

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AMPİSİLİN TRİHİDRAT VE FENAZOPİRİDİN
HİDROKLORÜR'ÜN KROMATOĞRAFİK VE TÜREV
SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMLER İLE MİKTAR ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Betül ATAÖĞLU

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA
Enstitü Bilim Dalı : ANALİTİK KİMYA
Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Aysel KÜÇÜK TUNCA

Temmuz 2014

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AMPİSİLİN TRİHİDRAT VE FENAZOPİRİDİN
HİDROKLORÜR'ÜN KROMATOĞRAFİK VE TÜREV
SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMLER İLE MİKTAR
ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Betül ATAÖĞLU

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA
Enstitü Bilim Dalı : ANALİTİK KİMYA

Bu tez 07 / 07 / 2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr.
Aysel KÜÇÜK
TUNCA
Jüri Başkanı



Prof. Dr.
Abdil ÖZDEMİR

Üye


Doç. Dr.
Serap COŞANSU
AKDEMİR
Üye



TEŞEKKÜR

Tez çalışmamı yöneten, bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, her aşamada yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Aysel Küçük Tunca'ya,

Laboratuar çalışmalarım sırasında, gösterdikleri destek ve anlayıştan dolayı Sakarya Üniversitesi Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Mustafa Şahin Dündar'a,

Bilimsel katkılarından ve her aşamada göstermiş oldukları destek ve yardımlardan dolayı Sayın Prof. Dr. Abdil Özdemir'e,

Etken maddeleri sağlayan ve çalışmam sırasında bilgi ve deneyimleri ile her türlü desteği büyük bir özveri ile gösteren Sayın Devrim Karakaya'ya (AVIS İlaç San ve Tic A.Ş.),

Çalışmam sırasında bilgilerinden faydalandığım, yardımlarını esirgemeyen aplikasyon uzmanı Sayın Ömer Halit Turmuş'a (Ant Teknik),

Plazma numunesi desteğinden dolayı Sayın Hasan Bolat nezdinde Ümraniye Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne,

Bütün yaşantım sırasında bana her türlü konuda destek olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

| | |
|---------------------------------------|-----|
| TEŞEKKÜR | ii |
| İÇİNDEKİLER..... | iii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ | vii |
| ŞEKİLLER LİSTESİ..... | x |
| TABLolar LİSTESİ..... | xii |
| ÖZET | xiv |
| SUMMARY | xv |

BÖLÜM 1.

| | |
|--|----|
| GİRİŞ | 1 |
| 1.1. İlaç..... | 1 |
| 1.1.1. İlaçların sınıflandırılması | 2 |
| 1.1.1.1. Farmasötik şekillerine göre ilaçların sınıflandırılması | 2 |
| 1.1.1.2. Tedavi edici gruplarına göre ilaçların sınıflandırılması | 4 |
| 1.2. Antibiyotikler..... | 7 |
| 1.2.1. Ampisilin trihidrat | 9 |
| 1.3. Analjezikler..... | 12 |
| 1.3.1. Fenazopiridin hidroklorür | 12 |
| 1.4. Azosilin tablet | 14 |

BÖLÜM 2.

| | |
|---|----|
| GENEL BİLGİLER..... | 16 |
| 2.1. Biyoeşdeğerlik | 16 |
| 2.2. Biyoyararlanım | 16 |
| 2.3. Kromatografi | 17 |
| 2.3.1. Kromatografi'nin temel prensibi ve tanımları | 17 |
| 2.3.2. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması | 19 |

| | |
|---|----|
| 2.3.2.1. Ayrılma mekanizmalarına göre sınıflandırma | 20 |
| 2.3.2.2. Uygulama tekniğine göre sınıflandırma..... | 25 |
| 2.3.2.3. Faz tiplerine göre sınıflandırma..... | 26 |
| 2.3.3. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi | 28 |
| 2.3.3.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazı | 28 |
| 2.3.3.2. YPSK sistem türleri | 37 |
| 2.3.3.3. YPSK’de ayırma teknikleri | 37 |
| 2.3.3.4. YPSK yönteminin avantajları | 37 |
| 2.3.3.5. YPSK yönteminin dezavantajları..... | 38 |
| 2.3.3.6. YPSK’nin uygulama alanları..... | 38 |
| 2.3.3.7. Saflaştırma..... | 38 |
| 2.3.3.8. Kalitatif analiz | 39 |
| 2.3.3.9. Kantitatif analiz | 39 |
| 2.3.3.10. YPSK metodunun geliştirilmesi | 39 |
| 2.4. Validasyon | 40 |
| 2.4.1. Analitik yöntem validasyonu | 41 |
| 2.4.1.1. Analitik yöntem validasyonunda kapsam..... | 42 |
| 2.4.1.2. Analitik yöntem validasyon aşamaları | 42 |
| 2.4.1.3. Analitik yöntem validasyon parametreleri | 43 |
| 2.5. Sistem Uygunluk Testleri | 48 |
| 2.6. Spektroskopi | 61 |
| 2.6.1. UV-GB spektroskopisinin nicel kullanımı..... | 61 |
| 2.6.2. Spektrofotometre | 62 |
| 2.6.3. Türev spektrofotometri | 65 |
| 2.6.3.1. Türev eğrilerinin şekilleri..... | 68 |
| 2.6.3.2. Yöntemin avantajları..... | 71 |
| 2.6.3.3. Yöntemin dezavantajları..... | 71 |
| 2.7. Literatürde Yapılan Çalışmaların Özeti..... | 72 |

BÖLÜM 3.

| | |
|--|----|
| MATERYAL VE YÖNTEM..... | 80 |
| 3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Materyaller | 80 |
| 3.1.1. Kullanılan cihazlar | 80 |

| | |
|---|----|
| 3.1.2. Kullanılan cam malzemeler ve diğer sarf malzemeleri | 81 |
| 3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler..... | 81 |
| 3.2. Deneyler İçin Gerekli Hazırlıklar | 82 |
| 3.2.1. Etken maddelerin saflığı | 82 |
| 3.2.2. Cam malzemelerin ve kolonun temizliği..... | 82 |
| 3.2.3. 0,01 N hidroklorikasit çözeltisi hazırlanışı | 82 |
| 3.2.4. Amonyum dihidrojen fosfat/di-potasyum hidrojen fosfat tamponu hazırlanışı..... | 82 |
| 3.2.5. İnsan plazmasının kullanıma hazırlanması | 83 |
| 3.2.6. Standart çözeltilerin hazırlanması | 83 |
| 3.2.7. Farmasötik preperat çözeltilerinin hazırlanması | 84 |
| 3.2.8. Standart ekleme metodunda kullanılan standart çözeltilerin hazırlanması | 84 |
| 3.2.9. Plazmalı ortamda standart çözeltilerin hazırlanması..... | 85 |
| 3.2.10. Plazmalı ortamda farmasötik preperat çözeltilerinin hazırlanması | 85 |
| 3.2.11. Plazmalı ortamda standart ekleme metodunda kullanılan standart çözeltilerin hazırlanması | 86 |
| 3.2.12. Plazmalı ortamda yapılan denemeler..... | 87 |
| 3.3. Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi | 91 |
| 3.3.1. YPSK yöntemi ile yapılan çalışmalar | 91 |
| 3.3.1.1. Yöntemin optimizasyonu | 91 |
| 3.3.1.2. Kromatografik şartlar | 91 |
| 3.3.2. UV-GB spektrofotometresi ile yapılan çalışmalar | 92 |
| 3.3.2.1. Ortam şartları ve türev derecesi seçimi için yapılan çalışmalar | 92 |
| 3.3.2.2. Kalibrasyon eğrilerinin hazırlanması..... | 96 |

BÖLÜM 4.

| | |
|---|-----|
| BULGULAR VE TARTIŞMA | 97 |
| 4.1. YPSK Yöntemiyle Çözücü Ortamında Elde Edilen Kromatogramlar.. | 97 |
| 4.2. YPSK Yöntemiyle Plazma İçerisinde Elde Edilen Kromatogramlar.. | 100 |
| 4.3. UV Spektrofotometri Yöntemiyle Elde Edilen Spektrumlar | 102 |
| 4.4. Yöntemlerin Validasyonu Çalışmaları..... | 104 |

| | |
|---|-----|
| 4.4.1. Doğrusallık aralığı ve kalibrasyon eğrileri | 104 |
| 4.4.2. Kesinlik ve tekrarlanabilirlik | 107 |
| 4.4.3. Sistem uygunluk parametreleri | 109 |
| 4.4.4. Geri kazanım ve doğruluk..... | 110 |
| 4.4.4.1. Yöntemin farmasötik preperatlara uygulanması..... | 110 |
| 4.4.4.2. Standart ekleme yöntemi ile elde edilen sonuçlar | 111 |
| 4.5. İstatiksel Değerlendirmeler | 113 |
| | |
| BÖLÜM 5. | |
| SONUÇLAR VE ÖNERİLER | 118 |
| | |
| KAYNAKLAR | 122 |
| ÖZGEÇMİŞ | 131 |

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

| | |
|-------------|--|
| AT | : Ampisilin trihidrat ($C_{16}H_{19}N_3O_4S \cdot 3H_2O$) |
| Al_2O_3 | : Alümina, alüminyumoksit |
| Abs | : Absorbans |
| A_S | : Pik asimetri oranı |
| A | : Çoklu akış yolları ve Eddy difüzyonu |
| B | : Boyuna difüzyon |
| % BH | : % Bağıl hata, doğruluk |
| C | : Konsantrasyon |
| C_s | : Maddenin sabit fazdaki konsantrasyonu |
| C_m | : Maddenin mobil fazdaki konsantrasyonu |
| C_U | : Fazlar arasındaki kütle aktarımı |
| $^{\circ}C$ | : Santigrat derece |
| cm | : santimetre |
| DAD | : Diyot Array Dedektör, Diod Dizisi Dedektör |
| dk | : Dakika |
| FH | : Fenazopiridin hidroklorür, piridyum ($C_{11}H_{11}N_5 \cdot HCl$) |
| GLC | : Gaz-sıvı kromatografisi |
| GSC | : Gaz-katı kromatografisi |
| GB | : Görünür bölge |
| H | : Tabaka yüksekliği (cm) |
| HPLC | : High performance liquid chromatography |
| ICH | : Uluslararası Harmonizasyon Konferansı |
| IU | : International Unit |
| IUPAC | : International Union of Pure and Applied Chemistry, Uluslararası Kimya Birliği |
| k' | : Kapasite faktörü |

| | |
|------------------|---|
| K | : Dağılma (partisyon) katsayısı |
| L | : Kolon dolgusunun uzunluğu (cm) |
| L | : Litre |
| LC | : Sıvı kromatografisi |
| LOD | : Gözlenebilirlik sınırı (tespit sınırı) |
| LOQ | : Alt tayin sınırı (miktar tayin limiti) |
| M | : Molarite |
| mA | : Miliabsorbans |
| mg | : Miligram |
| mL | : Mililitre |
| mM | : Milimolar |
| mm | : Milimetre |
| µg | : Mikrogram |
| µL | : Mikrolitre |
| n | : Deneme sayısı |
| nm | : Nanometre |
| N | : Teorik tabaka sayısı |
| N | : Alümina, alüminyumoksit |
| ODS | : 18 karbon atomu zincirinden oluşan oktadesilsilan |
| PH | : Phenazopyridine hydrochloride, piridyum (C ₁₁ H ₁₁ N ₅ .HCl) |
| r | : Korelasyon katsayısı |
| RSD | : Bağlı standart sapma |
| Rs | : Ayırım gücü |
| RT | : Alıkonma zamanı |
| rpm | : Dakikadaki devir sayısı, revolution per minute |
| SD | : Mutlak standart sapma |
| SH | : Standart hata |
| SS | : Standart sapma |
| S _M | : Regresyon doğrusu eğiminin standart sapması |
| S _b | : Regresyon doğrusundaki kaymanın standart sapması |
| SiO ₂ | : Silikajel, silis |
| SUT | : Sistem uygunluk testleri |
| t _R | : Maddenin alıkonma zamanı |

| | |
|----------|--|
| t_0 | : Hareketli fazın alıkonma zamanı, kolon ölü zamanı |
| USP | : Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi |
| u | : Çizgisel hız |
| UV | : Morötesi, ultraviole |
| V | : Ortalama göç hızı |
| V_0 | : Hareketli fazın alıkonma hacmi, ölü hacim |
| V_R | : Maddenin alıkonma hacmi |
| YPSK | : Yüksek basınçlı (performanslı) sıvı kromatografisi |
| W | : Pik taban genişliği |
| X | : Ortalama |
| α | : Seçicilik katsayısı |

ŞEKİLLER LİSTESİ

| | |
|---|----|
| Şekil 1.1. Ampisilin trihidrat (AT)'ın molekül yapısı | 9 |
| Şekil 1.2. Fenazopiridin hidroklorür (FH)'ün molekül yapısı | 13 |
| Şekil 2.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazının şematik gösterimi | 29 |
| Şekil 2.2. Kromatogram parametreleri | 48 |
| Şekil 2.3. Tek bileşenli bir karışım için tipik bir kromatogram | 50 |
| Şekil 2.4. Teorik tabaka sayısı için kromatogram | 51 |
| Şekil 2.5. Kapasite faktörü için kromatogram | 52 |
| Şekil 2.6. Ayırım gücü için kromatogram | 54 |
| Şekil 2.7. Rezolüsyon faktörünün kromatogramlara göre değişimi | 55 |
| Şekil 2.8. Van Deemter eğrisi | 57 |
| Şekil 2.9. Pik asimetri oranının hesaplanması | 58 |
| Şekil 2.10. Temel üç izoterm şekilleri ile alıkonma zamanı ve pik şekline etkileri | 59 |
| Şekil 2.11. UV-GB spektrofotometresinin şematik gösterimi | 63 |
| Şekil 2.12. Gauss tipindeki bir eğrinin belirli noktalardaki tanjantları ve karşılıkları | 67 |
| Şekil 2.13. Türev eğrilerinin şekilleri | 69 |
| Şekil 2.14. Basit bir Gauss pikinin (a) ve örtüşen iki Gauss pikinin (b) 1-4. türev spektrumları | 70 |
| Şekil 3.1. 50 µg mL ⁻¹ 'lik AT ve 5 µg mL ⁻¹ 'lik FH olacak şekilde seyreltilmiş Azosilin tablete ait absorbands spektrumu | 93 |
| Şekil 3.2. AT ve FH çalışma standart çözeltilerine ait absorbands spektrumu | 93 |
| Şekil 3.3. 50 µg mL ⁻¹ 'lik AT ve 5 µg mL ⁻¹ 'lik FH olacak şekilde seyreltilmiş Azosilin tablete ait 1. derece türev spektrumu | 94 |
| Şekil 3.4. 50 µg mL ⁻¹ 'lik AT ve 5 µg mL ⁻¹ 'lik FH olacak şekilde seyreltilmiş Azosilin tablete ait 2. derece türev spektrumu | 94 |
| Şekil 3.5. 50 µg mL ⁻¹ 'lik AT ve 5 µg mL ⁻¹ 'lik FH olacak şekilde seyreltilmiş Azosilin tablete ait 3. derece türev spektrumu | 95 |

| | |
|---|-----|
| Şekil 3.6. 50 µg mL ⁻¹ 'lik AT ve 5 µg mL ⁻¹ 'lik FH olacak şekilde seyreltilmiş Azosilin tablete ait 4. derece türev spektrumu..... | 95 |
| Şekil 3.7. AT ve FH çalışma standart çözeltilerine ait 1. derece türev spektrumu | 96 |
| Şekil 4.1. 500 µg mL ⁻¹ 'lik AT'ye ait kromatogram | 97 |
| Şekil 4.2. 40 µg mL ⁻¹ 'lik AT'ye ait kromatogram | 97 |
| Şekil 4.3. 50 µg mL ⁻¹ 'lik FH'ye ait kromatogram..... | 98 |
| Şekil 4.4. 20 µg mL ⁻¹ 'lik FH'ye ait kromatogram..... | 98 |
| Şekil 4.5. 500 µg mL ⁻¹ 'lik AT ve 50 µg mL ⁻¹ 'lik FH'ye ait kromatogram | 99 |
| Şekil 4.6. 500 µg mL ⁻¹ 'lik AT ve 50 µg mL ⁻¹ 'lik FH içeren Azosilin tablete ait kromatogram..... | 99 |
| Şekil 4.7. 40 µg mL ⁻¹ 'lik AT standardının plazma içerisindeki kromatogramı | 100 |
| Şekil 4.8. 20 µg mL ⁻¹ 'lik FH standardının plazma içerisindeki kromatogramı | 100 |
| Şekil 4.9. Plazma ortamında 50 µg mL ⁻¹ 'lik AT ve 5 µg mL ⁻¹ 'lik FH içeren Azosilin tablet çözeltisi için alınmış kromatogram..... | 101 |
| Şekil 4.10. Plazma ortamında standart ekleme yöntemiyle elde edilmiş kromatogram..... | 101 |
| Şekil 4.11. 30 µg mL ⁻¹ 'lik AT'ye ait 1. derece türev spektrumu (222 nm) | 102 |
| Şekil 4.12. 2,5 µg mL ⁻¹ 'lik AT'ye ait 1. derece türev spektrumu (222 nm) | 102 |
| Şekil 4.13. 50 µg mL ⁻¹ 'lik FH'ye ait 1. derece türev spektrumu (252,5 nm) | 103 |
| Şekil 4.14. 5 µg mL ⁻¹ 'lik FH'ye ait 1. derece türev spektrumu (252,5 nm) | 103 |
| Şekil 4.15. 50 µg mL ⁻¹ 'lik AT ve 5 µg mL ⁻¹ 'lik FH içeren Azosilin tablet çözeltisine ait 1. derece türev spektrumu | 104 |
| Şekil 4.16. YPSK ile çözücü ortamında, AT'nin standart çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi | 105 |
| Şekil 4.17. YPSK ile çözücü ortamında, FH'nin standart çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi | 105 |
| Şekil 4.18. YPSK ile plazma ortamında hazırlanan AT çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi | 105 |
| Şekil 4.19. YPSK ile plazma ortamında hazırlanan FH çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi | 105 |
| Şekil 4.20. AT standart çözeltilerinin 1. derece türev kalibrasyon eğrisi..... | 105 |
| Şekil 4.21. FH standart çözeltilerinin 1. derece türev kalibrasyon eğrisi | 105 |

TABLolar LİSTESİ

| | |
|--|-----|
| Tablo 2.1. Çeşitli yollardan alınan ilaçların emilim hızları | 17 |
| Tablo 2.2. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması..... | 19 |
| Tablo 2.3. Ters faz ve normal faz sıvı kromatografilerinin karşılaştırılması..... | 23 |
| Tablo 2.4. İlaç analizlerinde yöntemlere göre değişen parametreler..... | 44 |
| Tablo 4.1. YPSK sisteminde, çözücü ortamında AT standart çözeltilerinden elde edilmiş istatistiksel analiz sonuçları (240 nm’de) (n=6) | 106 |
| Tablo 4.2. YPSK sisteminde, çözücü ortamında FH standart çözeltilerinden elde edilmiş istatistiksel analiz sonuçları (240 nm’de) (n=6) | 106 |
| Tablo 4.3. YPSK sisteminde, plazmalı ortamda AT standart çözeltilerinden elde edilmiş istatistiksel analiz sonuçları (240 nm’de) (n=6) | 106 |
| Tablo 4.4. YPSK sisteminde, plazmalı ortamda FH standart çözeltilerinden elde edilmiş istatistiksel analiz sonuçları (240 nm’de) (n=6) | 106 |
| Tablo 4.5. UV sisteminde, çözücü ortamında AT standart çözeltilerinden elde edilmiş istatistiksel analiz sonuçları (222 nm’de) (n=6) 1. türev..... | 106 |
| Tablo 4.6. UV sisteminde, çözücü ortamında FH standart çözeltilerinden elde edilmiş istatistiksel analiz sonuçları (252,5 nm’de) (n=6) 1. türev..... | 106 |
| Tablo 4.7. YPSK sisteminde, çözücü ortamında AT standart çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik analiz sonuçları (n=6) | 107 |
| Tablo 4.8. YPSK sisteminde, çözücü ortamında FH standart çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik analiz sonuçları (n=6) | 107 |
| Tablo 4.9. YPSK sisteminde, plazmalı ortamda AT standart çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik analiz sonuçları (n=6) | 108 |
| Tablo 4.10. YPSK sisteminde, plazmalı ortamda FH standart çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik analiz sonuçları (n=6) | 108 |
| Tablo 4.11. UV sisteminde, çözücü ortamında AT standart çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik analiz sonuçları (n=6) | 108 |

| | |
|--|-----|
| Tablo 4.12. UV sisteminde, çözücü ortamında FH standart çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik analiz sonuçları (n=6) | 109 |
| Tablo 4.13. YPSK sisteminde, çözücü ortamında, AT ve FH standart çözeltilerinin geri kazanım değerleri | 110 |
| Tablo 4.14. UV sisteminde, çözücü ortamında, AT ve FH standart çözeltilerinin geri kazanım değerleri | 110 |
| Tablo 4.15. YPSK sisteminde, plazmalı ortamda, AT ve FH standart çözeltilerinin geri kazanım değerleri | 111 |
| Tablo 4.16. YPSK sisteminde, çözücü ortamında, standart ekleme yöntemi ile elde edilmiş analiz sonuçları | 111 |
| Tablo 4.17. UV sisteminde, çözücü ortamında, standart ekleme yöntemi ile elde edilmiş analiz sonuçları | 112 |
| Tablo 4.18. YPSK sisteminde, plazmalı ortamda, standart ekleme yöntemi ile elde edilmiş analiz sonuçları | 112 |
| Tablo 4.19. YPSK yönteminde, çözücü içerisinde ve plazma ortamında hazırlanmış ticari preparatlar için ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$ AT, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ FH) elde edilen t-testi verileri ($\alpha=0,05$, % 95 güvenle) (n=6)..... | 113 |
| Tablo 4.20. YPSK yönteminde, çözücü içerisinde ve plazma ortamında hazırlanmış ticari preparatlar için ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$ AT, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ FH) elde edilen F-testi verileri ($\alpha=0,05$, % 95 güvenle) (n=6) | 114 |
| Tablo 4.21. YPSK yönteminde, çözücü içerisinde ve plazma ortamında hazırlanmış ticari preparatlar için ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$ AT, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ FH) elde edilen ANOVA testi verileri ($\alpha=0,05$, % 95 güvenle) (n=12)..... | 114 |
| Tablo 4.22. YPSK ve UV yönteminde, çözücü içerisinde hazırlanmış ticari preparatlar için ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$ AT, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ FH) elde edilen t-testi verileri ($\alpha=0,05$, % 95 güvenle) (n=6)..... | 115 |
| Tablo 4.23. YPSK ve UV yönteminde, çözücü içerisinde hazırlanmış ticari preparatlar için ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$ AT, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ FH) elde edilen F testi verileri ($\alpha=0,05$, % 95 güvenle) (n=6)..... | 116 |
| Tablo 4.24. YPSK ve UV yönteminde, çözücü içerisinde hazırlanmış ticari preparatlar için ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$ AT, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ FH) elde edilen ANOVA testi verileri ($\alpha=0,05$, % 95 güvenle) (n=12) | 116 |

ÖZET

Anahtar kelimeler: Ampisilin Trihidrat, Fenazopiridin Hidroklorür, Azosilin Tablet, Ters Faz-Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi, UV-GB Spektroskopisi, Validasyon

Bu çalışmanın amacı; aynı tablet formu (Azosilin tablet) içerisinde bulunan ampisilin trihidrat (AT) ve fenazopiridin hidroklorür (FH) etken maddelerinin her ikisinin bir arada miktar tayini için, bir Ters Faz-Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (TF-YPSK) yöntemi ile bir UV-GB spektrofotometrik yöntemi geliştirmektir.

Bu maksatla; 0,01 N HCl çözücü ortamında farmasötik preparattan AT ve FH'nin aynı anda belirlenmesi için 1. türev spektrofotometrisi (¹D) ve bir Ters Faz-Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (TF-YPSK) yöntemi olmak üzere iki yöntem kullanılmıştır. Geliştirilen YPSK yöntemi AT ve FH'nin insan plazması içerisinde in vitro olarak eş zamanlı miktar tayinini gerçekleştirmede de kullanılmıştır. Plazma örnekleri ekstraksiyon işlemine gerek kalmadan TF-YPSK sisteminde analiz edilmiş ve oldukça yüksek geri kazanımlar elde edilmiştir.

Her iki çalışmadan elde edilen verilere tüm validasyon parametreleri uygulanarak, yöntemin güvenilirliği test edilmiştir. Geliştirilen HPLC yöntemi ve UV spektrofotometrik yöntemden elde edilen sonuçlar Anova, Student-t ve Fischer-F testleri uygulanarak istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve iki yöntem arasında ortalamalar ve standart sapmalar yönünden % 95 olasılık düzeyinde anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur.

QUANTITY ANALYSIS OF AMPICILLIN TRIHYDRATE AND PHENAZOPYRIDINE HYDROCHLORIDE WITH CHROMATOGRAPHIC AND DERIVATIVE SPECTROPHOTOMETRIC METHODS

SUMMARY

Key Words: Ampicillin Trihydrate, Phenazopyridine HCl, Azosilin Tablet, Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography, UV-Vis. Spectroscopy, Validation

The aim of this study is to develop a Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) method and a UV-Vis. spectrophotometric method for simultaneous determination of ampicillin trihydrate (AT) and phenazopyridine HCl (PH) in the same tablet preparation (Azosilin pharmaceutical tablet).

For this purpose AT and PH quantities were determined simultaneously in 0,01 N HCl media in pharmaceutical preparation using first derivative spectrophotometry (¹D) and Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) method. Also the developed HPLC method was applied for the simultaneous determination of AT and PH in-vitro in human plasma. Plasma samples were analyzed using RP-HPLC system without any need for extraction process and obtained good recoveries.

Method validity was checked by applying all validation parameters to data obtained in both studies. Obtain results from UV spectrophotometric and HPLC method were compared by statistically with Anova, Student-t and Fischer-F test. No significant difference was not found between two methods in 95 % probability level by average and standard deviation.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

1.1. İlaç

İlaç, canlı hücre üzerinde meydana getirdiği tesir ile bir hastalığın teşhisini, iyileştirilmesi veya belirtilerinin azaltılması amacıyla tedavisini veya bu hastalıktan korunmayı mümkün kılan, canlılara değişik uygulama yöntemleri ile verilen hayvansal, bitkisel, mineral veya sentetik kaynaklardan elde edilen doğal, yarı sentetik veya sentetik kimyasal preparatlardır [1]. Dünya Sağlık Örgütü tanımıyla ilaç, fizyolojik sistemleri veya patolojik durumları insanın yararı için değiştirmek veya incelemek amacıyla kullanılabilen bir maddedir [2].

İlaçlar etken madde ve taşıyıcı madde olmak üzere iki kısımdan oluşur. Etken madde; canlıda fizyolojik etki gösteren bir veya birkaç kimyasal madde karışımıdır. Taşıyıcı madde ise; etken maddenin hasta tarafından kolay alınabilmesi veya iyi doze edilebilmesi için katılan fizyolojik etkisi olmayan kimyasal maddelerdir; glukoz, parafin, gliserin vb [1].

Verilen herhangi bir ilacın etkisi; hastaya, ilacın dozuna, verilen ilacın izlediği yola ve ilacın metabolizmasına bağlı olarak değişir. Doğrudan dokuya uygulanan ilacın tatbik edildiği bölgede meydana getirdiği tesire lokal etki denir. İlaç herhangi bir yolla vücuda alındıktan sonra, kana geçerek etki edeceği yere gider. Sistemik etkide birçok organ etkilenir, üstelik bir organa olan etkisi, diğer organa göre daha fazla olabilir [3].

Vücudun ilacı ortadan kaldırmak üzere kullandığı iki yöntem vardır; birincisi ilacın dışarı atılması, diğeri ise ilacın aktif olmayan bir hale dönüştürülmesidir. İlaçların vücuttan atılımı, akciğerler veya böbrekler yoluyla gerçekleşmektedir. Genel anesteziye kullanılan gazlar ve buharlaşabilen sıvılar akciğerlerden dışarı atılırlar.

Alınan alkolün belirli bir oranı da akciğerlerden dışarı atılır. Böbrek yetmezliğinden kaynaklanan nedenlerle ilacın vücuttan atılması daha yavaşlayabilir. İlacın vücuttan atılımının ikinci yolu ise ilacın aktif olmayan (inaktif) bir hale dönüştürülmesidir. Metabolik reaksiyonların büyük bir kısmı karaciğerde gerçekleşmektedir ve ilaçların inaktif hale getirilmesi de karaciğerde olmaktadır. Karaciğer yetmezliğinde ilacın inaktif hale getirilmesi de aksar [4].

