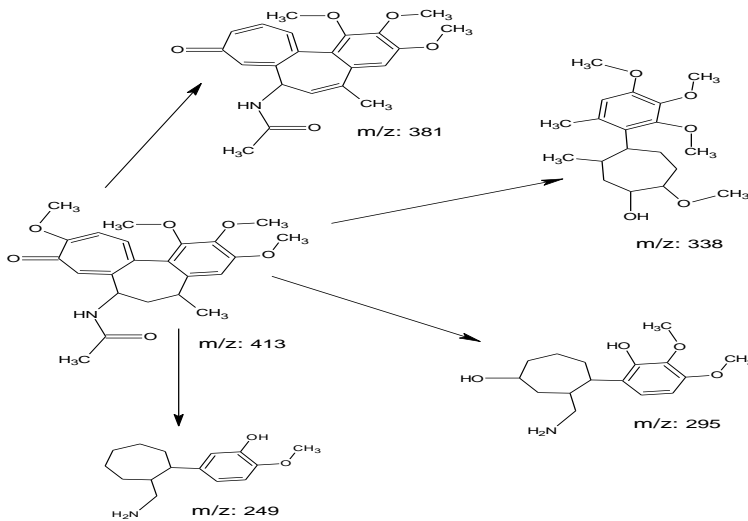


Şekil 7. Kolşisin oksidatif koşuldaki bozunurluk ürünleri

Figure 7. Decomposition products of colchicine under oxidative condition

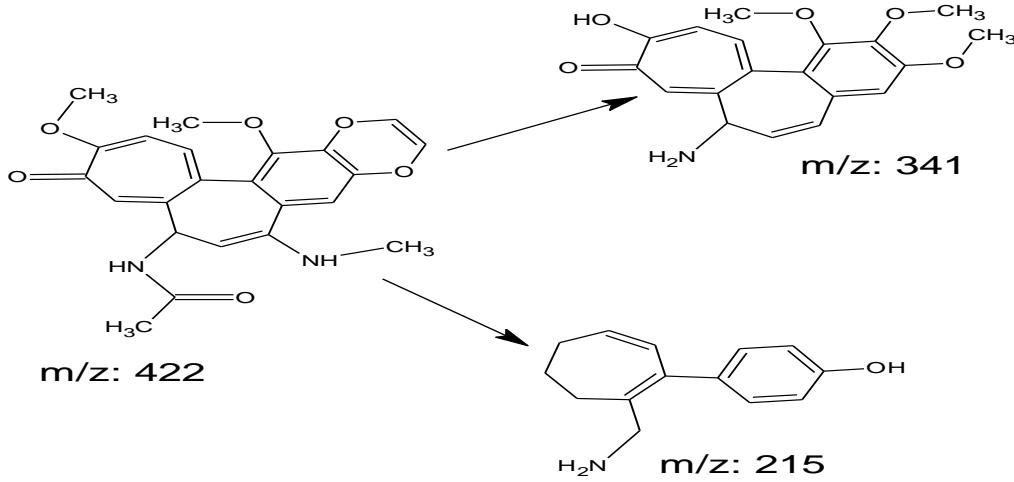
2.8. Kolşisinin Termal Şartlardaki Bozundurulması

100 ppm olarak hazırlanan kolşisinin stok çözeltisinden 10 pmm'e mobil faz ile seyreltme yapıldı. Amber viale alınan bu çözeltiler 6 ve 24 saat boyunca 100 °C de etüv içersinde bekletildi. 1 µL hacminde LC-MS/MS cihazına enjekte edildiğinde, kolşisinin 6 saat içersinde bozunmadığı 24 saat içersinde ise tümüyle bozunmuş olduğu anlaşılmıştır. Oluşan ürünler Şekil 8.'de gösterilmiştir. Burada yapıya CH₃ bağlanmış daha sonra parçalanma ürünleri oluşmuştur.