1.1.1. İlaçların sınıflandırılması

İlaçlar iki şekilde sınıflandırılırlar:

1.1.1.1. Farmasötik şekillerine göre ilaçların sınıflandırılması

A. Katı ilaç şekilleri

1. Tozlar
2. Granüller
3. Mikropelletler
4. Mikropartiküller
5. Pastiller
6. Tabletler
 - a. Kapsız tabletler
 - b. Kaplı tabletler
 - c. Efervesan tabletler
7. Drajeler
8. Kapsüller

B. Sıvı ilaç şekilleri

1. Çözeltiler
 - a. Aromatik sular
 - b. Şuruplar
 - c. Posyonlar
 - d. Elikşirler
 - e. Kollutuarlar

C. İki fazlı sistemler

1. Süspansiyonlar
2. Emülsiyonlar
3. Gliseroller
4. Linimentler
5. Musilajlar

D. Yarı katı ilaç şekilleri

1. Merhemler
2. Suppozituarlar
3. Ovuller
4. Jeller

E. Aerosoller

1. Çözelti
2. Süspansiyon
3. Emülsiyon
4. Yarı katı sistemler
5. Katı sistemler

F. Parenteral preparatlar

1. Enjeksiyon yolu ile verilenler
 - a. Çözeltiler (tek doz, çok doz, büyük hacim)
 - b. Süspansiyon
 - c. Emülsiyon
 - d. Kuru toz (yeniden yapılandırmak için)
2. İmplantlar, pelletler

G. Radyofarmasötikler

H. Kontrollü salım sistemleri

1. Nano ve mikropartiküller
2. Lipozomlar

3. Transdermal sistemler
4. Vajinal sistemler
5. Tabletler (Matriks, sisme kontrollü, mukozaya yapışan)
6. Mini pompalar
7. Oküler sistemler
8. Nasal sistemler
9. Rektal sistemler

I. Diğer preparatlar

1. Göz preparatları
2. Kulak preparatları
3. Burun preparatları

İ. Pansuman ve cerrahi malzemeler

1. Flasterler
 - a. Etkin madde içeren flasterler
 - b. Etkin madde içermeyen flasterler
 - c. Yakılar
2. Pansuman ve cerrahi malzemeler

1.1.1.2. Tedavi edici gruplarına göre ilaçların sınıflandırılması

A. Antibiyotikler ve diğer kemoterapötikler

1. Beta-laktam antibiyotikler: penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler, monobaktamlar
2. Makrolid ve linkozamid antibiyotikler
3. Tetrasiklinler
4. Amfenikoller
5. Aminoglikozidler
6. Antistafilokokal ilaçlar
7. Antianaerobik ilaçlar
8. Polipeptid yapılı antibiyotikler
9. Sülfonamidler, ko-trimoksazol ve trimetoprim

10. Fluorokinolonlar
11. Antifungaller
12. Antitüberküloz ilaçlar
13. Lepraya karşı kullanılan ilaçlar
14. Üriner enfeksiyon tedavisine özgü ilaçlar
15. Antiamibik ve diğer antiprotozoal ilaçlar
16. Antimalaryal ilaçlar
17. Antihelmintik ilaçlar
18. Ektoparazitlere karşı kullanılan ilaçlar
19. Antiviral ilaçlar
20. Antiseptikler ve dezenfektanlar
21. Antineoplastik ilaçlar
22. İmmünomodülatör ilaçlar

B. Kalp-damar sistemi ilaçları

1. Antihipertansif ilaçlar
2. Periferik vazodilatörler
3. Antianjinal ilaçlar
4. Antiaritmik ilaçlar
5. Kalp yetmezliğine karşı kullanılan ilaçlar
6. Hipolipidemik ilaçlar
7. Antitrombotik ilaçlar: antikoagülan, antitrombositik ve trombolitik ilaçlar
8. Hemostatik ilaçlar ve replasman için kullanılan hemostatik kan ürünleri
9. Plazma hacmini genişleten solüsyonlar, kan ve plazma ürünleri

C. Su-tuz ve asit- baz dengesini etkileyen ilaçlar ve diüretikler

D. Solunum sistemi ilaçları

1. Antitusif ilaçlar
2. Ekspektoran ilaçlar
3. Sürfaktanlar
4. Bronkodilatör ilaçlar ve diğer antiastmatik ilaçlar
5. Oksijen ve diğer tedavi gazları

E. Santral sinir sistemini etkileyen ilaçlar

1. Genel anestezipler
2. Lokal anestezipler
3. Nöromüsküler bloke edici ilaçlar
4. Santral etkili kas gevşeticiler
5. Hipnosedatifler
6. Nöroleptik ilaçlar
7. Antidepresan ve antimanik ilaçlar
8. Narkotik analjezikler
9. Narkotik olmayan analjezikler
10. Antiepileptik ilaçlar
11. Parkinson hastalığının ve diğer hareket bozukluklarının tedavisinde kullanılan ilaçlar

F. Endokrin sistemi etkileyen ilaçlar

1. İnsülin, oral antidiyabetik ilaçlar ve diğerleri
2. Kortikosteroidler, kortikosteroid antagonistleri ve ACTH
3. Tiroid ilaçları: tiroid hormonları, antitiroid ilaçlar, tirotropin ve protirelin
4. Kalsiyotropik ilaçlar: paratiroid hormonu, D vitamini, kalsitonin
5. Androjenler, anabolik steroidler ve antiandrojenik ilaçlar
6. Estrojenler, projestinler ve antagonistleri ve hormonal kontraseptifler
7. Hipofiz ve hipotalamus hormonları

G. Otakoidler ve antihistaminikler

H. Vitaminler, mineraller ve kombinasyonları

I. Antianemik ilaçlar

İ. Sindirim sistemi ilaçları

1. Peptik ülser tedavisinde kullanılan ilaçlar
2. Laksatif ve pürnatifler
3. Antidiyareik ilaçlar

4. Antiemetik ilaçlar
5. Dijestanlar
6. Koleretik ve kolagog ilaçlar
7. Antispazmodikler
8. Antikolinesterazlar

J. Dermatolojik ilaçlar [5].

1.2. Antibiyotikler

Antibiyotik sözcüğü, Yunanca ‘anti’ ve ‘bios’ sözcüklerinden oluşmaktadır. Antibiyotik “yaşam karşıtı” anlamına gelmektedir. Antibiyotik, bir mikroorganizma (bakteri, mantar, virüs vb.) tarafından, başka bir mikroorganizmayı öldürmek veya çoğalmasını durdurmak için üretilen her türlü maddedir. Antibiyotiklerin %90’ı bakteriler tarafından üretilmekteyse de, bazı sentetik antibiyotiklerde üretilmiştir [6,7].

Antibiyotik kullanımı eski çağlara kadar uzanmaktadır. 2500 yıl önce Çin’de ayakta oluşan yaraların iyileştirilmesinde özellikle küflendirilmiş ayakkabıların giydirilmesi ya da küflendirilmiş soya fasulyelerinin kullanılması aslında iyileşmeyi küflerden açığa çıkan antibiyotiklerin sağladığını açıkça göstermektedir [8,9].

1800’lü yıllarda antibiyotiklere ilişkin çalışmalar yapılmıştır. Arsenamin, ilk keşfedilen antibiyotik olmakla birlikte frengi tedavisinde kullanılmıştır. Paul Ehrlich, bu ilaç sayesinde Nobel ödülüne layık görülmüştür. Bu ilacın ciddi, hatta ölümcül yan etkileri sebebiyle insanlar üzerinde yarardan çok zararı olmuştur. Sülfanilamin, sülfonamid grubundan olup, keşfi de hemen hemen aynı yıllara denk gelmektedir. Mikroorganizmaların sağaltımında yararlanılabilecek bir klinik potansiyele sahip olabileceklerini gözlemlerine dayanarak ilk kez düşünen Pasteur ve Joubert olmuştur. Havadaki bakterilerle kirlenmiş insan idrarında üreyemeyen şarbon basillerinin steril idrarda kolayca üreyebildiklerini gözlemleyen araştırmacılar, patojen olmayan bakterilerle karşılaştırılarak deney hayvanlarına bulaştırılan patojen şarbon basillerinin, enfeksiyona yol açmadıklarını da göstermişlerdir. Gözlemlerini ve

sonuçlarını 1877 yılında yayımlayan Pasteur ve Joubert, enfeksiyonların antibiyotik maddelerle sağaltımı alanındaki ilk umut ışıklarını oluşturmuşlardır. Antibiyotiklerle ilgili olarak 1881 yılında Tyndal tarafından yapılan bir çalışmada Tyndal, bakteriyel üreme sonucu bulanıklığı artan bir kültür ortamına küfün kontamine olduğu durumda, bakteriyel bulanıklığın yok olduğunu gözlemiş ve rapor etmiştir [10,11].

Ancak antibiyotik konusunda en önemli gelişme, 1929 yılında İngiliz doktoru Alexander Fleming'in penisilini keşfetmesiyle gerçekleşir. Fleming, stafilokok bakterisi ile çalışırken, bakterinin üretildiği besiyeri içine havadan tesadüfen düşmüş olan *Penicillium notatum* adlı bir küf kolonisinin, bakterinin üremesini engellediğini görmüştür. Fleming ve arkadaşları bu çalışmayı genişleterek, yüksek oranda antibiyotik elde etmeyi başarmışlardır ve bunların büyük bir kısmı klinikte kullanım alanı bulmuştur [12,13].

Bütün bakterilerde yavaş gelişme, hızlı gelişme ve dinlenme dönemlerinden oluşan üç çoğalma devresi vardır. Antibiyotikler, bakterilerin yavaş ve hızlı gelişme dönemlerinde, mikroorganizmaları öldürme (bakterisit etki, biyosidal) veya mikroorganizmaların büyümesini ve üremesini durdurma (bakteriostatik etki, biyostatik) şeklinde etki gösterirler [14,15].

Pek çok bakteri türüne etki eden antibiyotiklere geniş spektrumlu antibiyotikler denir. Bu antibiyotiklerin sakıncası, yararlı veya zararsız bakterileri de öldürme eğiliminde olmalarıdır. Dar spektrumlu antibiyotikler ise; belirli bir bakteri grubuna etki eden antibiyotiklerdir. Bu antibiyotikler, diğer yararlı veya zararsız bakterilere saldırmadıkları için, tedavilerde kullanılmak üzere en uygun antibiyotiklerdir [16].

Beta-laktam grubu antibiyotikler, "beta-laktam" halkası olarak adlandırılan ortak kimyasal molekülleri ile diğer antibiyotiklerden ayırdedilen ve günümüzde en yaygın kullanılan antibiyotik grubudur. 1949 yılında penisilin G'nin geliştirilerek, klinik kullanıma sunulmasını takip eden yıllarda geliştirilen yeni beta-laktam grubu antibiyotiklerin tümü, ortak molekül olan beta laktam halkasına bağlı aminoasitler üzerinde yapılan çeşitli modifikasyonlar sonucunda şekillendirilmiştir [17]. Beta-laktam antibiyotikler, yan etkileri az olduğundan ve bakterisit olmaları nedeniyle

günümüzde en sık kullanılan antibiyotik grubudur [18]. Beta laktam grubu antibiyotikler; penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar, karbapenemler, beta-laktamaz inhibitörleri olmak üzere 5 gruba ayrılırlar [19,20].

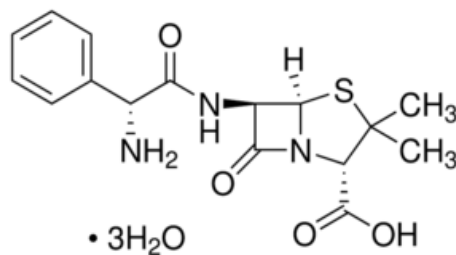
Penisilin ilk bulunan antibiyotik olduğundan ve yeni türevlerinin çok kısa aralıklarla tıbbi kullanıma sunulmasından dolayı, en çok kullanılan antibiyotik grubudur. Güçlü bakterisit etkiye sahip olmaları, toksisitelerinin az olması, tüm vücuda dağılım gösteren iyi farmokokinetik özellikleri, etkin sonuçlar oluşturması, ucuz olması gibi özellikleri pek çok enfeksiyon tedavisinde ilk sırada tercih edilmesine yol açmıştır. Penisilinler, doğal ve yarı sentetik penisilinler olmak üzere 2 grupta incelenirler. Sentetik penisilinler karboksipenisilinler (karbenisilin), penisilinaz dayanıklı penisilinler (metisilin) ve aminopenisilinlerdir (ampisilin) [21].

1.2.1. Ampisilin trihidrat

İlk sentezi Doyle ve arkadaşları tarafından 6-aminopenisillanik asitten (6-APA) hareketle ve “aktif anhidrid” yöntemi kullanılarak yapılan ampisilin, 1961 yılında “penbritin” adıyla tedaviye girmiştir [22].

1972 yılında ilk olarak MacLeod ve arkadaşları, aynı miktar ampisilin içeren üç ayrı kapsül müstahzarının biyoyararlanımlarının eşit olmadıklarını göstermişlerdir. Bu farklılık nedeniyle ampisilin klinik kullanımda yeterli etkinliği sağlayamayacağı düşünülmüş ve ampisilin üzerinde biyoyararlanım çalışmaları hız kazanmıştır [23].

Ampisilin Dünya Sağlık Örgütü'nün Temel İlaçlar Listesi'nde, bir temel sağlık sisteminde ihtiyaç duyulan en önemli ilaçlar listesindedir [16].



Şekil 1.1. Ampisilin trihidrat (AT)'in molekül yapısı

Ampisilin trihidratın kimyasal (IUPAC) ismi: (2S,5R,6R)-6-[[[(R)-2-amino-2-phenylacetyl]amino]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid trihydrate (Şekil 1.1.) [24].

Fiziksel ve kimyasal özellikleri: Beyaz, kristalize, kokusuz, acı bir tozdur. Ampisilin trihidratın molekül formülü $C_{16}H_{19}N_3O_4S \cdot 3H_2O$, molekül ağırlığı $403,45 \text{ g mol}^{-1}$ ve erime noktası 208°C şeklindedir [25].

Ampisilin Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere etkin, geniş spektrumlu, doğada asidik olarak bulunan, aside karşı kararlı, penisilin grubu yarı sentetik bir β -laktam antibiyotiktir [26].

Ampisilin anhidre şekli, sodyum tuzu, ampisilin trihidrat, ampisilin monohidrat, ampisilin seskihidrat adlı farklı oranda kristal suyu içeren şekilleri tanımlanmıştır. Ampisilin anhidrat ve trihidrat formları düzgün bir kristal yapıya sahiptir ve oral tedavide ampisilin bu iki formu da kullanılır. Anhidrat ampisilin, sulu çözeltiden; 60°C 'nin üstündeki, ampisilin trihidrat ise 50°C 'nin altındaki sıcaklıklarda elde edilir [27].

Ampisilin, diğer penisilin ilaçlarında olduğu gibi, nispeten toksiktir ve doğaya ciddi olumsuz etkilerine nadiren rastlanır. Bağırsaklardan emilebilmesi, çeşitli bakteri cinslerine etkili olabilmesi ve yan etkilerinin az olması nedeni ile çok kullanılan bir penisilindir [28,29].

Ampisilin temel yapısını β -laktam halkasına bağlanmış, bir tiazolidin halkası oluşturur. Yan zincir, bu bileşiğin antibakteriyel ve farmakolojik özelliklerini belirler. Yan zincir α -karbon atomunda, bir amino grubunun bulunması bu antibiyotiği asit ortamda kararlı kıldığından, parenteral yolla olduğu kadar oral yolla da yaygın olarak kullanımına neden olmuştur. Yan zincirinde bulunan asimetric karbon atomu nedeniyle 2 optik izomeri olan bileşiğin D-izomeri, L-izomerinden daha aktif olduğu için tedavide kullanılan şekli D-izomeridir [30,31].

Ampisilin'in nötral çözeltilerde ve katı halde "zwitter iyon" halinde bulunduğu, amin ve karboksilli asit grupları nedeniyle de amfoter özellik gösterdiği bildirilmiştir. Ampisilin'in değişik pH'lardaki davranışlarını inceleyen Hou ve Poole, bu nötral iyonun asidik ortamda katyon, bazik ortamda ise anyon haline dönüştüğünü belirlemişlerdir. Ampisilin'in ayrıca asit ortamda ve amidaz enzimi etkisiyle 6-APA'ya dönüştüğü ve bu suretle inaktive olduğu bildirilmiştir [32-34].

Ampisilin'in biyoyararlanımı çok düşüktür. Ampisilin oral alımdan sonra %30 oranında emilir ve gıdalarla emilimi azalır. Ampisilin'in vücuda dağılımı iyidir. Ampisilin, vücut doku ve sıvılarının çoğuna kolaylıkla yayılır. Beyin ve beyin-omurilik sıvısına geçebilmesi ancak meninksler iltihaplı olduğunda mümkündür. Ampisilin büyük oranda değişmeden böbreklerden atıldığı için idrardaki konsantrasyonu yüksektir. Safraya geçer ve safrada serum konsantrasyonundan daha yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Proteine bağlanma oranı düşük olup yaklaşık %20 oranındadır [35-37].

Çözünürlük: Soğuk su içinde az çözünür (1/50 oranında), aseton, etanol ve yağlar içerisinde hemen hemen hiç çözünmez. Asitlerin ve alkali hidroksitlerin seyreltik çözeltilerinde çözünür.

Depolama: Işıktan korunan, sıkıca kapalı bir kaptaki tutulmalıdır. Işık olmasa bile ampisilin nemli bir atmosfere maruz kaldığında yavaş yavaş bozulur, bozulma yüksek sıcaklıklarda daha hızlı olur [38].

Tıbbi kullanım: İdrar yolu enfeksiyonları, kulak enfeksiyonları, solunum yolu enfeksiyonları, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, zatürre, gonore, bakteriyel menenjit, bakteriyel endokardit, *E.coli* veya *Salmonella* enfeksiyonları gibi bakterilerin sebep olduğu birçok farklı türdeki enfeksiyonun tedavisinde kullanılır [39].

Etki mekanizması: Ampisilin'in etki mekanizması benzilpenisilinlerin etki mekanizmasına benzer. Ancak aminopenisilin grubunda yer alan ampisilin molekülünde, penisilin yapısına bir amino grubu eklenmiş ve bazı Gram-negatif

bakterilerin hücre duvarlarından daha kolaylıkla geçmesi sağlanarak benzilpenisilinlere göre etki spektrumu genişletilmiştir. Ampisilin Gram-pozitif bakterilere de etki eder. Ampisilin, bakterilerin hücre duvarları için ihtiyaç duydukları transpeptidaz enziminin geri dönüşü olmayan bir inhibitörü olarak görev yapar [26].

Yan etkiler: Tüm antibiyotiklerde olduğu gibi bulantı, kusma, diyare, deri döküntüleri, kaşıntı, ürtiker görülebilir. Ancak ilacı yarıda bıraktıracak kadar ciddi yan etkileri çok enderdir.

1.3. Analjezikler

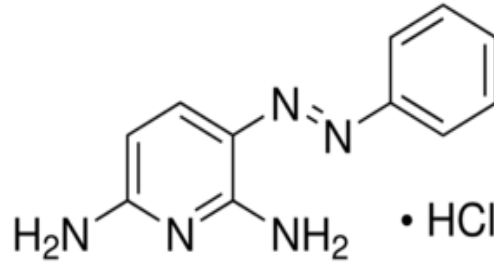
Tarihin en eski ve üzerinde en fazla çalışılmış problemlerinden biri ilaç kullanarak ağrıdan kurtulmaktır. İnsanlar en eski medeniyet çağlarından beri ağrıyı dindirmek için bitkilerden elde ettikleri maddeleri kullanmışlardır [40].

Ağrıya olan değiştirilmiş davranış cevabı ve bilinç kaybı olmaksızın ağrı impluslarının engellenmesi veya azaltılmasıyla karakterize durum analjezi olarak tanımlanabilir. Merkezi sinir sistemindeki etkileri ile ağrının algılanmasını engelleyen veya azaltan ilaçlar analjezik ilaçlar olarak bilinmektedir. Yunanca an- (olmadan) ve -algia (ağrı) kelimelerinden türemiştir.

Analjezikler merkezi sinir sisteminde ağrı algılanmasını değiştiren ilaçlar (morfin), periferik mekanizmalarla ağrıyı önleyen ilaçlar (aspirin), lokal anestezi ilaçlar (novokain, fenazopiridin) olmak üzere üçe ayrılır [41].

1.3.1. Fenazopiridin hidroklorür

Fenazopiridin Bernhard Joos, Cilag'ın kurucusu tarafından keşfedildi. 1928 yılında USP (Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi) tarafından kabul edildi [42].



Şekil 1.2. Fenazopiridin hidroklorür (FH)'ün molekül yapısı

Fenazopiridin hidroklorür'ün kimyasal (IUPAC) ismi: 3-phenyldiazenylpyridine-2,6-diamine hydrochloride (Şekil 1.2.) dir [43].

Fiziksel ve kimyasal özellikleri: Hafif mor bir parlaklığa sahip tuğla kırmızısı mikro kristalleri bulunan bir tozdur. Fenazopiridin hidroklorür'ün molekül formülü C₁₁H₁₁N₅.HCl, molekül ağırlığı 249,7 g mol⁻¹ ve erime noktası 235°C şeklindedir [44].

Fenazopiridin hidroklorür analjezik etkiye sahip bir kimyasaldır. Bu bileşik, aminopiridinler ve türevlerine aittir. Bunlar, piridin halkasına bağlı bir amino grubu içeren organik bileşiklerdir [45].

Fenazopiridin hidroklorür çok uzun süre boyunca klinik tedavilerde uygulanmış olmasına rağmen, bu ilacın insanlardaki farmakokinetiği üzerinde çok az bilgi mevcuttur [46].

Fenazopiridin mide-bağırsak sisteminden absorbe edilir ve çoğunlukla idrarla vücuttan atılır. Büyük oranda değişmeden böbreklerden atıldığı için idrardaki konsantrasyonu yüksektir [47].

Çözünürlük: Soğuk su ve etanol içinde az çözünür aseton, benzen, kloroform, dietil eter ve toluen hiç çözünmez. Kaynar suda, seyreltik asit çözeltilerinde, gliserol, etilen glikol ve propilen glikolde çözünür [44].

Depolama: Işıktan korunan, sıkıca kapalı bir kaptaki, kontrollü oda sıcaklığında (15 ve 30°C) tutulmalıdır. Işık olmasa bile fenazopiridin nemli bir atmosfere maruz kaldığında yavaş yavaş bozulur.

Tıbbi kullanım: Fenazopiridin idrar yolu enfeksiyonları, cerrahi işlemler veya yaralanmalar nedeniyle oluşan ağrı, yanma, tahriş veya rahatsızlığı hafifletmek için kullanılır. İdrar yolu enfeksiyonlarının tedavisi için sülfonamidler veya antibiyotikler ile kombine edilerek kullanılır. Fenazopiridin enfeksiyonları ya da yaralanmaları tedavi etmez, sadece ağrının semptomatik rahatlamasını sağlamak için kullanılan bir analjeziktir [47-50].

Etki mekanizması: Fenazopiridin'in mekanizması iyi bilinmemektedir ve vücut ile etkileşimi ile ilgili sadece temel bilgiler mevcuttur. Bu kimyasalın idrar yolu mukoza zarının üzerinde doğrudan lokal analjezik bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir [51-53].

Yan etkiler: Fenazopiridin baş ağrısı, mide veya baş dönmesine neden olabilir. Nadiren deri veya gözlerin bir pigment değişimine sebep olabilir. İdrar ve lens renklerini turuncu-kırmızımsı renge dönüştürür, bu etkisi zararsızdır. Bu ilacı alırken kontakt lens kullanmaktan kaçınılmalıdır [54].

1.4. Azosilin Tablet

Her bir tablet, 500 mg ampisiline eşdeğer ampisilin trihidrat, 50 mg piridyum (fenazopiridin hidroklorür) ve nane aroması içerir.

İlacın bileşiminde bulunan ampisilin bakterilerde hücre duvarı sentezini inhibe ederek bakterisit etki gösterir. Fenazopiridin ise üriner sistem mukozası üzerine yüzeysel analjezik etki gösterir.

Azosilin, ampisiline duyarlı mikroorganizmaların etken olduğu alt üriner sistem enfeksiyonlarında endikedir. İlacın bileşiminde bulunan fenazopiridin, enfeksiyon

nedeniyle üriner sistem mukozasının irritasyonuna bağlı sık idrara çıkma, ağrı ve yanma gibi belirtilerin semptomatik tedavisini sağlar.

Azosilin tabletin üretim yeri; Avis İlaç San. ve Tic. A.Ş.Tuzla / İstanbul (Yavuz İlaç Ecza Deposu Medikal Ürünler San. ve Tic. A.Ş.)'dur [55].

BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyoeşdeğerlik

Jenerik ilacın orijinal ilaç ile aynı etken maddeyi, aynı miktarda ve aynı farmasötik formda içermesi ve aynı yoldan uygulanır olmasıdır. Kana geçiş hızları ve kana geçen miktarları belli sınırlar içinde aynı olan ilaçlar biyoeşdeğer kabul edilmekte ve orijinal ilaç ile jenerik ilaç bu kapsamda karşılaştırılarak, biyoeşdeğer olup olmadıkları saptanmaktadır [56].

2.2. Biyoyararlanım

Bir ilacın, ilacı kullanan canlıda sistematik dolaşıma geçen miktarı veya bu değer yüzde olarak ifadelendirilmesidir ve sistematik etki yapması açısından bir ilaçtan vücudun ne kadar yararlandığının somut bir ölçüsüdür [57].

Oral veya emilmenin söz konusu olduğu diğer bir yolla ilaç etken maddesi vücuda verildiğinde, farmasötik şekilde yer alan etken maddenin emilme oranı (miktar) ve emilme hızıdır [58].

İlaçların emilim hızı ilacın veriliş yöntemiyle ilgilidir. Aynı dozda damar içine verilen bir ilaç, oral olarak kullanılan ilaçtan daha hızlı biyoyararlanım göstermekle beraber doğrudan doğruya kan sıvıları ve vücut dokularının bazılarına şırınga ile verilen ilaç, en hızlı şekilde etkiyi yapmaktadır [57]. Çeşitli yollardan alınan ilaçların emilim hızları Tablo 2.1.'de verilmiştir.

Biyoyararlanım standartlarının ve testlerinin temel amacı, önerilen ilacı alan bir hastanın, gerçekten önerilen ilacı, önerilen dozda ve önerilen sınırlar içerisinde aldığından emin olmaktır [59].

Tablo 2.1. Çeşitli yollardan alınan ilaçların emilim hızları

| Alındığı Yol | Etkisinin ortaya çıktığı zamana kadar geçen süre |
|----------------|--|
| Deriden | Değişken |
| Ağızdan | 30 – 90 dk |
| Cilt altı | 15 – 30 dk |
| Kas içi | 10 – 20 dk |
| Dilaltı tablet | 3 – 5 dk |
| Solunum | 3 dk |
| Damar yolu | 30 – 60 saniye |
| Kalp içine | 15 saniye |

2.3. Kromatografi

Kromatografinin ilk kez 1900' lerin başında Rus botanikçi Michael Tswett tarafından geliştirildiği ve kullanıldığı kabul edilir [60]. Tswett, cam bir kolonda, CaCO_3 adsorbantı üzerinden bitki ekstresinin petroleterli çözeltilisini geçirmiş ve kolonda sarı, yeşil bantlarla bir ayırma işleminin olduğunu görmüştür. Bu alandaki ilk yayınların Rusça olması nedeni ile diğer araştırmacıların ilgisini çekerek gelişme sağlaması 1930'lu yılları bulmuştur.

Kromatografi, bir örnekte karışım halinde bulunan kimyasal bileşenlerin ayrılması, tanınması ve tayini için kullanılan analitik bir yöntemdir. Kromatografi ile ayrılan maddeler teşhis edilebilirler, izole edilebildikleri için de bu, aynı zamanda bir saflaştırma yöntemidir. Başka bir ifade ile ayrılan maddelerin teşhislerini ve miktar tayinlerini mümkün kıldığı için kromatografi, kalitatif ve kantitatif tayin yöntemidir. Kromatografik yöntemlerle, kimyasal ve fiziksel özellikleri birbirine çok yakın bileşenlerden oluşan karışımları, tümüyle, kolayca ve kısa sürede ayırmak olanaklıdır.

2.3.1. Kromatografi'nin temel prensibi ve tanımları

Durgun faz: Sabit faz, katı veya (katı destek üzerine emdirilmiş bir) sıvıdır. Mobil faz içerisinde gelen örneğe ait bileşenlerin etkileşime girdikleri ve belirli ölçüde

alıkonuldukları fazdır. Bileşenler kendi hızları ile hareket ederken yavaşlatıcı güç olarak etki eder.

Mobil faz: Hareketli faz, sıvı veya gaz olabilir. Sabit faz üzerinde hareket ederek numune bileşenlerini, kolon (sabit faz) boyunca taşıyan ve ayrılmalarını sağlayan itici güçtür. Sabit fazdan veya kolondan kesintisiz olarak geçirilen çözücüdür.

Karışımı (numune) oluşturan bileşenler: Karışımı oluşturan bileşenler, birbiri ile karışmayan iki faz (durgun-mobil) arasında farklı göç sergiler ve böylece birbirlerinden ayrılabilirler. Mobil fazın içerisinde yer alan bileşenler, sabit faza ait dolgu maddesiyle etkileşmeleri sebebiyle, bir miktar tutulurlar. Bu tutulma, örnekteki farklı bileşenler için farklı miktarlarda olur. Böylece bileşenler sabit fazın sonlarına doğru, farklı hızlarda ilerledikleri için, birbirinden ayrılmış vaziyette sabit fazı farklı zamanlarda terkederler.

Alıkonma: Mobil faz içerisinde gelen, analizi yapılacak maddeye ait bileşenlerin sabit faz ile etkileşime girerek belirli oranda tutulması daha doğrusu yavaşlatılması ve böylece daha geç olarak sabit fazı terk etmesi olayıdır. Bu özellikten yola çıkılarak, belirli sabit analitik koşullar altında, her kimyasal madde için parmak izi niteliği taşıyan alıkonma zamanı (retention time) tanımı türetilmiştir. Bu kavram belirli sabit deneysel koşullarda analizi yapılan maddenin sabit fazı terk etmesi için geçen süreyi göstermektedir.

Kromatogram: Kolondan çıkan bileşenlerin derişimlerinin uygun bir yöntemle ölçülerek zaman veya hareketli fazın hacmine karşı çizilen grafiğine denir. Kromatografik analiz sonucunda elde edilen grafiktir. Y-ekseni, kullanılan dedektörün ölçtüğü fiziksel özelliği (absorbans, fluoresans, iletkenlik, akım, kırılma indisi vb.), X-ekseni ise zamanı göstermektedir (alıkonma zamanı için kolaylık olması bakımından genellikle dakika cinsinden). Zamana karşı Y-ekseninde ölçülen fiziksel özelliğin artıp tekrar azalması şeklinde oluşan pik şeklindeki eğrilerin herbiri analizlenen maddeye ait bir bileşeni göstermektedir. Bu piklere ait değerler (pik alanı, yüksekliği, vb.) kullanılarak kalitatif ve kantitatif analizler yapmak olasıdır.

Elüsyon: Bir kolondan sürekli taze çözücü geçirerek çözünmüş bileşenlerin yıkanarak taşınmasıdır.

Elüent: Durgun faz tarafından alıkonan analiti hareket ettirmek için kullanılan çözücüdür.

Ayırmayı etkileyen parametreler:

Kolon ile ilgili olanlar: türü, boyutları

Hareketli faz ile ilgili olanlar: türü, bileşimi, akış hızı

Ölçüm ile ilgili olanlar: dedektör türü, dalga boyu

Örnek ile ilgili olanlar: örnek derişimi, örnek hacmi

Sabit faz tarafından kuvvetli tutulan karışım bileşenleri, hareketli fazın akışıyla yavaş hareket ederken, sabit faz tarafından zayıf tutulan bileşenler, hızlı hareket ederler. Hızlardaki bu farklılık sonucu, numune bileşenleri birbirlerinden kalitatif veya kantitatif olarak analizlenebilen farklı bantlar veya bölgeler şeklinde ayrılırlar.

2.3.2. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması

Tablo 2.2. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması

| Sabit faz | Mobil faz | Uygulama Şekli | Dayandığı fiziksel prensip |
|-----------|-----------|-------------------------------|----------------------------|
| Katı | Sıvı | İTK, Kolon K. | Adsorbsiyon |
| Sıvı | Sıvı | İTK, Kolon K., Kağıt K., YPSK | Dağılma |
| Katı | Gaz | Gaz / Katı krom. | Adsorbsiyon |
| Sıvı | Gaz | Gaz / Sıvı krom. | Dağılma |

Ayrılma mekanizmalarına (dayandıkları prensiplere) göre sınıflandırma:

- Adsorbsiyon kromatografisi
- Dağılma kromatografisi
- İyon değıştirici kromatografisi
- Boyut eleme kromatografisi
- İyon çifti kromatografisi
- Afinite kromatografisi

Uygulama tekniğine göre sınıflandırma:

- a. Düzlemsel kromatografi
 - ince tabaka kromatografisi
 - kağıt kromatografisi
 - elektrokromatografi
- b. Kolon kromatografisi
 - gaz kromatografisi
 - yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
 - süperkritik akışkan kromatografisi

Faz tiplerine göre sınıflandırma:

- a. Sıvı kromatografisi
 - sıvı / katı kromatografisi
 - sıvı / sıvı kromatografisi
- b. Gaz kromatografisi
 - gaz / katı kromatografisi
 - gaz / sıvı kromatografisi

2.3.2.1. Ayrılma mekanizmalarına göre sınıflandırma

a. Adsorpsiyon kromatografisi:

Adsorpsiyon kromatografisi sıvı-katı yada gaz-katı kromatografisidir. Sabit faz polar, hareketli faz ise apolar veya çok az polardır.

Bileşenler birbirlerinden katı yüzeye olan farklı derecede ilgileri nedeniyle ayrılırlar. Adsorpsiyon denge sabiti, büyük olan bileşen kolonda daha uzun süre kalır. Ayrılacak bileşenin sabit fazla etkileşmesi dipol-dipol çekmeleri, Van Der Waals kuvvetleri veya hidrojen bağları sonucunda gerçekleşir. Polarlıkları farklı bileşenlerden oluşan karışımların ayrılmasında iyi sonuç verir. Polar maddeler polar, apolar maddeler ise apolar sabit faz tarafından daha fazla tutulurlar.

b. Dağılma (partisyon) kromatografisi:

Dağılma kromatografisi sıvı-sıvı kromatografisidir.

Ayrılacak bileşenler, sabit faz ve hareketli faz arasında dağılma katsayılarına bağlı olarak dağılırlar, sabit faz ve hareketli faz karışmamalı, birbirlerini çözmemeli ve polarlıkları farklı olmalıdır. Bu dağılım farklı oranda göçe neden olur ve ayırım gerçekleşir [61-63]. Durgun fazda çözünürlüğü yüksek olan bileşen kolonda daha uzun süre kalır. Düşük ve orta mol kütleli, iyonik olmayan polar moleküllerin bu yöntemle analizi gerçekleştirilir.

Dağılma kromatografisinde Nerst'in dağılma katsayısı geçerlidir. Nernst'e göre; "bir biri ile karışmayan iki sıvı madde karışımında çözünen üçüncü bir maddenin iki ayrı sıvı fazdaki konsantrasyonunun birbirine oranı sabittir (2.1.) ."

$$K = C_s / C_M \quad (2.1.)$$

K : Dağılma (partisyon) katsayısı

C_s : Maddenin sabit fazdaki konsantrasyonu

C_M : Maddenin mobil fazdaki konsantrasyonu

K değeri büyük ise sabit fazdaki konsantrasyon, mobil fazdakinden daha fazladır. Molekül sabit fazda daha uzun süre kalıyor anlamına gelir.

YPSK ile ilaç analizi yapabilmek için yaygın olarak dağılma kromatografisi uygulanır. Bu kromatografi türünde uygun bir analiz yapabilmek için maddenin belli bir çözücüde çözülmüş olması gerekir. Maddenin apolar veya polar olmasına göre maddenin polaritesine yakın bir sabit faz seçilir. Örneği oluşturan bileşenlerin iyi ayrılabilmesi için sabit faz ile hareketli faz polaritesi farklı olmalıdır.

Bu teknik sıvı-sıvı ve sıvı-bağlı faz kromatografi olmak üzere iki alt sınıfa ayrılabilir. İki teknik arasındaki fark, katı parçacıklar yüzeyine sabit fazın tutturulmasındaki metot farkından kaynaklanır. Sıvı-sıvı tekniğinde, sabit faz katı yüzeyine fiziksel

adsorpsiyonla; bağılı faz tekniğinde ise kovalent kimyasal bağlarla tutunur. Bağılı faz dolgu maddeleri, fiziksel olarak yüzeye tutturulmuş dolgulara göre daha kararlı olma gibi bir üstünlüğe sahiptir. Yüzeye fiziksel olarak tutturulan fonksiyonel gruplar, zamanla hareketli fazda çözünerek sürüklenebilir ve etkisizleştirilebilir. Bağılı faz dolgu maddelerinin sakıncası ise; biraz daha sınırlı numune kapasitesine sahip olmalarıdır [64].

Sabit faz ve hareketli faz polaritelerinin farklılığına göre dağılıma kromatografisi ters faz sıvı kromatografisi ve normal faz sıvı kromatografisi olmak üzere iki alt başlıkta incelenebilir:

Normal faz sıvı kromatografisi: Normal faz sıvı kromatografisinde sabit faz, mobil fazdan daha polardır. Polar sabit faz ve apolar veya düşük polariteye sahip hareketli fazdan oluşan kromatografi çeşididir. Silika veya alümina partiküller üzerine tutturulmuş su veya trietilenglikol gibi oldukça polar sabit faz, hareketli faz olarak ise hekzan, metilen klorür, kloroform, dietil eter ve bunların karışımı gibi nispeten az polar çözücüler kullanılır. Silika jelin üzerine kimyasal bağlarla $-CN$, $-NO_2$ veya $-NH_2$ gibi polar fonksiyonel gruplar bağlanarak farklı normal faz sabit fazları elde edilir. Normal faz ayırımlarında polaritesi yüksek olan maddeler, polar olan sabit faz ile daha fazla etkileşmekte, buna bağılı olarak kolonu daha geç terk etmektedir [65,66]. Hareketli fazın polaritesindeki artış elüsyon zamanının azalması ile sonuçlanır.

Ters faz sıvı kromatografisi: Ters faz sıvı kromatografisinde mobil faz, sabit fazdan daha polardır. Apolar sabit faz ve polar hareketli fazdan oluşan kromatografi çeşididir. Ters faz kromatografide sabit faz polardır ve çoğu zaman bir hidrokarbondur. Hareketli faz ise su veya sulu tampon çözeltileri ile metanol veya asetonitril gibi polar çözücülerden meydana gelmektedir. Bu yöntem apolar sabit fazda tutunmayı tercih eden maddeleri ayırmada başarılıdır ve polarlığı en çok olan madde kolondan önce elue olur. Ters faz kromatografide kaplamalardaki siloksandaki R grubu bir C_8 veya C_{18} zinciridir.

Kimyasal olarak bağı alkil zincirlerinin sabit faz olarak kullanıldığı ters faz sıvı kromatografisinde, ODS (18 karbon atomu zincirinden oluşan oktadesil silan) en fazla kullanılan sabit fazdır. Bu tür dolgu maddelerinde uzun zincirli hidrokarbon grupları parçacık yüzeyine dik ve birbirine paralel şekilde yerleştirilerek apolar bir yüzey elde edilmiş olur. Ayrıca C₈ ve daha kısa zincirli hidrokarbonlar, sikloheksil ve fenil bağlanmış sabit fazlar da kullanılmaktadır. Fenil gruplar alkil gruplardan daha polardır [65]. Hareketli faz ise çeşitli derişimlerde metanol, asetonitril gibi çözücüleri içeren sulu çözeltilerdir.

Bu kromatografi türü, apolar sabit fazda daha fazla kalmayı tercih eden, yani daha fazla alıkonulan apolar maddelerin ayırımında kullanılır. Ters faz yönteminde en çok polar bileşenler en önde yürür ve hareketli fazın polaritesindeki artış, elüsyon zamanını artırır.

Tablo 2.3. Ters faz ve normal faz sıvı kromatografilerinin karşılaştırılması

| | Ters Faz | Normal Faz |
|---|--------------------------|--------------------------|
| Sabit faz polaritesi | Düşük | Yüksek |
| Hareketli faz polaritesi | Ortadan yükseğe | Düşükten ortaya |
| Elüsyon sırası | Polar önce | Az polar önce |
| Hareketli faz polarite artışının etkisi | Elüsyon zamanını artırır | Elüsyon zamanını azaltır |

Ters faz sıvı ve normal faz sıvı kromatografisinde madde, polaritesinin sabit faz polaritesine yakınlığına göre kolonda alıkonulur ve hareketli faz polaritesine yakın olan maddeler kolonu önce terk eder (Tablo 2.3.).

Ters faz sıvı kromatografisi, günümüzde en çok kullanılan ayırım tekniğidir. İlaç analizlerinde de genel olarak ters faz sıvı kromatografisi normal faz sıvı kromatografisine göre tercih edilir. Bunun nedenleri:

1. Normal faz kromatografide, sıvı fazın kontrolü çok önemli ve kritiktir. Hareketli faz bileşimindeki küçük değişiklikler kromatogramda belirgin farklılıklara neden olabilir. Ters faz sıvı kromatografisinin uygulaması ve sistem kontrolü daha kolaydır.

2. Dengeye ulaşma normal faz kromatografide çok yavaştır.
3. Normal faz kromatografide polar maddelerin elüsyonu çok yavaştır ve yayvan piklere sebep olur.
4. Normal faz kromatografisinde kullanılan apolar çözücüler çok pahalıdır, ayrıca nemden uzak tutmak zordur. Ters faz kromatografisinde hareketli faz bileşiminde kullanılan organik çözücüler daha ucuzdur ve sulu tampon çözeltilerinin oranı yüksek tutulabilir.
5. İlaçlar genellikle daha apolar yapıdadırlar ve ters faz kromatografisinde kullanılan sabit fazda apolar yapıdadır.

c. İyon değiştirme kromatografisi

Sabit faz; zayıf ya da kuvvetli, katyon ya da anyon değiştirici bir reçine, hareketli faz ise genellikle tamponlanmış, istenen iyonların oluşmasına neden olan belli bir pH değerinde sulu çözelti olabilir.

Sabit fazdaki iyonlarla numunedeki aynı yükteki iyonların karşılıklı yer değiştirmesi esasına dayanır. Maddenin mutlaka iyonik halde olması veya iyonlaşması gerekir. Katıya kuvvetle bağlanan, uygun yükte bileşenler kolonda uzun süre kalır. Bu kromatografi çeşidi ilaçlar ve bunların metabolitleri, serumlar, gıda koruyucu maddeler, vitamin karışımları, şekerler ve farmasötik preparatlar gibi çok farklı organik ve biyokimyasal sistemlere uygulanmaktadır. Bu kromatografi çeşidi, süt, kahve, şarap ve diğer ticari gıda ürünleri gibi çok sayıdaki maddenin teşhisi ve tayini için kullanılabilir.

d. Boyut eleme kromatografisi

Sabit faz; katı, jel yada gözenekli organik bileşik, hareketli faz ise sıvıdır.

Maddeler molekül büyüklüğüne ve biçimine göre ayrılırlar. En içteki gözeneklere ulaşabilen küçük moleküllu bileşenler, kolonda uzun süre kalır. Jel geçirgenlik veya jel filtrasyon kromatografi adı da verilen bu kromatografi çeşidinde kromatografik ayırma sırasında bozunması veya değişikliğe uğraması istenmeyen protein ya da

enzim gibi biyolojik moleküllerin birbirinden ayrılması için kullanılır. Bu yöntem ile polimerlerin molekül ağırlığı dağılımı da tayin edilebilir.

e. İyon çifti kromatografisi

İyonik türlerin ayrılması ve tayini için kullanılan bir tür ters faz dağılıma kromatografisidir. İyon-çifti kromatografideki hareketli faz metanol veya asetonitril gibi bir organik çözücü içeren bir sulu tampon ve tayin edilecek analit ile zıt yüklü karşıt iyon içeren bir iyonik bileşikten meydana gelmiştir. Karşıt iyon, analit ile birleşerek ters faz dolgu maddesi ile alıkonulabilen nötral iyon çifti oluşturan bir iyondur. Hareketli faza ilave edilen iyon çifti reaktif sabit faz tarafından adsorplanır ve iyonize olmuş maddeler bu iyon çiftleri ile iyonik etkileşime girerek birbirinden ayrılır. İyon çifti oluşturuvcu maddeler kuyruklanmayı engeller ve pik keskinliğini arttırmırlar. İyon çifti oluşturuvcu maddeler genel olarak; kuaterner aminler, tersiyer aminler, alkil sülfonik asitler, alkil sülfonatlarıdır.

f. Afinite kromatografisi

Alıkonma mekanizması maddeye özgün olmakta ve anahtar-kilit modeline uygun biyolojik materyaller dolgu malzemesi olarak kullanılmaktadır. Maliyetinin çok yüksek olması uygulama alanını kısıtlamaktadır. Enzim, hormon, protein saflaştırılmasında kullanılır.

2.3.2.2. Uygulama tekniğine göre sınıflandırma

a. Düzlemsel kromatografisi

Sabit faz; katı, silikajel, alüminyumoksit ile kaplanan cam, plastik veya metal yüzeylerin ince bir plakası veya süzgeç kağıdı gözeneklerine yerleşen sudur.

Her maddenin hareketli faz ile sürüklenmeleri farklıdır. Hareketli faz, düz bir plaka üzerine veya bir kağıdın gözenekleri arasına tutturulan sabit faz arasından kapiler

etkisi ile veya yerçekimi etkisi ile hareket eder. Hızlı sonuç vermesi, iyi bir ayırım sağlaması ve ekonomik uygulama avantajları nedeni ile önemli bir yere sahiptir.

b. Kolon kromatografisi

Sabit faz; katı, silikajel, selüloz, alüminyumoksit, hareketli faz ise; sıvı, organik çözücüler (metanol, petrol eter, metilen klorür, etanol, benzen, etil asetat, aseton, toluen, dietil eter, karbon tetraklorür, n-butanol izopropanol)'dir.

Ayrımı yapılacak karışım uygun bir çözücüde çözülerek bir kolon içine doldurulmuş katı sabit fazdan geçirilir. Kolonda bileşenler sabit faz tarafından adsorblanırlar. Hareketli faz basınç altında veya yerçekimi etkisi ile kolondan geçirilerek bileşenler kolonun altından ayrı ayrı alınır. Çözücüsü buharlaştırılarak saf madde elde edilir. Sabit fazın kuvvetle tuttuğu maddeler kolonda uzun süre kalır. Kolon kromatografisi biyomoleküllerin saflaştırılmasında sıklıkla kullanılır.

2.3.2.3. Faz tiplerine göre sınıflandırma

a. Gaz kromatografisi

Uçucu olan veya uçucu hale getirilebilen maddelerin belirli bir sıcaklıkta, bir taşıyıcı gaz yardımıyla, sabit bir faz içinde ayrılmaları esasına dayanan kromatografik bir yöntemdir. Maddelerin ayrılmasında gaz kromatografisini uygulayabilmek için maddelerin gaz halinde olması ya da kolaylıkla buharlaştırılabilmesi gerekmektedir.

Gaz kromatografisi de, öteki kromatografi dalları gibi bir karışımda bulunan maddeleri ayırmaya yarar. Bu kromatografi dalında da, sabit ve hareketli olmak üzere iki faz mevcuttur. Hareketli faz He, N₂, Ne ve Ar gibi inert gazlar olup taşıyıcı gaz olarak adlandırılmaktadır. Bundan dolayı, öteki kromatografi dallarında olanın aksine bu kromatografi dalında ayrılmaları istenen maddelerle sabit faz arasında hiçbir etkileşme olmaz. Hareketli fazın görevi sadece maddeleri taşımaktır. Sabit faz, bir katı veya bir katı yüzeyine adsorplanmış (katıya emdirilmiş) bir sıvı olabilir. Buna göre gaz kromatografisi ikiye ayrılır:

Sabit fazı sıvı olan gaz-sıvı kromatografisi (GLC): Sabit faz, uzun bir kolon içine yerleştirilmiş geniş yüzeyli dolgu maddelerine emdirilmiş bir sıvı (polimerler).

Sabit fazı katı olan gaz-katı kromatografisi (GSC): Sabit faz uzun bir kolon içine yerleştirilmiş geniş yüzeyli dolgu maddeleri (silikajel, alümina).

Ayrırımı istenen karışım, bir enjektör yardımıyla enjeksiyon kısmına enjekte edilir. Enjektör bölümü ısıtılmış durumdadır, karışım hemen buharlaşır ve buhar halinde inert taşıyıcı gaz ile birlikte kolona girer. Kolonda her bileşik kaynama noktasına, molekül büyüklüğüne ve kolondaki sabit faz ile etkileşimine bağlı olarak kolonda farklı hızlarda göç ederek devamlı taşınırlar ve böylece birbirlerinden ayrılarak farklı zamanlarda kolondan çıkarlar. Kolondan çıkan herbir bileşen dedektöre girer, dedektörde bileşenlerin miktarı ile orantılı olarak belirlenir ve kaydedicide grafik olarak çizilir. Her bileşik alıkonma zamanı ile belirlenir. Alıkonma zamanı bir bileşiğin enjekte edilmesinden dedektörden çıkışına kadar geçen süredir. Bu süre her bileşik için farklıdır.

b. Sıvı kromatografisi

Daha öncede anlatıldığı gibi hareketli fazı sıvı olan kromatografi çeşitleri dağılma kromatografisi, adsorbsiyon kromatografisi veya sıvı-katı kromatografi, iyon değişimi kromatografisi ve boyut eleme veya jel kromatografisidir.

Bir sıvıda çözülmüş ayrılacak bileşenler, bir kolon içerisinde bulunan genellikle katı bir destek üzerindeki sabit faz ile farklı etkileşimlere girerek, kolon içinde değişik hızlarda ilerler. Kolonu değişik zamanlarda terkederler ve böylece birbirlerinden ayrılırlar. Teknolojinin ilerlemesiyle klasik yer çekimi-akışlı sıvı kromatografinin basit cam kolonlardaki durumun aksine, (kolon boyunca hareketli fazın ilerlemesini sağlamak için) yüksek basınçta çalışan, gelişmiş cihazlara ihtiyaç duyulmuştur. Bu tür kolonlarda yüksek basınç altında (100-400 atm) gerçekleştirilen kromatografi türüne yüksek basınçlı (performanslı) sıvı kromatografisi (YPSK) adı verilir. Burada taşıyıcı faz olan sıvı, pompalarla kolona basıldığından yüksek akış hızındadır. Bu nedenle ayırma daha kısa sürede ve tam olarak gerçekleşmektedir.

2.3.3. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

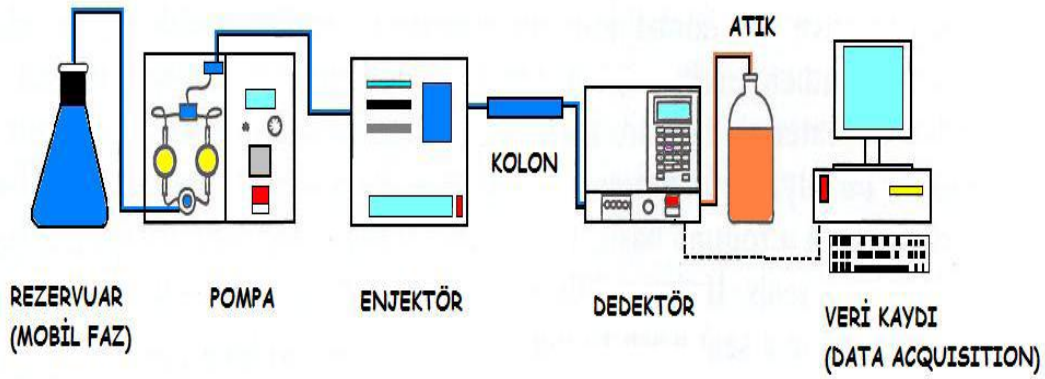
Yüksek performanslı sıvı kromatografisinde hareketli faz sıvı, durgun faz ise katı veya katı destek maddesi üzerine tutturulmuş sıvı fazdır.

YPSK; yüksek performans, yüksek hız ve yüksek ayırıcılığı ifade eder ve bütün analitik ayırma teknikleri arasında en yaygın kullanılanıdır. Yöntemin bu kadar yaygın olmasının sebepleri, duyarlılığı, kesinliği ve seçiciliğinin yüksek olması, kantitatif tayinlere kolaylıkla uygulanabilir olması, uçucu olmayan türlerin veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen türlerin ayrılmasına uygun olması ve sanayinin, birçok bilim dalının ve halkın birinci derecede ilgilendiği ilaçlar ve gıda bileşenleri gibi maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir. Bu gibi maddelere örnek olarak; amino asitler, proteinler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, ilaçlar, metal-organik türler ve çeşitli inorganik bileşikler sayılabilir. Kısacası, uygun dedektör, uygun kolon ve uygun hareketli faz olduğu sürece bütün kimyasal maddelerin ayrılmasında ve analizinde YPSK kullanılabilir.

2.3.3.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazı

Sıvı Kromatografisi cihazı (Şekil 2.1.) aşağıdaki birimlerden oluşur:

- a. Hareketli (taşıyıcı) faz haznesi
- b. Pompa: Taşıyıcı faz hareket birimi
- c. Numune enjeksiyon sistemleri: Enjeksiyon (örnek yükleme) birimi
- d. Kolon: Ayırma birimi
- e. Dedektör: Ölçüm birimi
- f. Kaydedici: Yazım birimi
- g. Atık deposu



Şekil 2.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazının şemantik gösterimi

Hareketli fazı kolona gönderen pompadır. Pompa hareketli faz deposundan aldığı çözücüye önce enjeksiyon sistemine gönderir. Örneğin rahat yüklenmesi ve hareketli faz akışının enjeksiyondan etkilenmemesi için örnek çok uçlu bir vananın içerdiği kangala verilir. Vananın pozisyonu değiştirilerek hareketli fazın kangaldan geçmesi, dolayısıyla enjeksiyon sağlanır. Çözücü enjeksiyon sisteminden geçtikten sonra, sıvı kromatografisi sisteminin ayırma birimi olan kolona gelir. Koşullar iyi ayarlandığında, kolonda birbirinden ayrılan maddeler taşıyıcı faz ile birlikte ölçüm birimi olan dedektöre gelirler. Dedektör maddenin derişimi ile doğru orantılı bir özelliğini ölçmelidir. Akış hücresine gelen madde derişimi ve/veya cinsi değiştiğinde dedektör sinyalinde değişiklik olur. Kaydedici, zamana göre dedektörden gelen sinyali (voltaj değişimini) kaydeder.

a. Hareketli faz haznesi

Bir YPSK cihazı, bir veya daha fazla, her biri 200-1000 mL çözücü içeren camdan veya çelikten yapılmış hareketli faz hazneleri içerir. Bu hazneler çoğunlukla kolonda veya dedektör sisteminde bozucu etkilere neden olan çözünmüş gazların (özellikle oksijen ve azot) giderilmesi için bir bölüm (gaz giderici) ile donatılmıştır. Ayrıca bu hazneler, çözücü içinde bulunabilecek toz ve partikül halindeki maddelerin pompaya veya enjeksiyon sistemine zarar vermemesi yada kolonu tıkamaması için toz ve partikül maddeleri süzmeye yarayan bir süzme düzeneği de içerirler. Hareketli fazın cihaza verilmeden önce süzülmesi ve çözünmüş gazlarının giderilmesi gerekir. Aksi halde sistemin düşük basınçlı kısmı olan dedektörde, çözünmüş gazlar (özellikle hava) kabarcık oluşturur. Bu durum, dedektörden çok hatalı değerler alınmasına

neden olur. Süzme işlemi için 0,45-0,6 µm çapında membran veya teflon filtreler kullanılır. Bu uygulama, süspansiyon halindeki maddeleri uzaklaştırmanın yanı sıra gazları da giderir. Sistemde gaz giderici yoksa hareketli fazdaki gazları uzaklaştırmak amacıyla ultrasonik banyoda (ultrasonikatör) bekletme veya çözücünden inert bir gaz geçirme işlemleri uygulanabilir.