Şekil 8. Kolşisin termal koşuldaki bozunurluk ürünleri

Figure 8. Degradation products of Colchicine under thermal condition



Şekil 9. Kolşisin UV ışık koşulundaki bozunurluk ürünleri
Figure 9. Degradation products of colchicine under UV lamp

2.9. Kolşisinin UV Şartlardaki Bozundurulması

100 ppm olarak hazırlanan kolşisinin stok çözeltisinden 10 ppm'e mobil faz ile seyreltme yapıldı. Şeffaf vialle alınan bu çözeltiler 6 ve 24 saat boyunca 254 nm dalga boyunda oda sıcaklığında UV kabin içerisinde bekletildi. 1 µL hacminde LC-MS/MS cihazına enjekte edildiğinde, kolşisinin 6 saat içerisinde kısmen bozunmadığı 24 saat içerisinde ise tümüyle bozunmuş olduğu anlaşılmıştır. Oluşan ürünler Şekil 9.'da gösterilmiştir. Burada yapıya CH₃ bağlanmış daha sonra parçalanma ürünleri oluşmuştur.

4. Tartışma ve Sonuç

Her maddenin stabil olduğu bir pH, sıcaklık, oksitlenme sınırı ve UV ışığa karşı direnç vardır. Bunların dışındaki şartlarda ilaç değişime uğrar. Değişim molekülün bozunmaya uğraması veya parçalanması şeklinde olabilir. kolşisin standartından 100 mg/L konsantrasyonunda çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler 10 ppm'e 1M HCl 100 °C 30 dakika, 1M NaOH 100 °C 30 dakika, %3-30 H₂O₂ 100 °C 30 dakika, 6-24 saat 100 °C ve 6-24 saat 254 nm UV ışık altında bekletilerek validasyonu ve optimizasyonu yapılan UPLC şartlarında MS spektrumları alınmıştır.

Sonuç olarak elde edilen veriler ışığında, kolşisinin standart numunesi için geliştirilen ve uygulanan bozundurma işlemlerinde kolşisin stabil kalmadığı spektrumlardan da anlaşıldığı üzere parçalandığı gözlemlenmiştir. Sepktrumlarda birbirinin benzeri birçok pik bulunmakla birlikte majör pikler değerlendirilmiş ve yapıdan koptuğu şekilde çizimlendirilip sunulmuştur

Teşekkür

Bu çalışmanın tamamlanmasında katkılarından dolayı Uşak Üniversitesi Bilimsel Analiz ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezine teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Bismuth C, Baud F, Dally S. Standardized prognosis evaluation in acute toxicology: Its benefit in colchicine, paraquat and digitalis poisonings. *J Toxicol Clin Exp* 1986;33-8
- Dönmez M., 2008. Kolşisin'in Ratlarda Deneysel Olarak Oluşturulan İntraabdominal Adezyonların Gelişimi Üzerine Etkisi , Uzmanlık, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul, 45.
- Gooneratne, B.W.M. 1966. Massive generalized alopecia after poisoning by *Gloriosa Superba*. *Br Med J* 1966;1:1023-4.
- Hunter AL, Klaassen CD. Biliary excretion of colchicine. *J Pharmacol Exp Ther* 1974;192:605-17.
- ICH guidelines, Q1A (R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products (revision 2), International Conference on Harmonization. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/RegulatoryInformation/Guidances/ucm128204.pdf> , 2003.
- Jarvie, D., Park, J., Stewart, M.J. 1979. Estimation of colchicine in a poisoned patient by using high performance liquid chromatography. *Clin Toxicol* 1979;14:375-81.
- Liu DQ, Wu L, Sun M, MacGregor PA. On-line H/D exchange LCMS strategy for structural elucidation of pharmaceutical impurities. *J Pharm Biomed Anal* 2007; 44: 320-9.
- Murray SS, Kramlinger KG, McMichan JC, Mohr DN. Acute toxicity after excessive ingestion of colchicine. *Mayo Clin Proc* 1983;58:528-32.
- Nicolas E.C., Scholz, T.H., 1998. Active drug substance impurity profiling part II. LC-MS/MS fingerprinting, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 16 825-836.
- U.S. Food and Drug Administration; Guidance for Industry, Q3A Impurities in New Drug Substances 2003.
- U.S. Food and Drug Administration; Guidance for Industry, Q3B Impurities in New Drug Products 2006
- Wallace SL, Ertel NH. Plasma levels of colchicine after administration of a single dose. *Metabolism* 1973;22:749-53.
- Weakley-Jones B, Gerber JE, Biggs G. Colchicine poisoning: Case report of two homicides. *Am J Forensic Med Pathol* 2001;22:203-6.