Hareketli faz su ve/veya sulu tampon içeriyorsa kimyasal bozunma veya mikrobiyolojik üreme sonucunda kolonu tıkayabilir. Bu nedenle, YPSK analizleri sırasında taze hazırlanmış hareketli faz çözücülerini kullanılır [60,65,67].

İyi bir hareketli faz; sabit fazın özelliklerini değiştirmemeli, örnekteki bileşenlerin hepsini çözmeli, düşük viskozitede olmalı, (gerektiğinde) ayrılan bileşenlerden kolayca ayrılabilmesi (kolayca buharlaşabilmesi), kullanılan dedektöre uygun olmalı, ekonomik ve istenen saflıkta kolayca bulunabilir olmalıdır.

İzokratik ve gradient elüsyon: Sabit bileşimde tek bir çözücü kullanılarak yapılan ayırma izokratik elüsyon olarak adlandırılır. Polariteleri önemli derecede birbirinden farklı iki veya üç çözücü sistemi kullanılarak yapılan ayırma ise gradient elüsyondur. Gradient elüsyonda; sisteme gönderilen hareketli faz bileşimi veya akış hızı gibi parametreler, elüsyon başladıktan sonra belli bir programa göre, sürekli veya bir seri basamaklar halinde değiştirilerek ayırma işlemi gerçekleştirilir. YPSK cihazları, çözücülerin hacimsel oranı zamanla doğrusal olarak veya üstel olarak değiştirilebilecek şekilde, iki veya daha fazla hazneden aldığı çözücülerini bir karıştırma odasında sürekli olarak değişen oranlarda bir araya getiren sistemlerle donatılmıştır. İzokratik elüsyon ile ayrılamayan maddeler gradient elüsyonla ayrılabilen, madde karışımlarının alıkonma zamanları kısaltılabilmektedir.

b. Pompa

Bir YPSK sisteminde pompanın görevi hareketli fazın kolon boyunca akışını sağlamaktır. Hareketli fazı kolona gönderen pompadır. YPSK uygulamalarında mobil fazı oluşturan çözücü karışımlarının, enjektör, kolon ve dedektör içerisinden belirli, sabit veya değişken bir hızda, belirli basınç altında geçmesini sağlar. Modern

YPSK donanım pompaları bilgi işlemci kontrollü olup, çeşitli firmalar tarafından değişik modellerde üretilmektedir. Pompa imalinde paslanmaz çelik, titanyum, polietilenketon, teflon ve seramik materyaller kullanılır. Bir YPSK pompalama sistemi için gerekli şartlar şunlardır:

400 atm'ye kadar basınç üretimi

Puls içermeyen basınç çıkışı

0,1-10 mL dk⁻¹ aralığında akış hızları

% 0,5 veya daha iyi bir tekrarlanabilirlikle akış kontrolü

Korozyona dayanıklı parçalar

Pistonlu pompalar: Genellikle motor kontrollü bir pistonun ileri ve geri hareketiyle çözücünün pompalandığı küçük bir silindirden meydana gelmiştir. Pistonlu pompaların üstünlüğü, küçük iç hacimleri, yüksek çıkış basıncı, gradient elüsyona uyarlanmaya hazır oluşları ve kolon geri basıncından ve çözücü viskozitesinden büyük ölçüde bağımsız olan sabit akış hızlarıdır. Pistonların biri emerken diğeri bastığından sıvı kromatografisi için çok önemli olan düzgün akış elde edilir.

Sürgülü pompalar: Bir kademeli motordan güç olan vidalı güdüm mekanizması ile kumanda edilen sızdırmaz bir sürgüsü olan şırınga benzeri silindirik bir kaptan ibarettir. Bu pompalar da viskoziteden ve geri basınçtan bağımsız bir akış üretirler. Ayrıca çıkış akımı pulssuzdur. Dezavantajları; sınırlı çözücü kapasitesi (≈ 250 mL) ve çözücü değiştirilmesi gerektiğinde karşılaşılan güçlüklerdir.

Pnömatik pompalar: Bu tip pompalar, pahalı değildir ve pulssuzdur, ancak kapasitesi sınırlı olup, çıkış basıncı düşüktür ve çıkış hızı çözücü viskozitesi ile kolon geri basıncına bağlıdır. Ayrıca bu pompalar gradient elüsyona uygun değildir ve basınçları 135 atm'den daha düşüktür.

c. Numune enjeksiyon sistemleri

Enjektör; örneğin sabit faz (kolon) öncesinde mobil faza enjekte edilmesi için kullanılır. YPSK analizlerinde ölçümlerin kesinliğini belirleyen faktör, numunenin

kolon dolgu maddesine gönderilmesinin tekrarlanabilirliğidir. Aşırı numune yüklenmiş kolonlarda görülen bant genişlemesi de kesinliği etkiler. Bu yüzden kullanılan hacim (5 μL 'den 500 μL 'ye kadar) çok küçük olmalıdır ve sistemin basıncını düşürmeden numunenin sisteme girişinin sağlanması gereklidir. Temel olarak, manuel ve otomatik olmak üzere iki tip enjektör vardır:

Manuel enjeksiyon valfleri: Enjeksiyon valfleri yüksek basınçlı bir ortama numune aktarmak amacıyla kullanılan sistemlerdir. Enjeksiyon valfinin numune yükleme ve enjeksiyon olmak üzere iki konumu vardır. Yükleme konumunda loop basınçlı ortamdan izole edilir ve bir şırınga yardımı ile istenilen numune miktarı loop'a doldurulur. Enjeksiyon konumunda loop tekrar yüksek basınçlı ortama dönerek numuneyi sisteme aktarır.

Otomatik enjektör (autosampler): Basit otomatik enjektörlerde, manuel enjeksiyon valfine benzer bir valf kullanılır. Bu sistemde numune şişesine azot basıncı uygulayarak loop doldurulur ve valfin dönmesi ile numune enjekte edilir. Enjeksiyon hacmi sabittir, loop hacmi ile sınırlıdır. Programlanabilen otomatik enjeksiyon sistemleri, numune loop'unu doldurmak için hassas motor ile hareket ettirilen şırıngalar kullanılır. Enjektörle çekilen hacim kontrol edilerek istenilen miktarda numune loop'a doldurulur. Küçük miktarlardaki numune enjeksiyonları gerçekleştirilebilmekte ve numune kayıpları minimum olmaktadır. İstenilen sayıda enjeksiyon yapmak mümkündür.

d. Kolon

Bileşenlerin birbirinden iyi çözünürlükle ayırımından sorumlu sabit fazdır. Kolon imalatında yapı materyali olarak 316 paslanmaz çelik, teflon, cam veya PEEK en sık tercih edilenlerdir. Kolonun ayırım gücü ve performansı yapıldığı materyalden çok, iç yüzeyine yapılan kaplamada kullanılan malzemenin kimyasal ve fiziksel özelliklerinden etkilenmektedir. Kullanılan bu tür kaplama malzemeleri çok çeşitli olup, kullanılacak mobil fazın ve uygulanacak YPSK metodunun özelliklerine ve analizi yapılacak örneğin bilinen kimyasal ve fiziksel özelliklerine göre seçilmelidir. Seçilecek kolonun YPSK uygulamasında kullanılacak akış hızı ve dolayısıyla

oluşacak basınca dayanıklı olmasına dikkat edilmelidir. Birçok analitik kolonun iç çapı 2-5 mm aralığında değişmektedir. Kolon iç çapı arttıkça akış hızı ve iç doldurma hacmi artmakta ama oluşacak piklerin çözünürlüğü dolayısıyla duyarlılık azalmaktadır. Sıvı kromatografi kolonları, düz veya sarmal olabilirler. Kolonların boyları (uzunluğu) çok çeşitli olup genellikle 5-30 cm aralığında değişmektedir. Kolonların iç çapı 2-5 mm, kolon dolgu maddelerinin tanecik büyüklüğü ise genellikle 5-10 µm arasındadır. Günümüzde en sık kullanılan kolon 25 cm uzunluğunda, 4,6 mm iç çapında ve 5 µm tanecik büyüklüğüne sahip kolonlardır. Kolon uzunluğu arttıkça örnek bileşenlerinin ayırımı daha iyi olmakta fakat analiz süresi uzadığı için daha fazla mobil faz harcanmaktadır. Son yıllarda hız ve minimum çözücü sarfiyatı bakımından diğer kolonlara göre üstünlük sağlayan daha küçük boyutlarda yüksek hız ve yüksek performanslı kolon üretimi de söz konusudur.

Emniyet (koruyucu) kolonu: Analitik kolonun ömrünü artırmak amacıyla analitik kolondan önce genellikle kısa bir kolon yerleştirilir. Bu kolonların görevi partikül haldeki maddeleri, çözücü içindeki yabancı maddeleri tutmak, numune içinde bulunan ve sabit faza tersinmez olarak bağlanan bileşenleri tutmaktır. İlave olarak hareketli fazı sabit faz ile doyurarak analitik kolondaki çözücü kaybının en aza indirilmesini sağlar. Bu emniyet kolonunun tanecik boyutu, basınç düşüşünü en aza indirmek amacıyla genellikle büyüktür. Emniyet kolonundaki dolgu maddesi analitik kolondaki dolgu maddelerinin benzeridir. Emniyet kolonu kirlendiği zaman yenisiyle değiştirilmek suretiyle daha pahalı olan analitik kolonun korunması sağlanır [62,68,69].

Kolon termostatları: Kolonların sıcaklığını kontrol etmek gerekli olmakla birlikte genellikle kolonlar oda sıcaklığında kullanılırlar. Ancak kolon sıcaklığı sabit tutulduğu zaman elde edilen kromatogramların daha iyi olduğu gözlenmiştir. Buna dayalı olarak, kolonların sıcaklığının 100-150 °C'ye kadar her sıcaklıkta sabit tutabilen kolon ısıtıcıları ve kolonların bağlı bulunduğu sabit sıcaklıktaki bir su banyosu tarafından beslenen su ceketini kullanımı da mümkündür.

Kolon dolgu maddeleri ve özellikleri: YPSK cihazında kullanılan kolonlar, yüksek basıncı korumak için paslanmaz çelikten yapılmışlardır. Bunlar düzgün bir iç çapa sahiptirler ve ticari olarak değişik büyüklüklerde mevcuttur. Bir kromatografik sistemin performansı, kolonda gerçekleştirilen ayırma ile yani kolon dolgu maddesinin seçilmesi ve kullanılması ile tayin edilir. İyi bir kolon dolgu maddesi kararlı olmalıdır ve hem hareketli faz çözücülerine hem de örnek çözeltilere karşı inert olmalıdır. Ayrıca geniş bir yüzey alanına düzgün olarak dağılmış ve hareketli fazla kolay etkileşebilen, açık yapılı bir yüzeye de sahip olmalıdır. Aynı zamanda yüksek basınç ve yüksek akış hızlarından da etkilenmemelidir.

Sıvı kromatografide temel olarak iki tip kolon dolgu maddesi kullanılmaktadır. Bunlar film dolgular ve gözenekli dolgulardır. YPSK çalışmalarında sabit faz olarak en çok kullanılan dolgu maddesi silikajeldir. İçerdiği SiOH grupları nedeniyle zayıf asidik özellik gösteren silikajel, bazik özellik gösteren bileşiklere bazlık kuvvetlerine göre tutar. Silikajel doğrudan dolgu maddesi olarak kullanıldığı gibi, katı yüzeyine film halinde de kaplanabilir. Asidik özellik gösteren bileşiklerin ayrılmasını sağlayan, yani bazik özellik taşıyan bir kolon dolgu maddesi de aluminadır. Bu dolgu maddesi de katı bir yüzeye film halinde kaplanarak kullanılır.

e. Dedektör

Kolonda ayırımı yapılan analizlenecek maddeye ait bileşenlerin alıkonma zamanlarına göre sırayla içerisinden geçerken miktar tayinlerinin yapıldığı YPSK donanımıdır. Kullanılacak dedektörün türü analizlenecek maddenin fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre seçilmelidir. Sıvı kromatografide kullanılan dedektörler iki başlık altında toplanabilir:

Yığın Özellikli Dedektörler: Bunlar analit tarafından değiştirilen yığın özelliklerine cevap verirler. Hareketli fazın kırılma indisi, dielektrik sabiti ve yoğunluğu gibi özelliklerinin değişimi sonucu ölçüm yapılır.

Analit Özellikli Dedektörler: UV absorbanı, floresans şiddeti gibi analitin sahip olduğu, fakat hareketli fazın sahip olmadığı özelliklere cevap verirler. Bu özelliklerdeki değişimler ölçülerek sonuç elde edilir.

Bilimsel araştırmalarda en çok kullanılan dedektör tipleri; UV absorbanı, floresans, kırma indisi, elektrokimyasal ve kütle spektrometrisi dedektörleridir.

Ultraviole-görünür bölge dedektörler (Ultraviolet/Visible dedector-UV/VIS): Yüksek duyarlılığı, geniş bir doğrusal aralığa sahip olması, sıcaklık dalgalanmalarından nispeten etkilenmemesi ve gradient elüsyon için uygun olması nedeniyle UV-GB dedektörleri en sık kullanılan dedektör tipidir. Bu dedektörler, maddenin ultraviyole veya görünür bölge ışığı absorpsiyonu temeline dayanır. Çoğu ilaç analizinde kullanılan UV-GB dedektörler, maddenin ışığı absorplayıp absorplamadığını anlamak için ışık kaynağından gelen ışığın şiddetinin ölçülmesi amacıyla kullanılan dedektörlerdir. Ayrıca, UV-GB dedektörleri bir ya da daha fazla dalga boyunda ölçüm yapabilme olanağı da sağlar. Absorbanı ölçülür. Lambert-Beer yasası geçerlidir. Bunlar iki tiptir:

Sabit dalga boylu dedektörler: Basit bir dedektör olup, dalga boyunun seçimi için farklı interferanslı filtreler kullanılır. Bu dedektörlerde genellikle UV kaynağı olarak civa lambası kullanılır. Bunun dışında alternatif ışık kaynakları ile daha değişik dalga boylarını gözlemekte mümkündür.

Değişken dalga boylu dedektörler: 108-400 nm arasında sürekli ışık verebilen döteryum lamba ya da 400-800 nm arasında ışık veren bir tungsten lambaya sahip ve istenilen dalga boyunu seçmek için de bir monokromatör taşıyan fotometrelerdir. Maddenin maksimum absorpsiyonunun bulunduğu dalga boyunda çalışma olanağı sağlayan bu dedektörler, hassasiyeti arttırdığı için ve düşük dalga boyunda çalışabildiği için son derece kullanışlıdır.

Diyod sıralı dedektörler (DAD): Değişken dalga boylu UV-GB dedektörlerdir. Hem sabit hem de taramalı dalga boylarında incelemeye müsait olan dedektörlerdir. Kullanılan ışık kaynağı döteryum veya tungsten lambadır. Optik sistemi, döteryum lambasından yayılan polikromatik ışığı, akış hücresinin üzerine yollar. Bu ışık daha sonra optik ağ üzerinde dağılır ve çok sayıda diyottan oluşan foto diyot dizisi üzerine düşer.

Diyod array dedektörler, seçimlilik ve hassasiyet açısından değişken dalga boylu UV dedektör ile aynı avantajlara sahiptir. Bunlara ek olarak:

1. Aynı anda spektrumun bütün dalga boylarında piklerin ölçümü yapılabilir yada istenilen dalga boyu aralığı ayarlanarak ölçüm alınabilir.
2. Çok hızlı spektrum taraması yapılabilir ve istenilen pikin üç boyutlu kromatogramı alınabilir.
3. 512 elementden oluşan bir yüzeyde, her elementin ayrı bir dalga boyundaki absorbansı eş zamanlı olarak ölçülebilir.
4. Analiz edilecek maddelerin maksimum dalga boyları farklı olduğunda DAD'ler birden fazla dalga boyunda ölçüm alabilir.
5. Spektrumların çakıştırılması yöntemi ile kromatografik piklerin saflık kontrolü veya birden fazla pikten oluşup oluşmadıklarının tayini yapılabilir. Bu amaçla, piklerin elüsyonu sırasında birkaç spektrum kayıt edilerek, spektrumlar üst üste konup karşılaştırılabilir. Bütün dalga boylarında spektrumlar üst üste çakışıyorsa madde piki saftır. Eğer enjekte edilen piklerin sayısından daha az pik elde edilmişse saflık kontrolleri yararlı ipuçları verir.

f. Kaydedici

Mikroişlemciler ve bilgisayarların kullanıldığı sistemlerde hareketli faz akış hızı, enjektör, kolon fırını, örnek alma sistemi, dedektör ve veri kaydı sistemi merkezi bir veri kayıt cihazı ile kontrol edilmektedir. Mikroişlemciler ve bilgisayarların kullanılması kromatografik sistemde tekrarlanabilirliği arttırmakta, sistem validasyon parametrelerinde daha doğru değerler elde edilmesine olanak sağlamaktadır.

2.3.3.2. YPSK sistem türleri

1. İzokratik sistem (tek pompa, tek solvent, solvent karışım olabilir, ayırım yetersiz)
2. Düşük basınçlı gradient sistem (tek pompa, max 4 farklı mobil faz, karışma pompadan önce)
3. Yüksek basınçlı gradient sistem (2 yada 3 pompa, 2 yada 3 farklı mobil faz, karışma pompadan sonra)

2.3.3.3. YPSK'de ayırma teknikleri

1. Normal faz (Normal phase-NP) (ilk geliştirilen teknik, kolon polar, mobil faz apolardır, kullanılan kolonlar silikajel, cyano, amino, diol veya nitro kolonlardır)
2. Ters faz (Reverse phase-RP) (en sık kullanılan teknik, kolon apolar, mobil faz polardır, kullanılan kolonlar C₁₈, C₈, C₄, phenyl, TMS, cyano'dur)
3. Ters faz iyon çifti (Reverse phase ion pairing-IP)

2.3.3.4. YPSK yönteminin avantajları

1. YPSK kolonu, rejenerasyon gerekmeksizin pek çok kez kullanılabilir.
2. Duyarlılığı yüksektir.
3. Kantitatif tayinlere (nicel analiz) kolayca uygulanabilir.
4. Uçucu olmayan, sıcaklıkla kolayca bozunabilen türlerin ayırımı için uygundur.
5. Pek çok maddeye geniş şekilde uygulanabilir.
6. Aynı sabit faz kullanılarak farklı hareketli faz sistemleriyle aynı anda birçok maddenin duyarlı olarak miktar tayininin yapılmasına olanak sağlar.
7. Numunedeki maddelerin, bozulma ürünlerinin yanında miktar tayinlerine olanak sağlar.
8. Biyolojik sıvılardan gerek ilaç etken maddelerinin, gerekse metabolitlerinin analizi için geniş bir kullanım alanına sahiptir.

9. YPSK tekniği kullanıcının becerisine daha az bağımlıdır ve tekrarlanabilirlik daha yüksektir.
10. Analiz süresi kısadır.
11. Burada numunenin miktarı çok az da olsa sonuç alınabilir.

2.3.3.5. YPSK yönteminin dezavantajları

1. Ekonomik olarak pahalı sabit faz ve hareketli faz sistemlerine gereksinimn göstermektedir.
2. Hareketli faz sistemlerinin mutlaka pahalı membran sistemlerinden süzülmesi gerekmektedir.

2.3.3.6. Yüksek performanslı sıvı kromatografisinin uygulama alanları

YPSK, benzer yapılı kimyasal maddelerin ayrılması, saflaştırılması ve belirlenmesi işlemlerinde oldukça yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. İlaç etken maddesinin hızlı, duyarlı ve güvenilir analizini yapmaya yarayan bir yöntemdir. Bu yöntemle saflık ve kalite kontrolü, stabilite tayini ve reaksiyon sırasında reaksiyon ara ve sonuç ürünlerinin saptanması ile enansiyomer ayrımları sağlanabilmektedir. Biyolojik materyallerde ilaç ve ilaç metabolitlerinin analizine de olanak sağlayan bu yöntemde, plazmadaki ilaç düzeyinin saptanması, doz ayarlanması ve biyoyararlılık gibi konularda çalışmalar yapılabilmektedir.

2.3.3.7. Saflaştırma

Herhangi bir karışım içerisindeki hedef bir bileşiğin, diğer bileşiklerden ya da safsızlıklardan ayrılmasıdır. Saflaştırma işleminde, saflaştırılacak bileşiğin özelliklerine uygun hareketli faz ve kolon seçimi yapıldığında iyi bir ayırım gerçekleştirilebilir. Ayrıca yüksek saflık elde edebilmek için de diğer bileşiklerin kolon içerisindeki g hızlarının yeteri derece birbirinden farklı olması gerekmektedir.

2.3.3.8. Kalitatif analiz

Az sayıda ve bilinen türleri içeren karışımlardaki bileşenlerin varlığını tanımak amacıyla YPSK yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Örneğin, tek bir kromatogramla, bir peptit parçalanmasında 30 kadar aminoasit yeterince kesin bir şekilde görülebilmektedir. Öte yandan kromatogram, karışımdaki her tür için, tutulma süresi gibi yalnızca tek bir bilgi içerir. Bu nedenle anılan tekniğin bilinmeyen bileşimdeki karmaşık numunelere uygulanmasındaki başarısı sınırlıdır. Bunun için YPSK kolonunun NMR, infrared veya kütle spektrofotometrelerine bağlanmasıyla oluşturulan ikili cihazlar, bu sınırlamaları önemli ölçüde ortadan kaldırmıştır.

2.3.3.9. Kantitatif analiz

YPSK'nin çalışmalarda çok kullanılması, onun kantitatif analizlerde kullanılabilir olmasından kaynaklanmaktadır. Kantitatif analizde, analit pik yüksekliği veya pik alan değerleri derişime karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edilir. Sonra bilinmeyen maddenin derişimi kalibrasyon eğrisi yardımıyla bulunur [70,71].

2.3.3.10. YPSK metodunun geliştirilmesi

YPSK analizlerinde öncelikle bir metodun tanımlanması ve geliştirilmesi gerekliliği vardır. Metod geliştirme aşamasında, öncelikle aşağıdaki deneysel koşullar ve deneysel verileri uygulamalı olarak saptanmalıdır.

1. Örneğe ait fiziksel ve kimyasal özelliklerin belirlenmesi
2. Örnek hazırlanmasına ait detayların belirlenmesi
3. Dedektör seçiminin yapılması
4. Kromatografik ayırma koşullarının saptanması
5. Kromatografik ayırma koşullarının optimize edilmesi
6. Muhtemel problemler için özel çözüm işlemlerin saptanması
7. Rutin laboratuvar analizleri için metodun validasyonu

Elde edilen veriler analizi istenilen hassasiyette olanaklı hale getiriyorsa bir sonraki aşama olarak metodun yazılması yani tanımlanması gerçekleştirilir.

2.4. Validasyon

Validasyon, ürün kalitesine etki edebilecek tüm imkân ve işlemlerin önceden belirlenmiş spesifikasyonları sağlayacak şekilde işlendiğini garanti altına almak amacıyla yürütülen çalışmalardır [72]. Validasyon;

1. GMP kuralları (Good Manufacturing Practices) için yapılması gerekir.
2. Kaliteyi güvence altına alır, değişkenliği en aza indirger.
3. İyi kontrol edilmiş, güvenilir prosesler oluşmasını sağlar. Çünkü kimyasal sonuçlardan elde edilen bilgiler güvenilir olmalıdır.
4. Cihaz ve prosesler hakkında daha iyi bilgi sahibi olunmasını sağlar.
5. Bozuk çıkan malın imhası, yeniden işlem görmesi, yeniden numune alınması, ekstradan analiz yapılması gibi olaylardan dolayı maliyeti azaltır.
6. Verimliliği arttırır.
7. Organizasyon içinde bulunan birimlerdeki koordinasyon, iletişim ve bilgi akışını arttırır.

Validasyonun temel işlemleri, aslında yapılan tüm işi tanımlamaktır. Aynı zamanda, tanımlanan işlemi kanıtlamak ve bu kanıtlanan bulguları tekrarlayıp, sonuçları yorumlamaktır. Validasyon işlemi, tüm ürünlerin kalite kontrollerine uygulanabilir. Ülkemizde validasyon işlemi genellikle ilaç sektöründe geniş uygulama alanı bulmaktadır. İlaç endüstrisinde uygulanan validasyon çeşitleri:

Temizlik yöntemleri validasyonu: İmalat alanında bulunan tüm imalatla ilgili cihazların temizlenmesinde uygulanacak olan validasyon işlemleridir.

Analitik yöntem validasyonu: Analitik prosedürün kalitatif ve kantitatif olarak doğru sonuçlar verdiğini belirleyen çalışmalardır.

Makine/cihaz validasyonu: Cihazın doğru bir şekilde çalışıp çalışmadığını, fonksiyonlarını doğru bir şekilde yerine getirip getirmediğini gözlemlemek amacıyla yapılan çalışmalardır.

Proses validasyonu: Spesifik olarak bir ürünün araştırma kademesinden son ürün haline gelene kadar geçen sürede yapılan validasyondur [73].

2.4.1. Analitik yöntem validasyonu

Analitik yöntem validasyonu tasarlanmış analitik yöntemin kabul edilebilirliğini kanıtlamak ve aynı zamanda analitik prosedürün kantitatif ve kalitatif olarak doğru sonuçlar verdiğini belirleyen sonuçlar elde etmektir. Kısacası, analiz yönteminde kullanılacak olan tüm parametreleri ve yapılacak tüm işlemleri tanımlar [72].

Yöntem validasyonu hazırlanırken dikkat edilmesi gereken hususlar şunlardır:

1. Yöntem validasyonu, rutin çalışmalarda kullanılan örnek, reaktif veya standartların laboratuardaki deneyimlerini göstermeli
2. Kullanılan reaktifler ve standartlar, bileşenin saflığı ve doğruluğu için kontrol edilmeli
3. Bir validasyon planı hazırlanmalı ve adım adım hangi aşamaların yapılacağı belirtilmeli
4. Özel bir yöntemin validasyonu; örnekler ya da bilinmeyen örnek ile aynı özellik gösteren standartlarla laboratuvar deneylerinde çalışılmalı, hazırlık ve yürütme ve validasyon protokolü izlenmeli
5. Bir yöntemin validasyonu, analizin gerektirdiği koşullardan ayrılmamalı ve sapmamalı ve ayrıca yeni bir analitik yöntemin validasyonu ve geliştirilmesi bu süreç içinde tekrarlanabilir olabilmeli
6. Her validasyon çalışması sırasında yöntem anahtar parametreleri belirlenmeli ve sonra gelen bütün validasyon adımlarında bu parametreler kullanılmalı, her defasında tekrarlanan çalışmaları minimuma indirmeli ve yöntem koşulları sağlandıktan sonra bir sonraki çalışmalara geçilmelidir.

2.4.1.1. Analitik yöntem validasyonunda kapsam

Analitik yöntem validasyonu, yöntemin belirlenen amaç için uygun olduğunu ve yöntemin kapsamını göstermelidir. Aynı zamanda yöntemin performans özelliklerini de içermelidir. Yöntemin kabul edilebilir limitlerini içeren bir planda izlemelidir. Farklı tiplerde donanım ve yöntemin yürütüleceği yerin farklı koşullarda olduğunu da belirtmelidir. Farmakopede kayıtlı olan validasyon yöntemleri 3 grupta toplanır:

Etken madde analiz yöntemi: Hammadde veya bitmiş ürün içindeki koruyucu maddeler dâhil aktif maddenin tayininde kullanılan yöntemlerdir.

Safsızlık yöntemi: Hammaddedeki safsızlıkları veya bitmiş ürünlerdeki parçalanma ürünlerini tayin etmeye yarayan yöntemlerdir.

Bitmiş ürün analiz yöntemi: Performans özelliklerini tayin için kullanılan yöntemlerdir.

2.4.1.2. Analitik yöntem validasyon aşamaları

Analitik yöntem validasyonunda kimyasal ölçümlerden elde edilen verilerin doğruluğunu kanıtlayan delillerin sağlanması için adımların teker teker gerçekleştirilmesi gerekmektedir:

1. İlk olarak bir validasyon protokolü seçilir.
2. Uygulama ve amaç belirlenir, yöntemin kapsamı ve onun validasyon kriterleri belirlenir. Bu validasyon kriterleri önceden dikkat edilmesi gereken noktalar bölümünde belirtilen bileşenler, matrisler, analizin kalitatif yada kantitatif oluşu, tanıma ve miktar limitleri, çalışma aralığı, kesinlik ve doğruluk, donanım tipi ve analiz ortamıdır.
3. Validasyon deneyleri belirlenir.
4. Yöntem parametreleri ve kabul edilebilir limitler belirlenir.
5. Standart ve belirteç gibi materyaller belirlenir.

6. Yöntem parametreleri ve/veya kabul edilebilir kriterleri ayarlanır ve artık validasyon deneyleri uygulanmalıdır.
7. Revalidasyon kriterleri belirlenir ve gerekiyorsa yöntem yeniden valide edilir.
8. Analitik kalite kontrol denetimleri yöntemin rutini için belirlenir ve /veya sistem uygunluk testlerinin sıklığı ve tipi belirlenir.
9. Son olarak validasyon deneyleri raporlandırılır.

2.4.1.3. Analitik yöntem validasyon parametreleri

Validasyon deneylerinin sırası hakkında resmi bir yönerge yoktur ve en uygun sıra yöntemin kendi özelliğine bağlıdır. Yöntem validasyonu için parametreler, farklı kuruluşlarda, uluslararası komitelerde ve literatürlerde çeşitli şekillerde tanımlanmıştır. Bazı tanımlar farklı organizasyonlar arasında farklı şekildedir. Farmasötik uygulamalar için International Conference on Harmonization gibi bazı organizasyonlar tarafından belirlenen aşağıda sırasıyla verilen parametreler izlenmelidir [74].

- a. Seçicilik (spesifiklik)
- b. Doğrusallık
- c. Çalışma aralığı
- d. Doğruluk ve geri kazanabilirlik
- e. Kesinlik (tekrarlanabilirlik)

Laboratuvar içi tekrarlanabilirlik

Laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik

- f. Tutarlılık
- g. Nitel tayin limiti (LOD)
- h. Nicel tayini limiti (LOQ)
- i. Güvenilirlik

İlaç analizlerinde genel olarak 3 yöntem kullanılır:

1. Hammadde veya bitmiş ürün içindeki koruyucular dâhil aktif maddenin tayininde kullanılan yöntemler,

2. Hammaddedeki safsızlıkları veya bitmiş ürünlerdeki parçalanma ürünlerini tayin etmeye yarayan yöntemler,
3. Ürünün performans özelliklerinin tayini için kullanılan yöntemler.

Bu yöntemlerin amacına göre valide edilecek parametreler farklılık göstermektedir. Tablo 2.4.'de bu yönetime göre değişen parametreler gösterilmektedir.

Tablo 2.4. İlaç analizlerinde yöntemlere göre değişen parametreler

| Parametreler | 1. yöntem | 2. yöntem | | 3. yöntem |
|--------------------------|-----------|------------------------|-------|-----------|
| | | Kantitatif tayin testi | Limit | |
| Seçicilik | + | + | + | - |
| Doğrusallık | + | + | - | + |
| Çalışma aralığı | + | + | * | * |
| Doğruluk ve geri kazanım | + | + | - | * |
| Keskinlik | + | + | * | + |
| Tutarlılık | + | + | + | + |
| Tanıma limiti | + | + | + | * |
| Miktar tayin limiti | + | + | + | * |

(*) Spesifik testlere bağlı olarak gerekirse yapılır.

a. Seçicilik/ spesifiklik

Spesifiklik, genellikle tek bir analit için üretilen yönetime karşılıktır. Seçicilik ise birbirinden ayırt edilen ya da edilemeyen kimyasal içerikler için kullanılmıştır. Kısacası; katkı maddeleri, değişik interferanslar varlığında analitin doğru olarak ölçebilen seçiciliğini tanımlar. Sıvı kromatografisinde seçicilik optimum ayırma ve kolon koşullarının seçimiyle elde edilmiştir. Seçiciliğin üstünlüğü, kullanılan analiz yönteminde sadece o etken maddeye özgü ve spesifik olduğunu ifade etmelidir. Bizim yöntemimiz sadece etken maddeyi ölçebilmeli ve diğerleri ile reaksiyon vermemelidir. Burada amaç, ilacın içindeki yardımcı maddeler ile etken maddenin ve bilinen bozunma ürünleri veya safsızlıkların birbirinden ayrı bir şekilde tanımlanabilir olmasıdır. Bunun için özellikle LC'de (Sıvı Kromatografisi) uygun kolon ve kromatografi koşulları (mobil faz bileşimi, kolon sıcaklığı ve dedektör dalga boyu gibi) seçilmelidir [75].

b. Doğruluk ve geri kazanabilirlik

Doğruluk, yöntem ile elde edilen test sonuçlarının gerçek değerde uygunluğunun bir ölçüsüdür. Doğruluk değerlendirilmesi ise birçok yolla elde edilebilir.

Referans yöntemi ile numune yönteminin karşılaştırılması bir yoldur. Bu yaklaşımda, referans yönteminin belirsizliği bilinmektedir.

Doğruluk, konsantrasyonları bilinen bir numunenin analizi yolu ile de tayin edilebilir. Örneğin; bir sertifikalı numune ve ölçülmüş doğru değer kıyaslanır. % geri kazanım, bulunan sonuçların gerçek değere yakınlığının ölçülmesidir. Elimizde sertifikalı örnek bulunmuyorsa, boş numune matrisine konsantrasyonu bilinen hacimde ve ağırlıkta analit eklenir. Sonra matristen, analitin ekstraksiyonu sonucu elde edilen analitin standart çözeltilere göre geri kazanımları hesaplanır. Bu sayede plaseboya ilave edilen etken maddenin tam olarak geri kazanıp kazanılmadığı anlaşılır. Elde edilen geri kazanım değerleri % 100 ± 3 limitleri içinde olmalıdır. Ama analit konsantrasyonu çok düşük olduğu zaman bu sınır genişler. Beklenen geri kazanım, numune matrisine, işleme konulan örneğe ve analit konsantrasyonuna bağlıdır. Bu doğruluk değerlendirilmesi numune preparatın etkinliğini ölçmektedir [73].

c. Kesinlik

Bir yöntemin kesinliği, birkaç kez enjeksiyon yapıldığında sonuçların birbirine uygunluk derecesidir. Yani homojen bir karışımdan, kısa aralıklarla birden fazla numune alındığında elde edilen sonuçların birbiriyle uyumlu olmasıdır. Bir yöntemin kesinliği genellikle test sonuçlarının RSD (Bağıl Standart Sapma)'si ile ölçülmüştür. Bu standart sapmalar 3 kategoride toplanmıştır:

Tekrarlanabilirlik: Bir analistin laboratuarda bir cihaz ile kısa zamanda analizi gerçekleştirdiğinde elde edilen sonuç tutarlılığıdır. En azından 5 yada 6 saptama, 3 farklı matris, 2 yada 3 farklı konsantrasyon ile analiz gerçekleştirilmeli ve % RSD hesaplanmalıdır. Kesinlik için kabul edilebilir kriter, yapılan bir çok tip analizin

türüne bağlıdır. Farmasötik analizlerde kalite kontrolde % 2 RSD kolayca başarılır. Oysa biyolojik numunelerde duyarlılık konsantrasyon limitlerinde yaklaşık % 15 ve diğer konsantrasyon düzeylerinde % 10'dur. Çevresel ve gıda numunelerinde kesinlik matrikse, analit konsantrasyonuna ve analiz tekniklerine bağlıdır. RSD % 2-20 arasında değişmektedir.

Laboratuvar içi tekrarlanabilirlik: Laboratuvar içi tekrarlanabilirlik, haftalar boyunca aynı laboratuvarda yapılan bir yöntemin karşılaştırılması ile belirlenmiştir. Aynı laboratuvarda farklı analistlerle, farklı cihazlarla, farklı standartlar, farklı kolonlar kullanılarak veya bunların kombinasyonları yapılarak aynı analiz farklı günlerde yapılmıştır. Bir yöntemin laboratuvar içi tekrarlanabilirliği, farklı operatörler, farklı firmalar, farklı aletler, farklı standartlar, farklı belirteçler ya da bunların farklı kombinasyonları ile elde edilen sonuçlarda uyumsuzluk gösterebilmiştir. Laboratuvar içi tekrarlanabilirlik validasyonunun amacı; analiz sona erdiğinde aynı laboratuvarda, yöntemin aynı sonuçları doğrulamış olmasıdır.

Laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik: Laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik, farklı laboratuvarlardan elde edilen kesinlik sonuçlarını göstermektedir. Amacı farklı laboratuvarlardan elde edilecek sonuçları sağlayacak yöntemleri doğrulamaktır. Bir analitik yöntemin laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliği, farklı laboratuvarlarda, farklı analistlerle, farklı işlevsel ve çevresel şartlar altında ama aynı belirli yöntem parametreleri ile analiz edilerek belirlenmiştir. Eğer yöntem farklı laboratuvarlarda kullanılacaksa validasyonu önemlidir. Bir yöntemin laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliğini etkileyen faktörler:

Oda içindeki sıcaklık ve nem farklılıkları,

Farklı tecrübe ve farklı gayretteki analistler,

Farklı özellikteki donanım (Örneğin; YPSK'deki alıkonma hacmi)

Malzeme ve aletlerdeki koşulların varyasyonları, (Örneğin; YPSK'deki mobil faz karışımı, pH, akış oranı v.b. gibi)

Farklı şirketlerin kolonları

Çözücüler, belirteçler ve farklı kalitedeki aletler olarak belirlenmiştir [75].

d. Tutarlılık

Bir analiz yönteminin tutarlılığı, analiz numunesinin uzun zaman aralıklarında farklı koşullarda analizi yapıldığında, bu değişikliklerden etkilenip etkilenmemesinin bir ölçüsü olarak tanımlanmıştır. Yani normal koşullarda, farklı kişiler veya farklı laboratuarda elde edilen sonuçların ölçülmesidir.

e. Nitel tayin limiti

Saptanan fakat miktarının ölçülmesinin gereksiz olduğu numunedeki etken maddenin % 95 ya da % 99 güvenilirlik sınırı içinde teşhis edilebildiği minimum miktarı olarak tanımlanmıştır. Genellikle bu seviyelerde güvenilir ve kantitatif sonuçlar elde edilemediği görülmüştür. Kromatografi için 2 ya da 3 katı gerektiği saptanmıştır.

f. Nicel tayin limiti

Bir maddenin % 95 güvenilirlik sınırı içinde tayin edilebilen minimum miktarı olarak tanımlanmıştır. Yani bu miktar, analiz koşullarına, kabul edilebilir kesinlik ve doğruluk değerlerine sahip olan tayin edilebilecek en düşük konsantrasyondaki madde miktarıdır da denilebilir. Bu parametre, özellikle hammadde veya bitmiş ürünlerdeki safsızlık, parçalanma ürünü gibi düşük miktarlardaki maddelerin analizinde önem taşımaktadır. Kromatografide kesin ölçüm veren minimum enjeksiyon miktarı olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda kromatografide tipik olarak zemin gürültüsünden 10-20 katı daha yüksek bir pik gerektirdiğinde belirlenmiştir.

g. Güvenilirlik

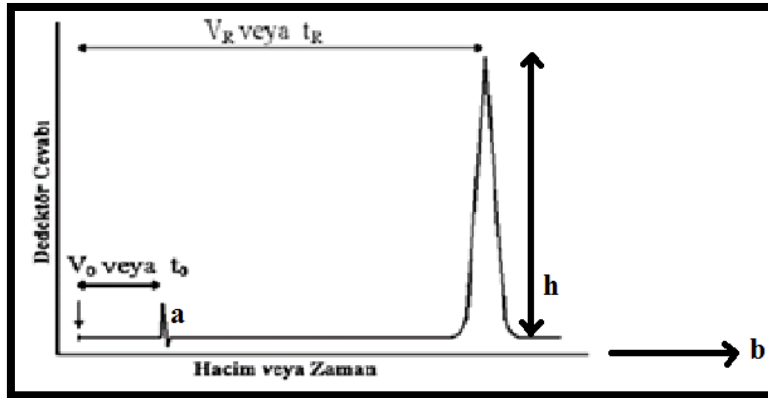
Güvenilirlik testleri, yöntemde ufak değişiklikler yapıldığı zaman sonuçların yine de uygun olduğunu göstermek için yapılmıştır. ICH dökümanlarına (Uluslararası Harmonizasyon Konferansı) göre ilaç geliştirme aşamaları sırasında yöntem üzerinde güvenilirlik değerlendirilmesinin düşünülmesi tavsiye edilmiştir [76].

2.5. Sistem Uygunluk Testleri

Kromatografik yöntemlerin kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikte olduğunu belirten “Sistem Uygunluk Testleri (SUT)” için gerekli işlem ve hesaplamalar yöntem geliştirilmesi ve validasyon işlemlerinin tamamlanmasından sonra veya işlemler sırasında yapılır [77]. Avrupa Farmakopesi tarafından tanımlanan SUT parametreleri:

- Teorik tabaka sayısı (N)
- Kuyruklanma faktörü (T)
- Kapasite faktörü (k')
- Seçicilik faktörü (α)
- Ayırım gücü (R_s)
- Pik yüksekliği veya alanının % bağıl standart sapması
- Cihaz tekrarlanabilirliği

Kromatogram parametreleri Şekil 2.2.'de gösterilmiştir:



Şekil 2.2. Kromatogram parametreleri

b: Baseline (Temel çizgi)

h: Pik Yüksekliği

a: Kolonda tutulmamış numune piki

t_0 : Hareketli fazın alıkonma zamanı, kolon ölü zamanı

t_R : Maddenin alıkonma zamanı (numunenin enjekte edildiği zaman ile kaydedicide maksimum konsantrasyonda saptandığı zamana kadar geçen süre)

V_0 : Hareketli fazın alıkonma hacmi, ölü hacim

V_R : Maddenin alıkonma hacmi (numuneyi elüe etmek için kolondan geçen çözücü hacmi)

V_S : Sabit fazın alıkonma hacmi

a. Dağılma (partisyon) katsayısı (K)

Dağılma kromatografisiyle bir karışımdaki maddelerin farklı iki faz (hareketli faz ve durgun faz) arasındaki farklı çözünmelerinden yararlanılarak birbirlerinden ayrılması gerçekleştirilebilmektedir. Bütün bu ayırma işlemlerinde etkili olan parametre, çözünenlerin hareketli ve durgun sıvı faz arasındaki dağılma (partisyon) derecesini temel alır. A çözüneni için söz konusu denge, aşağıdaki eşitlikle (Formül 2.1) gösterilebilir:

$$A \text{ hareketli} \leftrightarrow A \text{ sabit} \quad (2.1)$$

Bu reaksiyonun denge sabiti K'ya, dağılma (partisyon) oranı veya dağılma (partisyon) katsayısı adı verilir. Dağılma katsayısı (K), analitin sabit fazdaki molar derişiminin (C_S), analitin hareketli fazdaki molar derişimine (C_M) oranlanması ile hesaplanır (Formül 2.2).

$$K = C_S / C_M \quad (2.2)$$

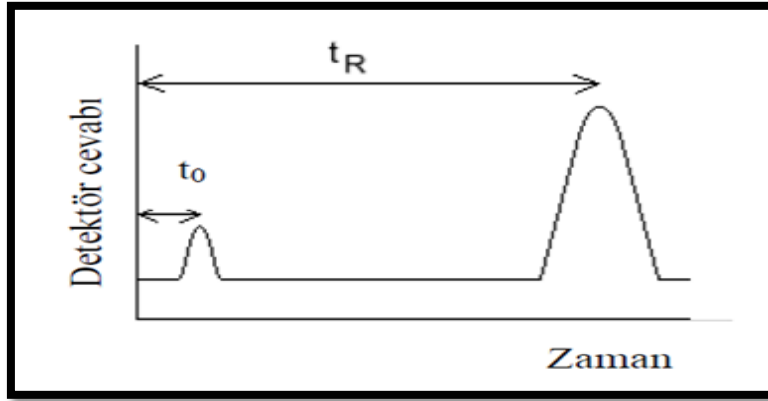
İdeal olarak çözünen madde derişimlerinin geniş aralıkta dağılma oranı sabittir. Diğer bir deyişle; C_S doğrudan C_M ile orantılıdır [60,78].

b. Alıkonma (retention) zamanı (t_R)

Alıkonma zamanı (t_R) numune enjeksiyonundan sonra analitin dedektöre ulaşması için geçen zamana denir. Numune enjeksiyonundan sonra gelen pik için, pik süresi ölü zaman olarak adlandırılır ve t_0 ile gösterilir. Ölü zaman, hareketli fazın ortalama göç hızını verir ve analit piklerinin tanınmasında önemli rol oynar. Numune içinde

veya hareketli fazda çoğu zaman kolonda tutulmayan bir tür olabilir. Yoksa bile diğer piklerin tanınmasına yardımcı olmak için böyle bir tür ortama katılabilir.

Şekil 2.3.'teki sağ taraftaki pik bir analit türüne aittir. Numunenin enjeksiyonu ile bu pikin dedektöre ulaşması için geçen süreye alıkonma (tutulma) zamanı denir ve t_R simgesiyle gösterilir.



Şekil 2.3. Tek bileşenli bir karışım için tipik bir kromatogram

t_0 : Hareketli fazın alıkonma zamanı

t_R : Maddenin alıkonma zamanı

Alıkonma zamanı yerine alıkonma hacmi terimi de (V_R) kullanılmaktadır. Bir bileşenin sabit fazdan elüe olması için gereken hareketli faz hacmine alıkonma hacmi denir.

Hacim akış hızı (F), birimi $\text{cm}^3/\text{saniye}$ veya $\text{cm}^3/\text{dakika}$ olup, maddenin alıkonma zamanının alıkonma hacmine bölünmesiyle hesaplanır (Formül 2.3).

$$F = V_R / t_R \quad (2.3)$$

Lineer akış hızı (U), hareketli faz moleküllerinin ortalama doğrusal hızıdır. Birimi cm/saniye olup kolon uzunluğunun (L) hareketli fazın alıkonma zamanına (t_0) bölünmesiyle hesaplanır. Lineer akış hızı, kolonun enine kesitinden bağımsız olup,

çözücü moleküllerinin kolon boyunca hareketleri sırasındaki ortalama hızlarını gösterir (Formül 2.4).

$$U = L / t_0 \quad (2.4)$$

Analitin kolon içerisinde hareketi esnasında ortalama göç hızı V ; kolon dolgusunun uzunluğu (L) ve maddenin alıkonma zamanından (t_R) hesaplanır (Formül 2.5).

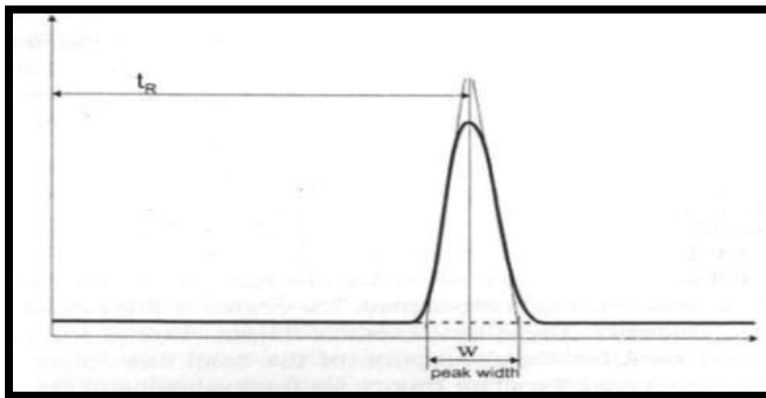
$$V = L / t_R \quad (2.5)$$

Kromatografik parametrelerden biri olan dağılım katsayısı K ile maddenin alıkonma hacmi (V_R) doğrudan ilişkilidir. Bu eşitlikte V_0 kolondaki hareketli faz hacmi, V_S kolondaki sabit faz hacmidir (Formül 2.6).

$$V_R = V_0 + KV_S \quad (2.6)$$

c. Teorik tabaka sayısı (N)

Kolonun en önemli parametresidir. Kolondan çıkan pikin sivri ve dar olması ve piklerin birbirlerinden iyi ayrılması ile ilgilidir (Şekil 2.4.). N 'in sayısal değeri, analizi yapılan maddenin cinsine bağlı olduğu gibi, deney koşullarına, akış hızı, sıcaklık, kolon kalitesi ve dolunun tek biçimliliği gibi çeşitli faktörlere de bağlıdır. Tavsiye edilen değer $N > 2000$ 'dir. Formül 2.7' de gösterildiği gibi hesaplanır.



Şekil 2.4. Teorik tabaka sayısı için kromatogram

$$N = 16 (t_R/W)^2 \quad (2.7)$$

t_R : Maddenin alıkonma zamanı

W: Elde edilen pikin taban genişliği

d. Kapasite faktörü (k')

Kapasite faktörü (k') çözünen maddelerin kolonda göç hızlarını tanımlamakta yaygın olarak kullanılan önemli bir parametredir. Kapasite faktörü, hareketli faz ve durgun faz bileşimlerinin değiştirilmesiyle ayarlanabilir. Her maddenin kendine özgü bir kapasite faktör değeri vardır. Kolon performansı ve alıkonmanın uzun süreli tekrarlanabilirliği ile ilgilidir. Bir kromatografik ayırimda hesaplanan kapasite faktörü değerinden faydalanarak ayırım hakkında bilgi sahibi olunabilir. Kapasite faktörü, Şekil 2.5.'teki parametreler kullanılarak, Formül 2.8'de görüldüğü gibi hesaplanır.



Şekil 2.5. Kapasite faktörü için kromatogram

t_0 : Hareketli fazın alıkonma zamanı, ölü zaman

t_R : Maddenin alıkonma zamanı

V_0 : Hareketli fazın alıkonma hacmi, ölü hacim

V_R : Maddenin alıkonma hacmi

$$k' = (V_R - V_0) / V_0 \quad (2.8)$$

Akış hızı sabitse, kapasite faktörü Formül 2.9'da görüldüğü gibi hesaplanabilir:

$$k' = (t_R - t_0)/t_0 \quad (2.9)$$

Kapasite faktörü, maddenin hareketli ve sabit faz arasındaki dağılım katsayısına bağlıdır (Formül 2.10).

$$k' = K V_S/V_0 \quad (2.10)$$

t_R ve t_0 değerleri kromatogramlardan kolayca bulunur. Çözünen bir madde için kapasite faktörü birden çok küçük ise, ayrılma hızlı gerçekleşir ve alıkonma zamanının doğru olarak belirlenmesi zor olur. Öte yandan kapasite faktörü 20-30 gibi bir sayıdan daha büyük olursa, ayrılma zamanı gereksiz bir şekilde uzun olur. İdeal bir ayırma da kapasite faktörü değerinin 1-5 arasında olması gerekmektedir.

e. Seçicilik faktörü (α)

Bir karışımdaki iki maddenin ayırımını değerlendirmek için kullanılır ve bir kolonun söz konusu maddeleri ne kadar iyi ayıracağıнын bir ölçüsüdür. A ve B bileşenli bir karışımda seçicilik faktörü (α), her iki bileşenin kapasite faktörü oranına eşittir (Formül 2.11).

$$\alpha = k'. B / k'. A \quad (2.11)$$

$k'. B$: Daha kuvvetli tutunan veya alıkonma zamanı uzun olan maddenin kapasite faktörü

$k'. A$: Daha az kuvvetle tutunan veya alıkonma zamanı kısa olan maddenin kapasite faktörü

Seçiciliği etkileyen ana faktör sabit fazdır. Hareketli fazın bileşimi ve az da olsa sıcaklık da seçiciliği etkiler.

Deneysel bir kromatogramdan α 'yı belirlemek için aşağıdaki eşitlik kullanılmaktadır (Formül 2.12):

$$\alpha = [(t_{R})_B - t_0] / [(t_{R})_A - t_0] \quad (2.12)$$

$(t_{R})_A$: 1. maddenin alıkonma zamanı

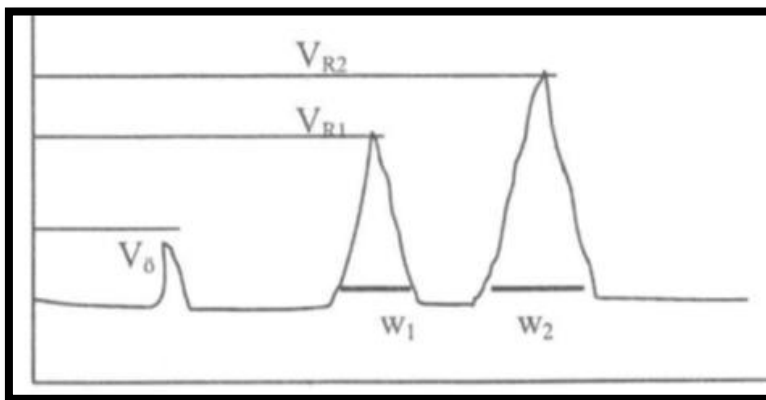
$(t_{R})_B$: 2. maddenin alıkonma zamanı

t_0 : Hareketli fazın alıkonma zamanı

İki pikin elde edildiği sistemlerde kullanılır. Genel olarak bu değerin 1'den büyük olması istenir.

f. Ayırım gücü (R_s)

Kromatografide amaç karışım içindeki maddeleri ayırmaktır. Ayırıcılık terimi (R_s) bu amacın ne derecede gerçekleştiğinin bir ölçütüdür. Birbirini takip eden 2 adet bileşene ait piklerin birbirinden ayırılmalarının başarısını (oranını) gösterir. Takip eden pikler için iyi bir çözünürlükten bahsedebilmek için hesaplanan R değerinin 1-1,5 civarında olması istenir. Genellikle 5 veya daha az madde içeren numunelerde bu değerin 1,5'dan büyük olması kolaylıkla sağlanabilir. Bu sonuç, maksimum kesinliğin göstergesidir. Ayırım gücü, bir kolonun eskiliğini, günler arası ayırım şartlarındaki değişiklikleri gösterir. Ayırım gücü Şekil 2.6.'daki parametrelerden yararlanılarak aşağıdaki gibi hesaplanır (Formül 2.13).



Şekil 2.6. Ayırım gücü için kromatogram

t_1 : 1. bileşenin alıkonma zamanı

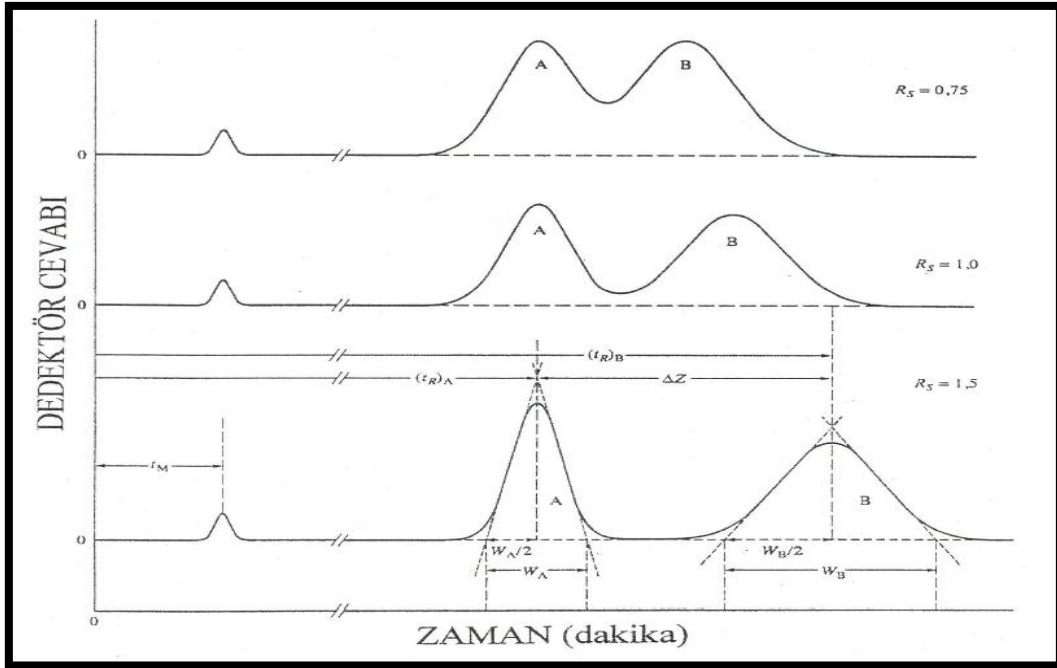
t_2 : 2. bileşenin alıkonma zamanı

W_1 : 1. bileşenin taban genişliği

W_2 : 2. bileşenin taban genişliği

$$R_s = 2(t_2 - t_1) / (W_1 + W_2) \quad (2.13)$$

Genel ayırımlarda bu değer 2'nin, miktar tayini çalışmalarında 1,5'un, biyolojik sıvılardan yapılan çalışmalarda 1,2'nin üstünde olması kabul edilebilir değerlerdir. Nicel analizler için pikler arasındaki ayırıcılığın 1,5'den büyük ($R_s \geq 1,5$) olması önerilir (Şekil 2.7.).



Şekil 2.7. Rezolüsyon faktörünün kromatogramlara göre değişimi

g. Kolon verimi

Başarılı bir kromatografinin amacı verimli bir ayırım ve dar bir kromatografik bant elde etmektir. Kromatografik kolon verimliliklerinin kantitatif ölçümünde birbiriyle bağıntılı iki terim sıkça kullanılır:

1. Tabaka yüksekliği, H (Plate Height)
2. Teorik tabaka sayısı, N (Number of Theoretical Plate)

Bu ikisi arasındaki bağıntı aşağıdaki eşitlikle verilir (Formül 2.14):

$$N = L / H \quad (2.14)$$

L : Kolon dolgu uzunluğu (cm)

Kromatografik kolonun verimliliği teorik tabaka sayısı arttıkça ve teorik tabaka yüksekliği azaldıkça artar. Hareketli ve durgun fazların bileşimi, kolon dolgu maddesinin tanecik büyüklüğü ve kolon çapına bağlı olarak kolonun tipi kolon verimliliğine etki etmektedir. Kolon dolgu maddesinin tanecik çapı küçüldükçe, kolon tabaka sayısı artmakta ve bu da kolon verimliliğini artırmaktadır.

Kromatografik kolondaki ayırma olaylarına matematiksel yaklaşım, 1950'li yıllarda Hollandalı kimya mühendisi Van Deemter'in kendi adı ile anılan eşitliğin bulunması ile sonuçlanan incelemeleri ile başlamıştır (Formül 2.15).

$$H = (A + B)/(u + C_u) \quad (2.15)$$

H: Teorik tabaka yüksekliği (cm)

A: Çoklu akış yolları ve Eddy difüzyonu

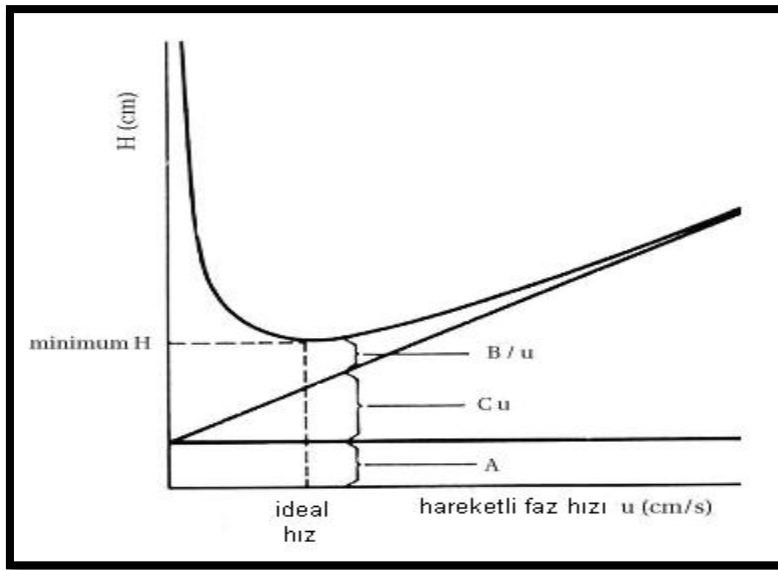
B: Boyuna difüzyon

C_u: Fazlar arasındaki kütle aktarımı

u: Çizgisel hız

Bir kromatografi kolonunun verimli çalışması için önce bu kolon için kullanılacak optimum akış hızının saptanması gerekir. H değerinin küçültülmesi için bir dizi önlem alınarak kolonun etkinliği artırılabilir. Formül 2.15'teki akış hızından bağımsız olan A değeri, madde moleküllerinin kolonda ilerlerken farklı yollar izlemesi nedeniyle büyür. Farklı uzunluktaki yolları izleyen madde moleküllerinin kolonda hızları da farklı olur. Bütün moleküllerin kolonun sonuna ulaşmasında

bantta genişleme gözlenir. Bu olaya “Eddy Difüzyonu” denir. Kolon dolgu maddesinin çok küçük tanecikli olarak alınması ile A 'nın değeri küçültülebilir. Formüldeki ikinci terim boyuna difüzyon terimi olup özellikle düşük akış hızlarında önem kazanır. Bu terimin katkısı, bileşenlerin hareketli faz içindeki difüzyon katsayılarının değerleri ile doğru orantılı olarak artar. B 'nin değeri kolon sıcaklığının azaltılması ile küçülür. Kolona basınç uygulayarak da B 'nin değerinin küçültülmesi mümkündür. Formülün üçüncü terimi yüksek akış hızlarında önem kazanan kütle aktarımı terimidir. Akış hızı arttıkça bileşenlerin iki faz arasında dağılma dengelerine ulaşabilmeleri için gereken süre azalır ve dolayısı ile dağılma dengesine tam olarak erişilemez. Bu terimdeki C değerinin küçültülebilmesi için hareketli sıvı fazın viskozitesinin az olması, kolon sıcaklığının artırılması, sabit faz ince bir sıvı film ile kaplıysa bu filmin kalınlığının çok küçük bir değere sahip olması gerekir (Şekil 2.8).



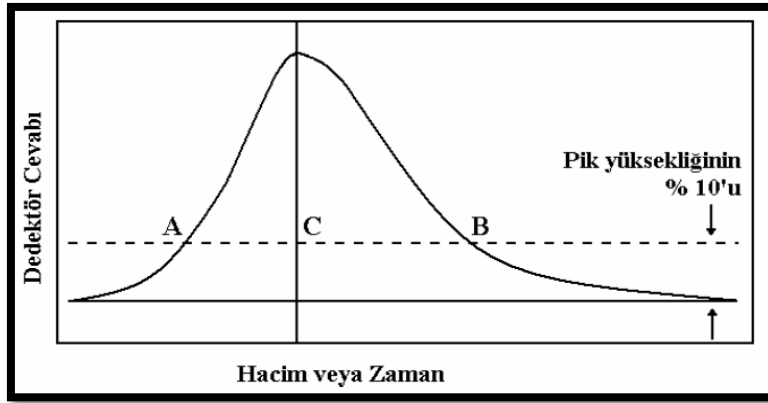
Şekil 2.8. Van Deemter eğrisi

h. Kuyruklanma faktörü (T) ve pik asimetri faktörü (A_S)

Bu faktör pikin simetrik olması ile ilgilidir. Çalışmalarda daima simetrik pikler seçilmelidir. Simetrik olmayan piklerde;

1. Doğru olmayan tabaka sayısı ve ayırım gücü sonuçları
2. Kararlı olmayan miktar tayinleri

3. Gözlemlenemeyen pik kuyruklanmaları
4. Alıkonmanın tekrarlanabilirliğinin düşük olması gibi sorunlarla karşılaşılır.



Şekil 2.9. Pik asimetri oranının hesaplanması

Pik asimetri oranının hesaplanması aşağıdaki eşitlikle verilir (Formül 2.16):

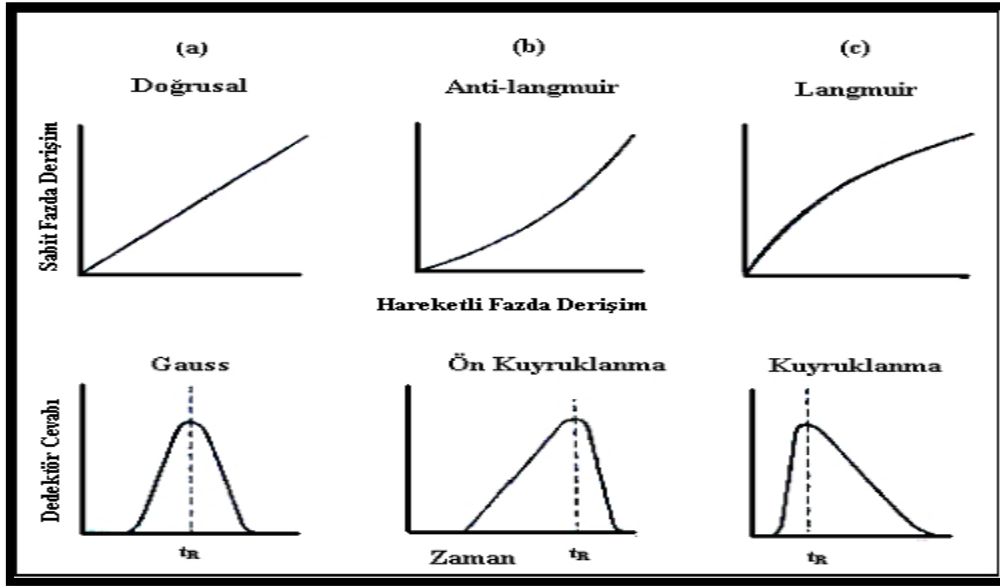
$$A_s = (CB / AC) \quad (2.16)$$

CB ve AC uzunlukları Şekil 2.9'da tanımlanmıştır.

Pik asimetrisi taban yüksekliğinin % 10'u civarında, kuyruklanma faktörü ise % 5'i civarında ölçülür. Tam simetrik bir pik için $A_s = 1$ ' dir. Pratikte 0,9-1,2 arasında A_s değerleri kabul edilmektedir. Kuyruklanma faktörü için uygun değerler ise 2'nin altındaki değerlerdir.

Genel olarak bir kromatogramda geç gelen pikler önce gelen piklere nazaran daha yayvan ve geniş olurlar. Alıkonma zamanının artması pik şeklinin bozulmasına neden olabileceğinden, bir pikin geç gelmesi istenen bir durum değildir. Böyle durumlarda pik şeklinde kuyruklanma da gözlenebilir. Alıkonma zamanının öne alınmasında hareketli faz bileşimi ve akış hızı değiştirilebilir ya da gradient elüsyon işlemi uygulanabilir.

Analitin hareketli fazdaki denge derişimi (CM) sabit fazdaki denge derişimine (Cs) karşı grafiğe geçirildiğinde bir dizi izoterm elde edilir.



Şekil 2.10. Temel üç izoterm şekilleri ile alıkonma zamanı ve pik şekline etkileri

Şekil 2.10 a'daki izoterm doğrusal olup eğimi dağılım katsayısını (K) verir. Bütün C_M değerlerinde K sabit olduğu için kromatografik bant bütün derişimlerde aynı hızda hareket eder ve simetrik bir elüsyon piki elde edilir.

Dışbükey izoterm (Şekil 2.10 b), kolonda fazla miktarda madde olduğunu gösterir. Bu durumda sabit fazdaki madde-madde etkileşmeleri, madde-çözücü etkileşmelerinden daha baskındır. Bu durum K değerinin artmasına ve doğrusal olmayan izoterm elde edilmesine neden olur. Elüsyon eğrisinin önünde bir alan oluşur. Bu duruma ön kuyruklanma denir ve ayrılan maddenin alıkonma süresi derişimle artar.

Eğer moleküller arası kuvvetler maddeyi sabit faz yüzeyinde bir katman oluşturacak biçimde tutuyorsa izoterm içbükey olur (Şekil 2.10 c) ve elüsyon eğrisinde pik kuyruklanması görülür, böylece artan madde derişimiyle alıkonma zamanı azalır.

Doğrusallıktan sapma nicel analizi güçleştirdiği ve alıkonma sürelerinin nitel analizde kullanımını engellediği için kromatografik koşullar simetrik elüsyon piki sağlanacak şekilde düzenlenir. Pik simetrisinin belirlenmesi için pik asimetri oranının hesaplanması, madde elüsyon pikinin çan (Gauss) eğrisi olup olmadığının denetlenmesi açısından önemlidir.

1. Kolon performansının optimizasyonu

İstenilen ayırmayı sağlamak için optimum koşullar araştırılırken α , k' ve N (veya H) gibi temel parametrelerin az ya da çok birbirinden bağımsız olarak ayarlanabileceği unutulmamalıdır. Böylece α ve k' , en kolay sıcaklık ve hareketli fazın bileşimindeki oynamalar ya da değişik bir kolon dolgusu kullanılarak değiştirilebilir. Herhangi bir çalışmada, teorik tabaka sayısı, kolon boyunun değiştirilmesi, tabaka yüksekliği, hareketli fazın akış hızı, kolon dolgu maddesi tane büyüklüğü, hareketli fazın viskozitesi ve sabit fazı oluşturan absorbe edilmiş sıvı filmin kalınlığı gibi parametreler değiştirilerek iyi bir ayırım gerçekleştirilebilir.

Kromatografik çalışmalarda deney koşulları, bir karışımın bileşenlerini en kısa sürede net bir şekilde ayıracak biçimde optimize edilerek belirlenir. Optimizasyon deneyleri:

1. Bant genişlemesini azaltmak
2. Bileşiğin rölatif göç hızını değiştirmek amacıyla yapılır.

Bant genişlemesi ve dolayısıyla kolon verimliliğinin kaybı, çözünen bileşenlerin kolon içerisinde göçleri sırasında yeralan çok sayıda kütle-aktarım işlemlerinin belli hızlara sahip oluşunun bir sonucudur. Bu hızları etkileyen bazı değişkenler denetlenebilir ve ayırmaları iyileştirmek için kullanılabilir.

i. Cihaz, pik alanı veya yüksekliğinin tekrar edilebilirliği (% bağıl standart sapma)

En az 6 defa tekrarlanan deneyler sonucu elde edilen pik alanı veya yüksekliklerinin bağıl standart sapmalarının hesaplanması ile elde edilir. Genel ayırımlarda % bağıl standart sapma değerinin 1,5'un, biyolojik sıvılardan yapılan çalışmalarda 5,0'ın altında olması ve eser madde miktar tayininde 5-15 arasında olması istenen değerlerdir. Cihaz tekrarlanabilirliği için alıkonma zamanlarının % bağıl standart sapmasının 5'den daha çok sayıda tekrar edilen enjeksiyonlar için % 1'den küçük olması istenir.

2.6. Spektroskopi

Işın-madde etkileşmesini inceleyen bilim dalına spektroskopi denir.

UV-GB bölgedeki her geçişe karşı farklı bir dalga boyu absorplanır. Absorplanan ışığın miktarı absorbans olarak ölçülür. Absorbans molekülün yapısına, ışığın dalga boyuna, ışığın çözelti içinde aldığı yolun uzunluğuna ve çözelti derişimine bağlıdır.

Bilinen artan derişimlerdeki çözeltilerin absorbansları ölçülüp, derişim absorbans grafiği çizerek bir kalibrasyon doğrusu elde edilir. Bilinmeyen derişimdeki maddenin aynı şartlarda absorbansı okunarak kalibrasyon doğrusu yardımıyla derişimi bulunabilir.

2.6.1. UV-GB spektroskopisinin nicel kullanımı

Ultraviyole ve görünür bölge absorpsiyon spektrometrisi, kimyacıların nicel analizlerde en çok yararlandıkları yöntemlerden biridir.

Spektrofotometrik ve fotometrik yöntemlerin başlıca özellikleri:

Yaygın uygulanabilirlik: Pek çok sayıda inorganik, organik ve biyokimyasal madde, ultraviyole ve görünür ışınları absorplar ve bu yüzden doğrudan nicel tayinleri mümkündür. Pek çok madde de, kendisi absorpsiyon yapmasa da absorplayıcı türevlere dönüştürülerek tayin edilebilir. Klinik laboratuarlarda yapılan analizlerin %90'ı ultraviyole ve görünür bölge spektroskopisine dayanmaktadır.

Hassasiyet: Absorpsiyon spektroskopisinin tipik tayin sınırları 10^{-4} M, 10^{-5} M arasındadır, işlemlerde bazı iyileştirmelerle bu sınırların 10^{-7} M'a indirilmesi de mümkündür.

Orta yüksek seçimlilik: Analitin tek başına absorpsiyon yaptığı bir dalga boyu bulunabilirse, ön ayırmalara gerek kalmaz. Ayrıca, kimi hallerde, başka bir maddenin

absorbansı ile analitinki örtüşse bile, başka dalga boylarında da ölçüm yapılarak bir ayırma işleminden kaçınılabılır.

Yüksek doğruluk: Ultraviyole/görünür bölge spektrofotometrik veya fotometrik ölçümleri sonucu elde edilen derişim değerlerinin bağıl hatası %1-5 arasındadır. Özel önlemler alınarak bu hatalar binde birkaç mertebesine indirilebilir.

Kolaylık ve rahatlık: Modern cihazlarla, spektrofotometrik ve fotometrik ölçümler kolaylıkla ve hızlı bir şekilde yapılabilir. Ayrıca bu yöntemler otomasyona da uygundur.

2.6.2. Spektrofotometre

Spektrofotometreler; bir maddeden yansıyan ışığın dalga boyunu (çözeltiden geçen veya çözeltinin tuttuğu ışık miktarından faydalanarak) ölçerek o maddenin rengini, konsantrasyonunu, kimyasal bileşimini ve moleköl yapısını ortaya çıkaran enstrümanlardır (Şekil 2.11.). Bu yöntemle renksiz çözeltilerin konsantrasyonu da ölçülebilir.

Temel mantığı, hazırlanan çözeltiden belirli spektrumlarda ışık geçirilmesi ve bu ışığın ne kadarının çözeltili tarafından absorblandığını bulunması esasına dayanır. Çözeltinin içerdiği madde miktarı ne kadar fazla ise daha fazla ışık, çözeltili tarafından soğurulur. Spektrofotometre, çözeltinin içinden geçebilen -çözeltili tarafından absorblanmayan- ışığın yoğunluğunu tespit ederek çözeltili içeriğindeki aranan maddenin miktarı hakkında kantitatif bilgi verir.

UV-görünür alan absorpsiyon ölçme cihazının (spektrofotometre) başlıca kısımları:

- a. Işık kaynağı
- b. Monokromatör (dalga boyu seçicisi)
- c. Örnek kabı
- d. Dedektör (algılayıcılar)
- e. Kaydedici



Şekil 2.11. UV-GB spektrofotometresinin şematik gösterimi

a. Işık kaynağı

UV-görünür bölgede D₂, W, H₂, Xe ark lambası, civa buhar lambası gibi sürekli ışık kaynakları kullanılır.

b. Monokromatör

Işık kaynağından gelen polikromatik ışıktan tek bir dalga boyunda monokromatik ışık elde edilmesini gerçekleştiren düzeneklerdir. Monokromatör, filtreli fotometrelerde ışık filtresidir; spektrofotometrelerde ise ışık prizmasıdır.

Işık filtreleri; camdan yapılmış ve uygun boylarla boyanmış filtrelerdir. Portatif olup kullanıcı istediği zaman uygun dalga boyundaki filtreyi cihaza takar. Filtrelerin üzerinde geçirdikleri dalga boyu yazılıdır. Filtrenin rengi, ölçüm yapılacak çözeltinin rengine göre seçilir; örneğin, mavi ışığı tutan (sarı) bir maddenin ölçümünde sadece mavi ışığı geçiren filtre kullanılır.

Işık prizmaları; cam veya kuartz olabilir. Özellikle düşük UV ışınları iyi geçirmediğinden cam prizma görünür bölge için uygundur. Kuartz prizmalar ise hem UV ışınlarını iyi geçirir, hem de görünür ışık ve IR'e yakın bölgelerde çalışmaya elverişlidir. Kuartz prizmalar pahalı spektrofotometrelerde bulunur.

c. Örnek kabı

Çözelti ve çözücü koymaya yarayan şeffaf kaplar ve bunların yerleştirildiği bölmelerdir; kuartz olabilir.

d. Dedektör

Maddenin ışığı absorplayıp absorplamadığını anlamak için ışık kaynağından gelen ışığın şiddetinin ölçülmesi amacıyla kullanılan düzendir. Işıma enerjisini elektrik enerjisine dönüştüren kısımdır.

UV-görünür bölgede kullanılabilen üç tür dedektör vardır:

1. Fotovoltaik dedektörler
2. Fototüp
3. Fotoçoğaltıcı tüp

e. Kaydedici

Dedektörde dönüştürülen enerjinin değerini gösteren cihaz, dalga boyunu ve ışınım şiddetini gösteren göstergedir (ışık şiddeti & dalga boyu grafiği yada spektrum).

Spektrofotometre'nin çalışma prensibi:

İncelenecek örnek spektrometre ile fotometre arasına ve küvet olarak adlandırılan, genellikle sert plastikten ya da quartzdan yapılan özel tüp içine yerleştirilir. Farklı örnekler farklı dalga boylarını absorbladıkları için öncelikle bu aralığın bulunması gerekir. Maddenin absorpsiyon aralığı bulduktan sonra spektrometre ile bu aralıkta örneğe monokromatik -belirli bir dalga boyuna ait- bir ışın gönderilir. Spektrofotometreler gönderdiği ışığın dalga boyuna göre çeşitlidir. Gönderilen ışık, küvetin içindeki örnekten geçtikten sonra fotometreye ulaşır. Spektrometreden gönderilen ışık ile fotometreye ulaşan ışık arasındaki fark bize absorplanma miktarını verir. Absorplanan ışığın miktarı absorbans olarak ifade edilir. Absorbans maddenin cinsine, ışığın dalga boyuna, ışığın çözelti içinde aldığı yolun uzunluğuna ve çözelti derişimine bağlıdır.

Absorbans, Lambert-Beer Kanunu (Beer-Lambert teoremi)'nden hesaplanır (Formül 2.17).

$$A = \log_{10} (I_0/I_t) = \epsilon \cdot I \cdot C \quad \text{Beer-Lambert Teoreminden absorbans hesabı} \quad (2.17)$$

A: Absorbans

I_0 : Çözeltiye giren ışığın şiddeti, spektrometreden gönderilen ışığın yoğunluğu

I_t : Çözeltiden çıkan ışığın şiddeti, küvetten geçtikten sonraki ışığın yoğunluğu

ϵ : Çözünen maddeye ve ışığın dalga boyuna bağlı absorptivite katsayısı (L/mol.cm)

l: Işığın çözelti içinde aldığı yol (cm)

C: Çözelti derişimi (mol/L)

Spektrofotometre ile yapılan ölçümler sonucunda derişim-absorbans grafiği çizilebilir. Burada dikkat edilmesi gereken husus derişim-absorbans fonksiyonunun belirli bir değere kadar lineer daha sonra da negatif artış göstererek sabit bir değere yaklaşmasıdır. Bunun sebebi çözültideki madde miktarının belirli bir seviyeden sonra ışığın geçeceği aralıkların moleküller tarafından dolması, dolayısıyla da maddenin tüm ışığı absorblamasıdır.

2.6.3. Türev spektrofotometri

Deneysel eğrilerin ölçüm aletleri ile türevlerinin alınması oldukça eskiye dayanır ve 1920'lerde ilk defa Rutherford tarafından kütle spektrumlarının yorumlanmasında kullanılmıştır. Kuramsal temelleri ilk kez 1950 li yıllarda Hammond, Price, Morrison ve Giese tarafından ortaya konulan türev spektroskopisinin analitik kimyadaki önemi ve uygulamaları, türev spektrumlarının oluşturulması için gerekli matematiksel işlemlerin uzun ve güç olması nedeniyle ilk bulunduğu çok fazla ilgi görmedi, ancak 1970'li yıllardan itibaren analitik cihazların bilgisayar ile donanımından sonra büyük gelişme göstermiştir.

Türev spektroskopisinin UV-GB absorpsiyon spektrofotometrisinde kullanılması ile benzer spektruma sahip kimyasal türlerin birarada buldukları örnekteki ortak

spektrumlarının eğimsel değişmelerini ortaya çıkaracak şekilde dördüncü dereceye kadar türev alınarak farklılıklar yapılabilmektedir. Yöntemin ön işlem gerektirmemesi, turbidimetrik nedenlerin etkilerinin olmaması ve girişimlere olanak vermemesi önemli üstünlükleridir. Yöntemin en zayıf yanı olan yüksek türev derecelerinde sinyal/gürültü oranının kötüleşmesi sorunu ise, smoothing (düzeltme) uygulanarak ortadan kaldırılmaya çalışılmaktadır.

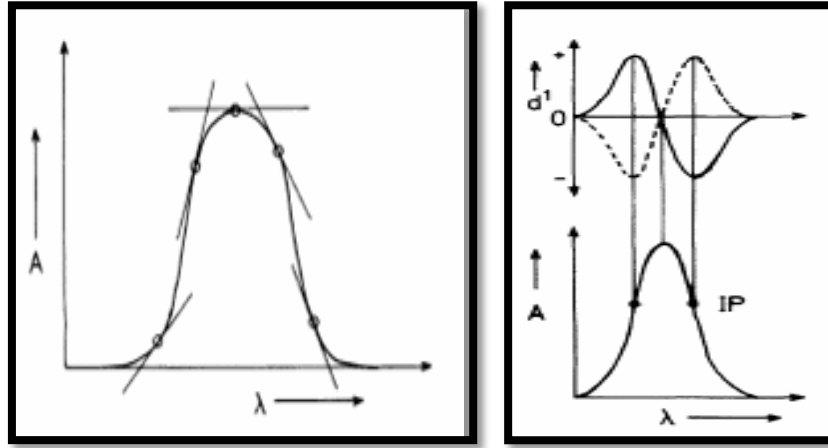
UV-görünür bölgedeki bir spektrum, madde üzerine gönderilen ışığın dalga boylarına karşı absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile elde edilir. x bağımsız, y bağımlı değişken olmak üzere, bir fonksiyonun herhangi bir noktasındaki türevi dx/dy 'dir. Absorpsiyon spektrumları söz konusu olduğunda türev $dA/d\lambda$ olacaktır. Spektrumun her bir noktasındaki türev değerleri hesaplanıp dalga boyunun bir fonksiyonu olarak grafiğe geçirildiğinde 1. türev absorpsiyon spektrumu elde edilir. Buna benzer şekilde 1., 2., 3...,n. türev spektrumları sırasıyla;

$$\frac{dA}{d\lambda}, \frac{d^2A}{d\lambda^2}, \frac{d^3A}{d\lambda^3}, \dots, \frac{d^nA}{d\lambda^n} \quad (2.18)$$

değerleri ile dalga boyları arasında oluşturulabilir (Formül 2.18). Eğer bu türev değerleri dalga boyuna karşı grafiğe geçirilecek olursa "türev spektrumu" meydana gelir ve 1'den n'e kadar derecede olabilir.

Türev spektrofotometri ise türev spektrumlarının kullanılması esasına dayalı bir analiz yöntemidir.

Esasında türev; eğrinin üzerine çizilen teğetin eğimidir yani tanjantıdır. Buna göre gauss tipindeki bir eğride tanjantın en yüksek olduğu yarı yüksekliklerde maksimum veya minimumlar gözlenir (Şekil 2.12.).



Şekil 2.12. Gauss tipindeki bir eğrinin belirli noktadaki tanjantları ve karşılıkları

Türev derecesi arttıkça piklerin keskinleşmesi ve daralmasıyla ayırıcılık (rezolüsyon) artmaktadır.

Absorpsiyon spektrumunda herhangi bir dalga boyunda Lambert Beer yasası geçerli ise n. dereceden türev spektrumunda türev türev absorpsiyonu, D_n aşağıdaki eşitlik ile verilebilir (Formül 2.19).

$$D_n = d^n A / \lambda^n = (d^n \epsilon / \lambda^n) I.C \quad (2.19)$$

Görüldüğü gibi Lambert-Beer yasasının geçerli olması koşuluyla türev absorpsiyon değerleri ile derişim arasında doğrusal bir ilişki vardır. Türev spektrofotometrisi ile kantitatif analizin temelini bu eşitlik oluşturur. Direkt spektrofotometride derişim ile absorpsiyon arasında oluşturulan kalibrasyon eğrileri türev spektrofotometrisinde standart çözeltilerin derişimi (C) ile karşılık olan türev absorpsiyon değerleri (D_n) arasında çizilir.

Bilinen derişimlerdeki çözeltilerin absorpsiyonları ölçülüp, derişim absorpsiyon grafiği çizilerek bir kalibrasyon eğrisi elde edilir. Bilinmeyen derişimdeki maddenin aynı şartlarda absorpsiyonu okunarak kalibrasyon eğrisinden derişimi bulunabilir.

2.6.3.1. Türev eğrilerinin şekilleri

Günümüzde 1. den 4. ye kadar türev eğrisi çizilmekte ve anlam kazanmaktadır.

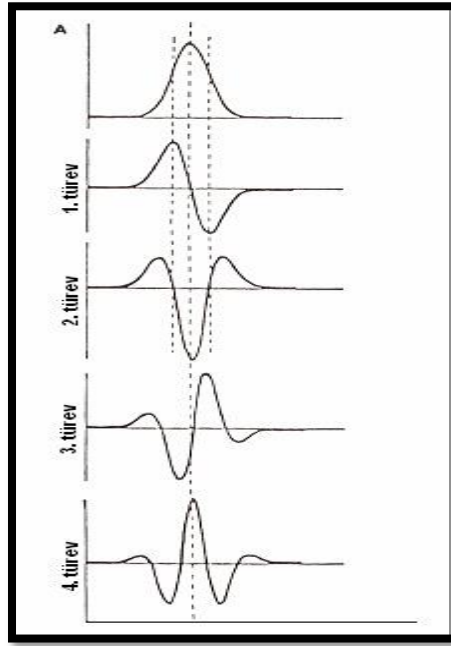
1. türev eğrisi orjinal spektrumdaki eğrinin teğetlerinin eğimini göstermektedir. Burada orjinal spektrumun maksimum noktası kaybolmuş buna karşılık orjinal spektrumda absorbansın yükseldiği kısımlar için pozitif, azaldığı kısımlar için ise negatif değerler almaktadır. Orjinal spektrumdaki eğri üzerinde eğimin en büyük olduğu noktalara yani eğrinin yarı yüksekliklerine karşılık bir maksimum ve bir minimum göstermekte eğimin en düşük olduğu tepe noktasında ise sıfır olmaktadır. Buna göre gauss eğrisindeki maksimum noktasına 1. türev eğrisinde bir kesim noktası karşılık gelmektedir. Bu noktanın her iki tarafında pozitif ve negatif bantta absorbans eğrisinin eğim noktasında maksimum ve minimum yapar. Bu iki kutuplu fonksiyon bütün tek sayılı türevlerin karakteristiğidir.

2. türev eğrisinde ise aynı işlemler sonucunda orjinal eğrinin maksimum noktasına karşılık gelen bir minimum görülmektedir. Ayrıca ana pikin iki tarafında ve pozitif bölgede iki adet uydu pik verir. Çift sayılı türevlerin karakteristik özelliği, absorbans spektrumunun maksimum yaptığı dalga boyunda, λ_{max} , pozitif veya negatif bölgede güçlü bir maksimum veya minimum vermesidir.

3. türev eğrisinde orjinal eğrinin maksimum noktasına aynen 1. türev eğrisinde olduğu gibi bir kesim noktası karşılık gelmektedir.

4. türev ise orjinal spektrumdaki maksimum noktaya yine bir maksimum nokta karşılık gelmektedir.

Ayrıca orjinal Gauss eğrisi tipindeki bir pike karşılık n. türevde n+1 tane maksimum ve minimuma rastlanmaktadır. Yani 1. türevde 2, 2. türevde 3, 3. türevde 4 tane gibi maksimum ve minimum noktası gözlenmektedir (Şekil 2.13).

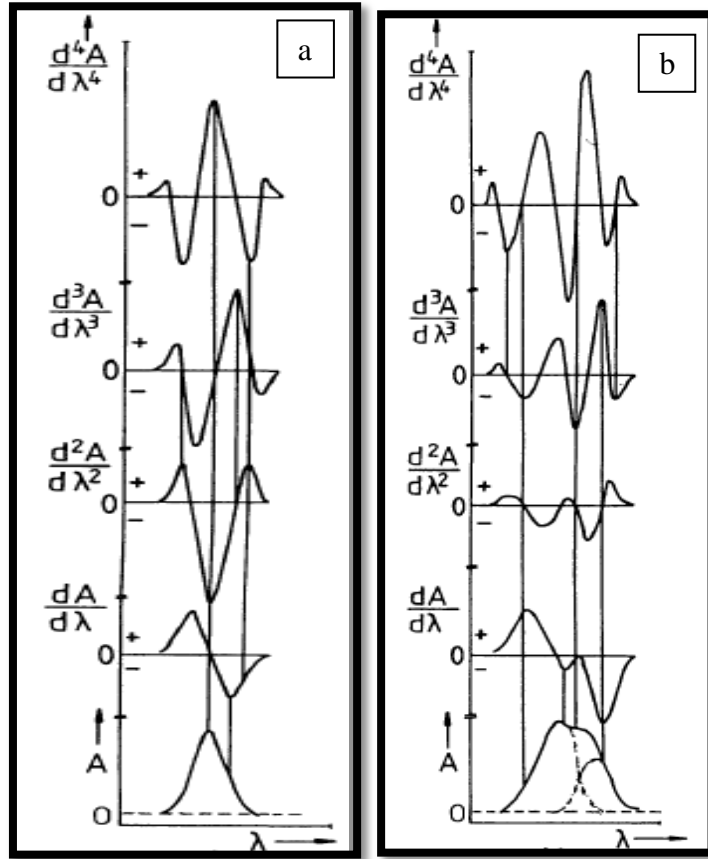


Şekil 2.13. Türev eğrilerinin şekilleri

Önemli bir nokta ise, türev eğrilerinin aynı dalga boyu aralığı içerisinde alınması nedeniyle piklerin genişliğinin azalmasıdır, Bu azalma yaklaşık 1. türevde yarıya, 2. türevde üçte birine ve 4. türevde yüzde 40'ına inmektedir.

Türev spektrumlarında, kesim noktası çok önemlidir. Çünkü bu noktada ait olduğu maddenin diğer madde veya maddelerin spektrumuna katkısı yoktur. Dolayısıyla karışım içerisinde herhangi bir ayırma işlemi gerekmeksizin bazı maddelerin diğerleri yanında miktar tayinlerinin yapılabilmesi mümkündür. Bu da özellikle karışım halinde maddeleri etken maddeler olarak içeren farmasötik preparatların analizi için yöntemin çok etkili ve kolay bir miktar tayini yöntemi olmasını sağlar.

Bu yöntem ikili karışımlarda olduğu kadar daha fazla sayıda bileşen içeren karışımlarda da uygun kesim noktaları bulunduğu uygulanabilir. Türev spektrumu her zaman normal eğriden daha komplekstir.



Şekil 2.14. Basit bir Gauss pikinin (a) ve örtüşen iki Gauss pikinin (b) 1-4. türev spektrumları

Türev almanın sağladığı en önemli yararlarından biri de türev derecesi arttıkça geniş ve yayvan piklerin keskin piklere göre daha fazla baskılanmasıdır.

Türev spektroskopisi anorganik ve organik analizlerde, toksikolojide, kliniksel analizlerde, farmasötik ürünler ve gıdaların analizinde ve çevre kimyasında geniş çapta uygulanmaktadır. Genel olarak belirtmek gerekirse türev spektroskopisinin uygulanması özel bir durum ya da alanla sınırlı değildir. Ancak, yayvan spektrumların nitel veya nicel değerlendirilmesinin zor olduğu ve çok bileşenli örneklerdeki bileşenlerin tayininin gerektiği her durumda kullanılabilir bir yöntemdir.

2.6.3.2. Yöntemin avantajları

1. Türev çalışması orjinal spektrumun eğimleri hakkında bilgi verir ve bunun omuz noktaları ile dönüm noktalarının daha belirgin hale gelmesine neden olur. Böylece bir bileşik daha kolay ve kesin olarak tanınabilir.
2. Çoğunlukla orjinal spektrumda elde edilen eğriler birçok pikin üst üste gelmesi ile meydana gelmiştir. Türev alma ile bu absorpsiyon eğrileri daha ayrıntılı şekle girer ve böylece birarada bulunan piklerin tek tek görülmesi sağlanır.
3. Bilindiği gibi spektrofotometride bulanık çözeltiler ile çalışılırken çökme hızı, tanecik büyüklüğü gibi faktörlere bağlı olarak büyük oranda hata yapılabilir. Türev eğrilerinin hazırlanması ile bulanıklığın oluşturduğu bu olumsuz etki ortadan kaldırılabilir.
4. Birden fazla maddenin karışım halinde bulunduğu ortamlarda ekstraksiyon ve kromatografi gibi herhangi bir ayırma işlemine başvurmaksızın tek tek miktarları tayin edilebilir.
5. Reaksiyon ortamından kaynaklanan gürültü piklerinin yok edilmesi sağlanır.
6. İlaç maddeleri, besinler vb. maddelerde bulunabilen eser miktardaki safsızlıkların saptanması ve miktarlarının tayin edilmesi de türev spektrofotometrisinin bir başka uygulama alanıdır. Safsızlıklara ait küçük absorpsiyon pikleri türev spektrumlarında daha kolay saptanabilen pikler haline dönüşür.
7. Absorpsiyon spektrumları birbirine çok benzeyen benzer kimyasal yapıdaki bileşiklerin türev spektrumlarının alınması bunların farklılandırılmasına olanak sağlar.

2.6.3.3. Yöntemin dezavantajları

Kullanımı çok kolay olmasına karşılık pahalı spektrofotometrelere ve oldukça karmaşık bir elektronik yapıya ihtiyaç vardır.

2.7. Literatürde Yapılan Çalışmaların Özeti

İlaçlardaki AT ve amoksisilin miktarını belirlemek için FI (akış enjeksiyon analizi) metodu geliştirilmiştir. FI, basitliği, hızı ve ucuz ekipman kullanımı ile karakterize edilmektedir. Dedektör olarak UV-GB spektrofotometresi kullanılmıştır [79].

Amoksisilin ve AT'nin ve aynı anda belirlenmesi için, normal beslenmelerini bitirmiş domuzlarda bir yöntem geliştirmiştir. AT ve amoksisilin rutin belirlenmesi ve miktar tayini için yemlerde sıvı kromatografisi (LC) ile hızlı bir analitik prosedür geliştirilmiş ve test edilmiştir. AT ve amoksisilin mide öz suyuna karşı iyi direnç gösterdikleri için ilaçlı yemlere ilave edilen tek penisilinlerdir. Yem numuneleri herhangi bir temizleme yapılmaksızın, asidik ortamda bir formaldehid solüsyonuyla 30 dk boyunca 100°C'de, su-asetonitril kullanılarak ekstre edilmiştir (75:25, v / v) ve türevlendirilmiştir. Floresan türevleri ise mobil faz olarak tiyosülfat içeren asetonitril, metanol ve fosfat tamponu ile ters-faz Supelcosil LC-18 kolonu (150 mm×4,6 mm; 5 µm) ve 5 µm Supelguard LC-18 (20 mm×4,6 mm) koruyucu kolonu kullanarak gerçekleştirilmiştir. Çözücü olarak su ve asetonitril (75:25, v/v) kullanılmıştır. Uyarım dalga boyu 358 nm ve emisyon dalga boyu ise 440 nm dir. Burada gradient elüsyon sistemi kullanılmıştır [80].

Sığır, domuz, tavuk ve balıkların kas dokularında AT kalıntılarının belirlenmesi için floresan dedeksiyonlu bir YPSK metodu geliştirilmiştir. Kas dokuları, bir mutfak robotu ile harmanlanmış ve harmanlanmış dokuların çözeltisi, bir doku homojenizatörü ile 0,01 M, 14 ml fosfat tampon maddesi (pH: 4,5) içinde parçalanmıştır. Proteinler, 1 ml trikloroasetik asit ilavesi ve ardından santrifüj ile çöktürülmüştür. Filtreleme işleminden sonra, süpernatant 1 ml asidik ve ısıtma şartları altında formaldehid ile reaksiyona sokulmuştur. AT'nin floresan türevi daha sonra floresan dedeksiyon ile ters fazlı YPSK ile analiz edilmiştir. YPSK kolonu Prodigy 5 mm, ODS-3 (250 mm×3,6 mm) I.D. Enjeksiyon hacmi 100 µL, mobil faz asetonitril-0,02 M KH₂PO₄ tamponu (pH:3,5) (25:75, v/v) ve akış hızı 1 mL dk⁻¹ olarak kullanılmıştır [81].

AT, diclouxacillin, flukloksasilin ve amoksisilin gibi bazı antibiyotik ilaçların belirlenmesi için hassas bir spektrofotometrik metot geliştirilmiştir. Metot, metilen klorür ile ekstraksiyon ve bunu takiben Mo (V)-tiyosiyanatın inorganik kompleks araştırması kapsamında ilaçlar arasında iyon çiftlerinin oluşumunu içerir [82].

AT 'nin tespiti için iki basit ve hassas kinetik yöntem tarif edilmiştir. Birinci yöntem, 25 dakika içinde sabit bir süre için, oda sıcaklığında alkali potasyum permanganat ile ilacın oksidasyon reaksiyonunun kinetik araştırmasına dayanmaktadır. Renkli manganat iyonlarının absorbanı 610 nm'de ölçülmüştür. İkinci yöntem, 0,1 mol L⁻¹ sodyum bikarbonat mevcudiyetinde, AT ve 1-kloro-2,4-dinitrobenzenin reaksiyona dayanır. Spektrofotometrik ölçümler, 60 dakikalık sabit bir süre için 490 nm'de absorbanı kaydı ile elde edilmiştir [83].

Katalizör olarak Cu iyonlarını kullanarak, misel ortam içinde, β -laktamik antibiyotiklerden olan amoksisilin ve AT spektrofotometrik belirlenmiştir. Akış enjeksiyon yaklaşımları karşılaştırılmıştır [84].

AT analizi için yedi laboratuvarı içeren bir sıvı kromatografik yöntem, ortak bir çalışmada araştırılmıştır. AT'nin saflık testinin tayini için yöntemin uygulanabilirliği yedi laboratuvarında ayrı ayrı incelenmiştir. Ana bileşen ve ilgili maddeler tespit edilmiştir [85].

AT ve onunla ilişkili maddelerin ayrılmasında, dört izokratik sıvı kromatografisi yönteminin seçiciliğini incelemek için iki laboratuvar işbirliği içinde çalışmışlardır. Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi (USP) deney yöntemi en iyi seçiciliği vermiştir. Benzer seçicilik C₁₈ hem de C₈ kolon ve poli (stiren-divinilbenzen) kopolimer kolon üzerinde elde edilmiştir [86].

Ciphalexin, sefradin, AT ve amoksisilin analizi için hızlı, doğru, uygun bir spektrofotometrik yöntem geliştirilmiş ve farmasötik formülasyonlar içinde bir endüstriyel kalite kontrol laboratuvarında bulunan enstrümantal teknikleri kullanılmıştır [87].

DAD dedektörlü, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) kullanarak insan plazmasında 10 tane beta-laktam antibiyotiğinin (içlerinde AT de bulunan), serbest (bağlanmamış) konsantrasyonunu belirlemek için bir yöntem tanımlanmıştır. Ters-faz C₁₈, 2,5 µm, 4,6x30 mm, XBridge kolunu (Waters, Milford, USA), asetonitril-fosfat tamponu karışımı, 25 µL enjeksiyon hacmi ve 1 mL dk⁻¹ akış hızı kullanılmıştır [88].

Yine DAD dedektörlü sıvı kromatografisi tekniği kullanılarak insan plazmasında AT'nin belirlenmesi için bir yöntem geliştirilmiştir. AT ve internal standart sefaleksinin plazma numunelerinden ekstraksiyonu 3 farklı yöntemle gerçekleştirilmiştir. Perklorik asit çöktürmesi, ultra filtrasyon, katı faz ekstraksiyonu işlemleri kullanılmıştır. Kromatografik ayırma Shimpak C₁₈ (300 mm × 4,6 mm, 5 µm) kolunu kullanarak, 215 nm'de gerçekleştirilmiştir. Mobil faz dihidrojen fosfat (pH:3,5)-asetonitril (87,5:12,5, v/v) karışımıdır. Akış hızı ise 1 mL dk⁻¹ dir [89].

AT için internal standart olarak amoksisilin kullanılarak, plazmada ve bronş lavaj sıvısında sıvı kromatografisi yöntemi geliştirilmiştir. Spherisorb 5 ODS kolon ve hareketli faz olarak metanol-su (60:40) karışımı kullanılmıştır. AT ve internal standart amoksisilin için eş zamanlı belirlenmesi için iyon çifti kromatografisi tekniği kullanılmıştır [90].

Aralarında AT de bulunan 12 adet penisilinin insan plazmasında rutin analizi için yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Waters X-Bridge C₁₈ kolonu (30mm×4,6mm, 2,5µm silica) kullanılmıştır. Asetonitril-fosfat tamponu mobil faz ve akış hızı olarak 1 mL dk⁻¹ alınmıştır [91].

AT'nin belirlenmesi için yeni bir spektrofotometrik metot tanımlanmıştır. Yöntem, 400 nm'de bir λ_{max} sahip, sarı renkli bir ürün vermek üzere asetilaseton-formaldehid reaktifi ile AT'nin reaksiyonuna dayanmaktadır [92].

Farmasötik formülasyonlarda AT ve probenesidin aynı anda belirlenmesi için basit, hızlı, hassas eş zamanlı çok bileşenli bir türev spektrofotometrik yöntem geliştirilmiştir. Çözücü olarak NaOH kullanıldığında, birinci türev spektrumlarının

AT için 222,2 nm ve probenesid için 288 nm de max absorpsiyona sahip olduğu görülmektedir [93].

İnsan plazmasında AT'nin belirlenmesi için bir izokratik elüsyonlu yüksek performanslı sıvı kromatografisi metodu geliştirilmiştir. Yöntem, protein çöktürme işleminden sonra, plazma enjeksiyonu içerir. Ters-fazlı BondaPak C₁₈ kolon üzerinde, mobil faz olarak fosfat tamponu (pH: 3,3) ve metanolden oluşmaktadır. 225 nm'de UV dedeksiyonu ve akış hızı 1,5 mL dk⁻¹ dır [94].

AT'nin sodyum tuzu, anhidrat ve trihidrat formlarının belirlenmesi için ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirilmiştir. Fosfat asidi-asetonitril karışımı mobil faz olarak ve kafein internal standart olarak kullanılmıştır [95].

AT'nin farmasötik formülasyonlarda belirlenmesi için iki spektroskopik yöntem geliştirilmiştir. Metot A ilacın 500 nm'de max absorbanslı demir klorid ve 2,2 bipiridil ile reaksiyonu ile pembe renkli kompleks oluşumuna dayanır. Metod B ise ilacın 523 nm'de max absorbanslı demir klorid ve 1,10 fenanthrolin ile reaksiyonu ile turuncu renkli kompleks oluşumuna dayanır [96].

İnsan plazmasında flukloksasilin ve AT'nin aynı anda tespiti için tandem kütle spektrometrisi ile birlikte ultra performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirilmiştir. Plazmadaki proteinler asetonitrille çöktürülmüştür. Kromatografik ayırma, 10 mM amonyum format ve asetonitril (68:32) karışımı ile, C₁₈ kolonda (50 mmx2,1 mm, 1,7 µm) 0,2 mL dk⁻¹ akış hızı ile gerçekleştirilmiştir [97].

FH ve nitrofurantoinin çeşitli tabletlerde eş zamanlı tayini için bir ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirilmiştir. Analiz, aminopropil silika (APS-Hypensil) 5µm kolonu üzerinde, 1,5 mL dk⁻¹ akış hızıyla, metanol-su ve 0,05 M sodyum dihidrojen fosfat (50:45:5) kombinasyonundan oluşan bir hareketli faz kullanılarak, 380 nm'de gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrileri ise 2-20 µg mL⁻¹ aralığında doğrusallık göstermiştir [98].

FH'nin belirlenmesi için, camı karbon elektrotta elektrokimyasal oksidasyona dayalı bir akış enjeksiyon yöntemi tarif edilmektedir. Camı karbon elektrotta akan bir akımı içinde amperometri, farmasötik dozaj formlarında çoğu ilacın eşliğinde yaygın olarak bulunan FH'yi belirlemek için önerilen son derece spesifik bir yöntemdir. Ag/AgCl/3,5M KCl referans elektroduna karşı, 950 mV sabit bir potansiyel uygulanmıştır. Kalibrasyon eğrisi 1-30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ aralığında lineer profil göstermiştir. Yöntem FH içeren dozaj şekillerine uygulandığında iyi bir hassasiyet ve kesinlik elde edilmiştir. Bu çalışmada otomasyon kullanılmamasına rağmen, bu metod kesintisiz akış analiz tekniğini kullandığı için otomatik bir sisteme dahil edilebilmektedir [99].

Biyolojik sıvılar ve farmasötik preparatlarda FH'nin adsorptif ayırma tekniği ile voltametrik analizi gerçekleştirilmiştir [100].

Tablet dozaj formunda FH'nin saflığını ve kararlılığını kontrol etmek için uygulanan bu yöntem, asidik etanol çözeltisi ya da sulu asitli solüsyonda doğal floresans ölçümüne dayanır. İzokratik mobil faz sistemi ile (asetonitril:asetat tamponu, pH: 4, 1:1, v/v) üç dalga boyuna dayalı ters fazlı YPSK metodu geliştirilmiş, ayrıca FH ve ilgili bozunma ürünlerinin ve safsızlığın aynı anda tespiti için özel bir uygulama kararlılığı gösteren bir deney gerçekleştirilmiştir [101].

FH'nin safsızlığına ilişkin önemli bir sürecin karakterizasyonu, yarı-preparatif YPSK ile ve ardından ESI-MS-MS, ^1H NMR ve 2D-NMR ile gerçekleştirilmektedir. Burada olası oluşum mekanizması önerilmiştir. YPSK sisteminde, DAD dedektörü kullanılmıştır. İzokratik elüsyon ile kolon Inertsil ODS 3V (250mm×4,6mm, 5 μm), mobil faz su ve asetonitril (25:75, v/v) karışımı, enjeksiyon hacmi 10 μL ve akış hızı olarak 1 ml dk^{-1} kullanılmıştır. Miktar belirleme 254 nm'de PDA dedektör kullanılarak gerçekleştirilmiştir. YPSK ile % 0,05-0,2 aralığı içerisinde FH için sürekli olarak bilinmeyen bir safsızlık gözlenmiştir. Safsızlık, yarı-preparatif YPSK ile izole edilmiş ve arıtılmış, daha sonra da ESI-MS/MS ve 2D-NMR deneyleri ile karakterize edilmiştir [102].

Trimetoprim, sulfametoksazol ve FH içeren bir üçlü karışımın eş zamanlı analizi için basit ve hızlı bir yöntem geliştirilmiştir. Bu prosedür, 0,1 M hidroklorik asit içinde

ekstraksiyon sonrasında, sırasıyla trimetoprim, sülfametoksazol ve FH'nin belirlenmesi için 450 nm'deki absorbans ve 242 ve 276 nm'deki 3. derece türev spektrumlarının genliklerinin filtrasyon ve ölçümlerini içerir. İyi doğrusallık, doğruluk, kesinlik ve seçicilik bulunmuş ve hatta yöntem muntazamlığı nedeniyle, rutin kalite kontrol amacıyla da önerilmiştir [103].

FH belirlenmesi için yeni bir LC-MS metodu ile *in vivo* olarak FH için farmakokinetik bir model tarif edilmektedir. FH çok uzun süredir klinik tedavide kullanılmış olmasına rağmen, plazma içerisindeki belirlenmesi için uygun yöntemler ve farmakokinetik verileri eksiktir. İnsan deneklerinde oral uygulamadan sonra FH'nin plazma konsantrasyonlarının belirlenmesi için, yüksek performanslı sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi yöntemi tarif edilmiştir. Sıvı-sıvı ekstraksiyondan sonra plazma içindeki FH, SIM modu altında bir C₁₈ kolonu üzerinde analiz edilmiştir. Çalışmada kütle spektrometresi detektörü kullanılmıştır. Alltech C₁₈ kolonu (5 µm, 150x4,6 mm'lik), mobil faz olarak metanol-su karışımı (85:25, v/v) (pH: 4,5, asetik asit ile ayarlanmış), akış hızı olarak 1 mL dk⁻¹ kullanılmıştır. Plazmadan ekstraksiyon çözücüsü olarak da etilasetat kullanılmıştır [104].

İnsan plazmasında FH'yi belirlemek için UV-GB değişken dalga boylu dedektör kullanılmış, internal standart ile iki farklı dalga boyunda çalışılmıştır. FH ve diltiazem, BDS C₈ koruyucu kolonuna bağlı, LiChrospher 60 RP-Select B (100 x 4,6 mm, 5 µm, Merck) kolonuyla taşınmıştır. Hareketli faz pH 2,7'de 20 mM KH₂PO₄ ve asetonitril (70:30) karışımı ve akış hızı ise 1,5 mL dk⁻¹ olarak alınmıştır. Dedektör FH saptanması için 405 nm'de ayarlanmış ve 3,4 dakika sonra diltiazem saptanması için, dalga boyu 238 nm olarak değiştirilmiştir. Ekstraksiyon çözücüsü olarak da metiltert bütül eter kullanılmıştır [105].

İnsan plazmasında diazepam internal standardını kullanarak bir gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi metodu geliştirilmiştir. FH ve internal standardı, DB-5MS kolon üzerinden plazmadan sıvı sıvı ekstraksiyonla ekstrakte edilmiştir. Bu yöntem, biyoeşdeğerlik ve biyolojik çalışmalarda, FH pratikte uygulanabilir olduğunu kanıtlamıştır [106].

Bu çalışmanın amacı tavşan plazmasında FH'nin analizi için bir gaz kromatografisi-kütle spektrofotometrisi yöntemi geliştirmektir. Biyolojik numuneler, sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile ekstrakte edilmiş ve ekstraksiyon çözücüsü olarak etilasetat kullanılmıştır. Numuneler DB-5MS analitik kolon üzerinde, GC ile ayrılmış ve tavşanlarda FH'nin farmakokinetiği de belirlenmiştir [107].

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) yöntemi, dozaj formunda FH'i belirlemek için kullanılmıştır. Kullanılan analitik kolon Zorbax TMS (7 µm, 25 cmx4,6 mm ID) dir. 405 nm dalga boyunda çalışılmış ve hareketli faz olarak asetonitril:2-propanol:asetik asit:su (30:30:1:39) karışımı kullanılmıştır [108].

Plazma numunelerinde ve idrarda FH'nin belirlenmesi için, içi boş fiber bazlı bir sıvı-sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yöntemi ve FIA-DAD dedektörü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Akış enjeksiyon sistemi (bir kromatografik kolon olmadan), geleneksel bir YPSK sistemi ve bir diyot dizi dedektörü içermektedir. FH'nin ekstraksiyonunda içi boş fiber duvarının gözeneklerini doldurmak için organik faz olarak, difenil eter kullanılmıştır. Miktar analizi için dedektör 395 nm'ye ayarlanmış ve akış hızı 1 mL dk⁻¹ olarak alınmıştır. pH:2,5 teki fosfat tamponu olarak kullanılan mobil fazın analiz boyunca, sürekli olarak helyum ile gazı alınmıştır [109].

Ticari ilaç formüllerindeki ikili karışımlarda sülfaoksazol, AT ve FH'nin aynı anda belirlenmesi için Ratio spektra türev spektrofotometrisi yöntemi uygulanmıştır. Prosedürler herhangi bir ayırma aşamasını gerektirmemektedir. Analitik sinyaller, sülfaoksazol ile FH karışımında 252,3 ve 276,6 nm'de , AT ile FH karışımında ise 324,9 ve 283,6 nm'de ölçülmüştür. Metanolde hazırlanan çözelti karışımları için birinci türev spektrumları kullanılmıştır [110].

FH, AT ve nitrofurantoin'nin ticari preparatlardaki ikili kombinasyonlarında eşzamanlı miktar belirlenmesi için UV dedektörlü sıvı kromatografisi metodu ile spektrofotometrik, ratio spektra türev spektrofotometrik ve iki kemometrik (PSR ve PLS-1) metot tanımlanmıştır. LC yönteminde, metanol-asetonitril-su (42:42:16, v/v/v) karışımından oluşan mobil faz sistemi ve Nucleosil C₈ kolonu, 260 nm'deki FH ve nitrofurantoin ikili kombinasyonunu belirlemek için kullanılmıştır. AT ve FH

karışımını 240 nm'deki belirlemek için de, metanol-su (80:20, v/v) karışımından oluşan mobil faz sistemi ve Nucleosil C₈ kolonu kullanılmıştır. Standartları hazırlamada çözücü olarak 0,1 M HCl ve su (1:1) karışımı kullanılmıştır. Buradaki prosedürlerde herhangi bir ayırma aşamasına gerek duyulmamaktadır. Geliştirilen metotlar, ikili karışımlarda FH ve nitrofurantoine ve FH ve AT'nin kapsül ve tablet gibi farmasötik formüllerde aynı anda tespiti için uygulanmıştır [111].

BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Materyaller

3.1.1. Kullanılan cihazlar

1. YPSK Cihazı (SHIMADZU)
 - SIL-20A HT Prominence Auto Sampler
 - SPD-M20A Prominence DAD dedektör
 - LC-20 AD Prominence Liquid Chromatography
 - DGU-20 A5 Prominence degazer
 - CTO-10AS VP Kolon firmı
 - LC Solution programı
 - Samsung masaüstü bilgisayar
 - FCM güç kaynağı
2. UV-Vis. Spektrofotometre Cihazı (SHIMADZU UV-2600)
3. Hassas terazi (OHAUS)
4. Derin donduruculu buzdolabı (ARÇELİK)
5. Vorteks karıştırıcı (MX-S DRAGONLAB)
6. Santrifüj (HETTICH)
7. pH metre (HANNA)
8. Etüv (NÜVE-FN 120)
9. Manyetik karıştırıcı (IKA RCT classic)
10. Ultrasonik banyo (BANDELIN SONOREX)
11. Ultra saf su cihazı (MILLIPORE)
12. Otomatik mikropipet (EPPENDORF)
13. Vakum pompası (ROCKER 300)
14. Rotary evaporatör (HEIDOLPH)

3.1.2. Kullanılan cam malzemeler ve diğer sarf malzemeleri

5 µm (250 x 4,6 mm) parçacık boyutlu Inertsil ODS-3 C₁₈ ters faz kolonu
 12x32 mm 2 mL silikon septum kapaklı autosampler cam vial kiti (NATIONAL SCIENTIFIC CERT4000)
 0,45 µm naylon membran filtre (PALL)
 1x1x3 cm kuvarz küvet (TECHNICAL QUARTZ PRODUCTION)
 Değişik hacimlerde balon joje, erlen, beher ve mezürler (ISOTHERM)
 Cam santrifüj tüpü (ILDAM)
 Metal spatül
 Plastik tartım kabı
 Enjektör (SET MEDİKAL)
 Otomatik pipet ucu (EPPENDORF)

3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler

AT ve FH standartları ve bu ikili etken madde karışımını içeren ticari Azosilin tablet AVİS İlaç San.ve Tic. A.Ş. (İstanbul, Türkiye)'den temin edilmiştir.
 Plazma çalışmalarında kullanılan dondurulmuş insan plazması, Ümraniye Eğitim ve Araştırma Hastanesi (İstanbul, Türkiye)'nden temin edilmiştir.
 YPSK dereceli metanol (CH₃OH, MERCK), M=32,04 g mol⁻¹
 Hidroklorik asit (HCl, MERCK), M=36,46 g mol⁻¹
 Amonyum dihidrojen fosfat (NH₄H₂PO₄, J.T. BAKER), M=115,03 g mol⁻¹
 di-Potasyum hidrojen fosfat (K₂HPO₄, MERCK), M=174,18 g mol⁻¹
 Ortofosforik asit (H₃PO₄, J.T. BAKER), M=98 g mol⁻¹
 İzopropil alkol (CH₃CH(OH)CH₃, MERCK), M=60,1 g mol⁻¹
 Aseton (C₃H₆O, MERCK), M=58,08 g mol⁻¹

3.2. Deneyler İçin Gerekli Hazırlıklar

3.2.1. Etken maddelerin saflığı

AT ve FH etkin maddeleri sağlandıkları firma tarafından tüm testleri yapılmış (saflık, erime noktası, çözünürlük v.s.) olan sertifikalı saf standartlardır.

3.2.2. Cam malzemelerin ve kolonun temizliği

Cam malzemeler deterjanlı su ile yıkandıktan sonra çeşme suyu ile çalkalanmıştır. Daha sonra 1 N HCl çözeltisi içinde en az bir gece bekletilmiş ve tekrar destile su ile yıkanarak oda sıcaklığında kurutulmuştur. YPSK vialleri çeşme suyu ardından destile su ile çalkalandıktan sonra 1 N HCl çözeltisi içinde en az bir gece bekletilmiş, aseton ve destile sudan geçirilerek etüvde kurutulmuştur. Spektrofotometre küvetleri sırasıyla çeşme suyu, aseton ve destile suyla çalkalanarak temizlenmiş, her ölçümden önce bir miktar numune çözeltisi ile çalkalanmıştır. YPSK sisteminde kullanılan kolondan çalışma öncesi 30 dk deiyonize su geçirildikten sonra mobil faz geçirilmiştir, böylelikle kolonun şartlanması sağlanmıştır. Çalışma sonunda sistemden yarım saat boyunca 1 mL/dk akış hızında, %70 YPSK dereceli metanol ve %30 deiyonize su geçirilerek temizlenmiştir.

3.2.3. 0,01 N hidroklorikasit çözeltisi hazırlanışı

Balon jöje içerisine bir miktar deiyonize su konulduktan sonra üzerine 85 mL derişik (%37 lik) hidroklorikasit eklenmiş ve deiyonize suyla 1 litreye tamamlanarak, 1 N HCl çözeltisi elde edilmiştir. Bundan 10 mL alınıp deiyonize suyla 1 litreye tamamlandığında 0,01 N HCl çözeltisi elde edilmiştir.

3.2.4. Amonyum dihidrojen fosfat/di-potasyum hidrojen fosfat tamponu hazırlanışı

1,32 g amonyum hidrojen fosfat ve 0,68 g potasyum hidrojen fosfat tartılarak deiyonize suyla 1 litreye tamamlanmıştır. Ortofosforik asit ile pH'ı 3'e ayarlanmıştır.

Vakum altında membran filtreden süzülüp, ultrasonik banyoda 15 dk bekletilerek çözülmüş gazları uzaklaştırıldıktan sonra YPSK sisteminde kullanılmıştır. Gradient elüsyon için tampon ve metanol farklı mobil faz haznelere konulmuştur.

3.2.5. İnsan plazmasının kullanıma hazırlanması

Dondurulmuş insan plazması derin dondurucudan çıkarılıp behere konulmuştur, oda sıcaklığında bekletilerek doğal olarak çözünmesi sağlanmıştır. Homojen hale gelmesi için magnetik karıştırıcıda karıştırılmış ve pipetle çekilecek kıvama geldiğinde kullanılmıştır.

3.2.6. Standart çözeltilerin hazırlanması

AT ana stok çözeltisi: 100 mL'de 50 mg olacak şekilde 0,01 N HCl çözeltisinde hazırlanmıştır ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$).

AT çalışma standart çözeltileri: 1-2,5-5-10-15-30-40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonlarındaki 7 adet çalışma standart çözeltisi, AT ana stok çözeltisinin 0,01 N HCl çözeltisi ile 25'er mL'ye seyreltilmesiyle hazırlanmıştır.

FH ana stok çözeltisi: 100 mL'de 5 mg olacak şekilde 0,01 N HCl çözeltisinde hazırlanmıştır ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$).

FH çalışma standart çözeltileri: 0,5-1-2,5-5-10-15-20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonlarındaki 7 adet çalışma standart çözeltisi, FH ana stok çözeltisinin 0,01 N HCl çözeltisiyle 25'er mL'ye seyreltilmesiyle hazırlanmıştır.

Hazırlanan tüm standartlar kullanılıncaya kadar $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de buzdolabında saklanmış ve kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirilerek, vorteks ile karıştırılmıştır. Her bir çözelti YPSK çalışması için vial filtrelerinden süzülerek, ayrı viallere ve UV çalışması için de kuvarz küvetlere konarak ölçümleri alınmıştır.

3.2.7. Farmasötik preparat çözeltilerin hazırlanması

Balon joje içerisine atılan bir Azosilin tablet, 0,01 N HCl çözeltisi ile 1 litreye tamamlanmıştır. Magnetik karıştırıcıda 500 devir dk^{-1} hızında, 35-37 °C civarında 5 dk karıştırılmıştır. 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ AT ve 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ FH içeren bir çözelti elde edilmiştir. Bu çözeltilerden alınan 2,5 mL'lik kısımlar, 25'er mL'lik 6 ayrı balon jøjeye konulmuştur ve her biri 0,01 N HCl çözeltisi ile 25 mL'ye tamamlanmıştır. Yapılan seyreltmeler sonucunda, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ AT ve 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ FH içeren 6 çözelti elde edilmiştir.

Etken maddelerden, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ AT ve 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ FH oluşturacak şekilde 0,01 N HCl çözeltisi ile hazırlanan çözeltilerin ölçümleri alınmıştır ve ticari tablet ölçümleriyle karşılaştırılmıştır.

3.2.8. Standart ekleme metodunda kullanılan standart çözeltilerin hazırlanması

Balon joje içerisine atılan bir Azosilin tablet, 0,01 N HCl çözeltisi ile 1 litreye tamamlanmıştır. Magnetik karıştırıcıda 500 rpm hızında, 35-37°C civarında 5 dk karıştırılmıştır. Elde edilen, 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ AT ve 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ FH içeren bu ilaç çözeltisi, 0,01 N HCl çözeltisi ile 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ AT ve 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ FH içerecek şekilde seyreltilmiştir (10 kat seyreltme).

50 mL'lik 5 adet balon jøjeye sırasıyla seyreltilmiş tablet çözeltilerinden 20-25-30-35-40 mL ve üzerlerine 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ lik AT ana stok çözeltilerinden sırasıyla 3-2,5-2-1,5-1 mL eklenmiştir. Daha sonra tekrar üzerlerine 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik FH ana stok çözeltilerinden de sırasıyla 3-2,5-2-1,5-1 mL konulmuştur. Son olarak tüm balon jøjeler 0,01 N HCl çözeltisi ile 50 mL'ye tamamlanmıştır.

5 ayrı vial/küvete konulan çözeltilerin ölçümleri ilgili cihazlarda alınmıştır. 5 ölçümde de AT ve FH'ye ait kromatogramlar ve türev spektrumlarında iki ayrı maddenin miktarları ölçülmüştür. 5 ölçüm sonucunda da elde edilen pik alanlarının birbirine yakın olduğu gözlenmiştir.

3.2.9. Plazmalı ortamda standart çözeltilerin hazırlanması

Plazma numuneleri, in vitro olarak standart çözeltilerden plazma üzerine ilave edilerek (spike yöntemi ile) hazırlanmıştır.

AT ana stok çözeltisi: 100 mL'de 50 mg olacak şekilde 0,01 N HCl çözeltisinde hazırlanmıştır.

AT çalışma standart çözeltileri: 1'er mL insan plazması üzerine son konsantrasyonlar 1-2,5-5-10-15-30-40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olacak şekilde, 0,01 N HCl çözeltisi ile hazırlanan AT ana stok çözeltisinden, gerekli miktarlar eklenip, 25 mL'ye YPSK dereceli metanol ile seyreltilerek, 7 adet çalışma standart çözeltisi hazırlanmıştır.

FH ana stok çözeltisi: 100 mL'de 5 mg olacak şekilde 0,01 N HCl çözeltisinde hazırlanmıştır.

FH çalışma standart çözeltileri: 1'er mL insan plazması üzerine son konsantrasyonlar 0,5-1-2,5-5-10-15-20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olacak şekilde, 0,01 N HCl çözeltisi ile hazırlanan FH ana stok çözeltisinden, gerekli miktarlar eklenip, 25 mL'ye YPSK dereceli metanol ile seyreltilerek, 7 adet çalışma standart çözeltisi hazırlanmıştır.

Bütün plazma numuneleri vorteks ile karıştırılmıştır. Daha sonra bu numunelerden santrifüj tüplerine alınan kısımlar, 4000 devir dk^{-1} 'da 10-15 dk santrifüjlenerek proteinlerin çökmesi sağlanmıştır. Üst faz vial filtreleri ile süzülerek, viallere konulmuştur, sisteme enjekte edilmiştir. Tüm plazma numuneleri ekstraksiyon yöntemine gerek duyulmadan kolayca hazırlanmıştır.

3.2.10. Plazmalı ortamda farmasötik preparat çözeltilerinin hazırlanması

Balon joje içerisine atılan bir Azosilin tablet 0,01 N HCl çözeltisi ile 1 litreye tamamlanmıştır. Magnetik karıştırıcıda 500 rpm hızında, 35-37°C civarında 5 dk karıştırılmıştır. 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ AT ve 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ FH içeren bir çözelti elde edilmiştir. Bu çözeltiden alınan 2,5 mL'lik kısımlar, her biri 1'er mL plazma içeren 25'er

mL'lik 6 ayrı balon jojeye konulmuştur ve her biri YPSK dereceli metanol ile 25 mL'ye tamamlanmıştır. Yapılan seyreltmeler sonucu $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ AT ve $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ FH içeren 6 çözelti elde edilmiştir. Bu çözeltilerden santrifüj tüplerine alınan kısımlar, 4000 devir dk^{-1} 'da 10-15 dk santrifüjlenmiştir ve proteinlerin çökmesi sağlanmıştır. Her bir çözeltinin üst fazı vial filtreleri ile süzülerek, ayrı viallere konulmuştur ve sisteme enjekte edilmiştir.

$500 \mu\text{g mL}^{-1}$ AT ve $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ FH oluşturacak şekilde tartılan etken maddeler 0,01 N HCl çözeltisinde hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden gerekli miktarlar alınıp, 1'er mL plazma içeren balon jodelerde, YPSK dereceli metanol ile yapılan seyreltmeler sonucu, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ AT ve $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ FH içeren çözeltiler elde edilmiştir, 4000 devir dk^{-1} 'da 10 dk süren santrifüj işlemi sonrasında proteinlerin çökmesi sağlanmıştır. Her bir çözeltinin üst fazı vial filtreleri ile süzülerek, ayrı viallere konulmuştur ve ölçümleri alınmıştır. Bulunan sonuçlar, ticari tabletlerden elde edilen ölçüm sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

3.2.11. Plazmalı ortamda standart ekleme metodunda kullanılan standart çözeltilerin hazırlanması

Balon joje içerisine atılan bir Azosilin tablet, 0,01 N HCl çözeltisi ile 1 litreye tamamlanmıştır. Magnetik karıştırıcıda 500 devir dk^{-1} hızında, 35-37°C civarında 5 dk karıştırılmıştır. Elde edilen, $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ AT ve $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ FH içeren bu ilaç çözeltisi, YPSK dereceli metanol ile $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ AT ve $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ FH içerecek şekilde seyreltilmiştir (10 katı seyreltme).

1'er mL plazma içeren 50 mL'lik 5 adet balon jojeye sırasıyla seyreltilmiş tablet çözeltisinden 20-25-30-35-40 mL ve üzerlerine $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ lik AT ana stok çözeltisinden sırasıyla 3-2,5-2-1,5-1 mL eklenmiştir. Daha sonra tekrar üzerlerine $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik FH ana stok çözeltisinden de sırasıyla 3-2,5-2-1,5-1 mL konulmuştur. Son olarak tüm balon jodeler YPSK dereceli metanol ile 50 mL'ye tamamlanmıştır. Bu çözeltilerden santrifüj tüplerine alınan kısımlar, 4000 devir dk^{-1} 'da 10-15 dk santrifüjlenmiştir ve proteinlerin çökmesi sağlanmıştır. Her bir çözeltinin üst fazı vial filtreleri ile süzülerek, ayrı viallere konulmuştur ve sisteme enjekte edilmiştir.

5 ölçümde de AT ve FH'ye ait birer pik görülmüştür ve 5 ölçüm sonucunda da elde edilen pik alanlarının birbirine yakın olduğu gözlenmiştir.

3.2.12. Plazmalı ortamda yapılan denemeler

Plazma kullanılarak yapılan çalışmalarda, plazma içerisindeki proteinleri çöktürebilecek, en yüksek verimi sağlayacak çözücülerini ve yöntemi belirlemek için literatürlerden de yararlanılarak çeşitli kombinasyonlar denenmiş ve optimizasyon yapılmıştır. Deneme aşamasında hazırlanıp ölçümleri alınan çözeltiler şunlardır: (AT ve FH çözeltisi 0,01 N HCl çözeltisi ile hazırlanmıştır)

1000 µL plazma üzerine, AT ve FH çözeltisi eklenmiştir. YPSK dereceli metanolle 10 mL'ye tamamlanmıştır. Vorteks ile karıştırılmıştır, 4000 devir dk^{-1} da 10 dk santrifüjlenmiştir, çökme meydana gelmiştir. Üstteki sıvı faz, vial filtresinden süzülerek viale konulmuş ve ölçümü alınmıştır. En yüksek geri kazanım bu şekilde hazırlanan çözeltilerden elde edildiğinden, çalışmamızda bu yöntem kullanılmıştır.

200 µL plazma üzerine, 200 µL AT ve FH çözeltisi ve üzerine 600 µL YPSK dereceli metanol eklenmiştir. Vorteks ile karıştırılmıştır, 5000 devir dk^{-1} 'da 10 dk santrifüjlenmiştir, çökme olmuştur. Üstteki sıvı kısım başka bir tüpe alınmıştır, üzerine 600 µL kloroform eklenmiştir. Vorteks ile karıştırılmıştır, 2000 devir dk^{-1} da 5 dk santrifüjlenmiştir, çökme olmuştur. Üstteki sıvı faz, vial filtresinden süzülerek viale konulmuş ve ölçümü alınmıştır (Verim: AT %62, FH %6).

500 µL plazma üzerine, 2000 µL AT ve FH çözeltisi ve üzerine 5000 µL YPSK dereceli metanol eklenmiştir. Vorteks ile karıştırılmıştır, 5000 devir dk^{-1} 'da 10 dk santrifüjlenmiştir, çökme olmuştur. Üstteki sıvı kısım başka bir tüpe alınmıştır, evaporatörde buharlaştırılmıştır, kalıntıya 4000 µL kloroform eklenmiştir. Vorteks ile karıştırılmıştır, 5000 devir dk^{-1} da 5 dk santrifüjlenmiştir, çökme olmuştur. Üstteki sıvı kısım başka bir tüpe alınmıştır, evaporatörde buharlaştırılmıştır, kalıntı 2000 µL HCl çözeltisi ile tamamlanmıştır. Vorteks ile karıştırılmıştır, vial filtresinden süzülerek viale konulmuş ve ölçümü alınmıştır (Verim: AT %10, FH %53).

500 µL plazma üzerine, 2000 µL AT ve FH çözeltisi ve üzerine 5000 µL YPSK dereceli metanol eklenmiştir. Vorteks ile karıştırılmıştır, 5000 devir dk^{-1} 'da 10 dk santrifüjlenmiştir, çökme olmuştur. Üstteki sıvı kısım başka bir tüpe alınmıştır, evaporatörde buharlaştırılmıştır, kalıntıya 4000 µL etilasetat eklenmiştir. Vorteks ile karıştırılmıştır, 5000 devir dk^{-1} 'da 5 dk santrifüjlenmiştir, çökme olmuştur. Üstteki sıvı faz başka tüpe alınmıştır, evaporatörde buharlaştırılmıştır, kalıntı 2000 µL HCl çözeltisi ile tamamlanmıştır. Vorteks ile karıştırılmıştır, vial filtresinden süzülerek, vial konulmuştur ve ölçümü alınmıştır (Verim: AT %5, FH %53).

500 µL plazma üzerine, 2000 µL AT ve FH çözeltisi ve üzerine 5000 µL YPSK dereceli metanol eklenmiştir. Vorteks ile karıştırılmıştır, 5000 devir dk^{-1} 'da 5 dk santrifüjlenmiştir, çökme olmuştur. Üstteki sıvı kısım başka bir tüpe alınmıştır, evaporatörde buharlaştırılmıştır, kalıntıya 4000 µL etilasetat/dietileter (1:1) eklenmiştir. Vorteks ile karıştırılmıştır, 5000 devir dk^{-1} 'da 5 dk santrifüjlenmiştir, çökme olmuştur. Üstteki sıvı faz başka tüpe alınmıştır, evaporatörde buharlaştırılmıştır, kalıntı 2000 µL HCl çözeltisi ile tamamlanmıştır. Vorteks ile karıştırılmıştır, vial filtresinden süzülerek, vial konulmuş ve ölçümü alınmıştır (Verim: AT %5, FH %80).

500 µL plazma üzerine, 2000 µL AT ve FH çözeltisi ve üzerine 5000 µL YPSK dereceli metanol eklenmiştir. Vorteks ile karıştırılmıştır, 5000 devir dk^{-1} 'da 5 dk santrifüjlenmiştir, çökme olmuştur. Üstteki sıvı kısım başka bir tüpe alınmıştır, evaporatörde buharlaştırılmıştır, kalıntıya 4000 µL metiltertbüileter eklenmiştir. Vorteks ile karıştırılmıştır, 5000 devir dk^{-1} 'da 5 dk santrifüjlenmiştir, çökme olmuştur. Üstteki sıvı faz başka tüpe alınmıştır, evaporatörde buharlaştırılmıştır, kalıntı 2000 µL HCl çözeltisi ile tamamlanmıştır. Vorteks ile karıştırılmıştır, vial filtresinden süzülerek, vial konulmuş ve ölçümü alınmıştır (Verim: AT %1, FH %68).

500 µL plazma üzerine, 2000 µL AT ve FH çözeltisi ve üzerine 5000 µL YPSK dereceli metanol eklenmiştir. Vorteks ile karıştırılmıştır, 5000 devir dk^{-1} 'da 5 dk santrifüjlenmiştir, çökme olmuştur. Üstteki sıvı kısım başka bir tüpe alınmıştır, evaporatörde buharlaştırılmıştır, kalıntıya 2000 µL HCl çözeltisi eklenmiştir. Vorteks

ile karıştırılmıştır, 5000 devir dk^{-1} 'da 5 dk santrifüjlenmiştir, çökme olmuştur. Üstteki sıvı faz vial filtresinden süzülerek vial konulmuş ve ölçümü alınmıştır (Verim: AT %95, FH %49).

500 μL plazma üzerine, 2000 μL AT ve FH çözeltisi, üzerine 100 μL , 0,1 M NaOH çözeltisi ve 8000 μL YPSK dereceli metanol eklenmiştir. Vorteks ile karıştırılmıştır, 5000 devir dk^{-1} 'da 5 dk santrifüjlenmiştir, çökme olmuştur. Üstteki sıvı kısım başka bir tüpe alınmıştır, evaporatörde buharlaştırılmıştır, kalıntıya 2000 μL HCl çözeltisi eklenmiştir. Vorteks ile karıştırılmıştır, 5000 devir dk^{-1} 'da 5 dk santrifüjlenmiştir, çökme olmuştur. Üstteki sıvı faz vial filtresinden süzülerek vial konulmuş ve ölçümü alınmıştır (Verim: AT %44, FH %34).

500 μL plazma üzerine, 2000 μL AT ve FH çözeltisi, üzerine 200 μL , 0,1 M NaOH çözeltisi ve 5000 μL YPSK dereceli asetonitril eklenmiştir. Vorteks ile karıştırılmıştır, 5000 devir dk^{-1} 'da 5 dk santrifüjlenmiştir, çökme olmuştur. Üstteki sıvı kısım başka bir tüpe alınmıştır, evaporatörde buharlaştırılmıştır, kalıntıya 2000 μL HCl çözeltisi eklenmiştir. Vorteks ile karıştırılmıştır, 5000 devir dk^{-1} 'da 5 dk santrifüjlenmiştir, çökme olmuştur. Üstteki sıvı faz vial filtresinden süzülerek vial konulmuş ve ölçümü alınmıştır (Verim: AT %68, FH %10).

500 μL plazma üzerine, 2000 μL AT ve FH çözeltisi, üzerine 100 μL , 0,1 M NaOH çözeltisi, 3000 μL YPSK dereceli metanol, 1000 μL etilasetat ve 1000 μL dietileter eklenmiştir. Vorteks ile karıştırılmıştır, 5000 devir dk^{-1} 'da 5 dk santrifüjlenmiştir, çökme olmuştur. Üstteki sıvı kısım başka bir tüpe alınmıştır, evaporatörde buharlaştırılmıştır, kalıntıya 2000 μL HCl çözeltisi eklenmiştir. Vorteks ile karıştırılmıştır, 5000 devir dk^{-1} 'da 5 dk santrifüjlenmiştir, çökme olmuştur. Üstteki sıvı faz vial filtresinden süzülerek vial konulmuş ve ölçümü alınmıştır (Verim: AT %56, FH %38).

500 μL plazma üzerine, 2000 μL AT ve FH çözeltisi, üzerine 100 μL , 0,1 M NaOH çözeltisi, 3000 μL YPSK dereceli metanol, 3000 μL YPSK dereceli asetonitril eklenmiştir. Vorteks ile karıştırılmıştır, 5000 devir dk^{-1} 'da 5 dk santrifüjlenmiştir, çökme olmuştur. Üstteki sıvı kısım başka bir tüpe alınmıştır, evaporatörde

buharlaştırılmıştır, kalıntıya 2000 µL HCl çözeltisi eklenmiştir. Vorteks ile karıştırılmıştır, 5000 devir dk^{-1} 'da 5 dk santrifüjlenmiştir, çökme olmuştur. Üstteki sıvı faz vial filtresinden süzülerek vial konulmuş ve ölçümü alınmıştır (Verim: AT %92, FH %5).

500 µL plazma üzerine, 800 µL AT ve FH çözeltisi, üzerine 100 µL, 0,1 M NaOH çözeltisi eklenmiştir, YPSK dereceli metanol ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Vorteks ile karıştırılmıştır, 5000 devir dk^{-1} 'da 5 dk santrifüjlenmiştir, çökme olmuştur. Üstteki sıvı faz vial filtresinden süzülerek, vial konulmuş ve ölçümü alınmıştır (Verim: AT %90, FH %106).

500 µL plazma üzerine, 800 µL AT ve FH çözeltisi, üzerine 200 µL, 0,1 M NaOH çözeltisi eklenmiştir, YPSK dereceli metanol ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Vorteks ile karıştırılmıştır, 5000 devir dk^{-1} 'da 5 dk santrifüjlenmiştir, çökme olmadığından ölçüm alınamamıştır.

500 µL plazma üzerine, 800 µL AT ve FH çözeltisi, üzerine 100 µL, 0,1 M NaOH çözeltisi eklenmiştir, metanol/0,01 N HCl (%35/%65) çözeltisi ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Vorteks ile karıştırılmıştır, 5000 devir dk^{-1} 'da 5 dk santrifüjlenmiştir, çökme olmuştur. Üstteki sıvı faz vial filtresinden süzülerek vial konulmuş ve ölçümü alınmıştır (Verim: AT %87, FH %104).

500 µL plazma üzerine, 800 µL AT ve FH çözeltisi, üzerine 100 µL, 0,1 M NaOH çözeltisi eklenmiştir, metanol/fosfat tamponu (%35/%65) çözeltisi ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Vorteks ile karıştırılmıştır, 5000 devir dk^{-1} 'da 5 dk santrifüjlenmiştir, çökme olmuştur. Üstteki sıvı faz vial filtresinden süzülerek, vial konulmuş ve ölçümü alınmıştır (Verim: AT %90, FH %95).

500 µL amonyumklorür ile çöktürülmüş plazma üzerine, 800 µL AT ve FH çözeltisi eklenmiştir, metanol ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Vorteks ile karıştırılmıştır, 5000 devir dk^{-1} 'da 5 dk santrifüjlenmiştir, çökme olmuştur. Üstteki sıvı faz vial filtresinden süzülerek vial konulmuş ve ölçümü alınmıştır (Verim: AT %87, FH %121).

500 µL plazma üzerine, 800 µL AT ve FH çözeltisi, üzerine 100 µL, 0,1 M NaOH çözeltisi, 1000 µL etilasetat, 1000 µL dietileter eklenmiştir, YPSK dereceli metanol ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Vorteks ile karıştırılmıştır, 5000 devir dk^{-1} 'da 5 dk santrifüjlenmiştir, çökme olmuştur. Üstteki sıvı faz vial filtresinden süzülerek vial konulmuş ve ölçümü alınmıştır (Verim: AT %85, FH %102).

500 µL plazma üzerine, 800 µL AT ve FH çözeltisi, üzerine 1000 µL dietileter eklenmiştir, YPSK dereceli metanol ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Vorteks ile karıştırılmıştır, 5000 devir dk^{-1} 'da 5 dk santrifüjlenmiştir, çökme olmuştur. Üstteki sıvı faz vial filtresinden süzülerek vial konulmuş ve ölçümü alınmıştır. (Verim: AT %87, FH %103).

3.3. Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi

3.3.1. YPSK yöntemi ile yapılan çalışmalar

3.3.1.1. Yöntemin optimizasyonu

AT ve FH'nin YPSK ile farmasötik preparatlardan aynı anda analizi için kromatografik koşullar optimize edilmiştir. Bu amaçla dedektör, dalgaboyu, mobil faz seçimi, sabit faz seçimi (kolon seçimi), mobil faz sistemi, mobil fazın bileşimi, mobil faz akış hızı, mobil faz pH'ı, enjeksiyon hacminin AT ve FH ters-faz sıvı kromatografisi ile ayırımına etkileri incelenmiştir. Belirtilen şartlar altında geliştirilen yöntem ilaç maddelerinin tabletlerinden hazırlanan karışıma uygulanmıştır.

3.3.1.2. Kromatografik şartlar

Geliştirilen YPSK yöntemi için en uygun şartlar:

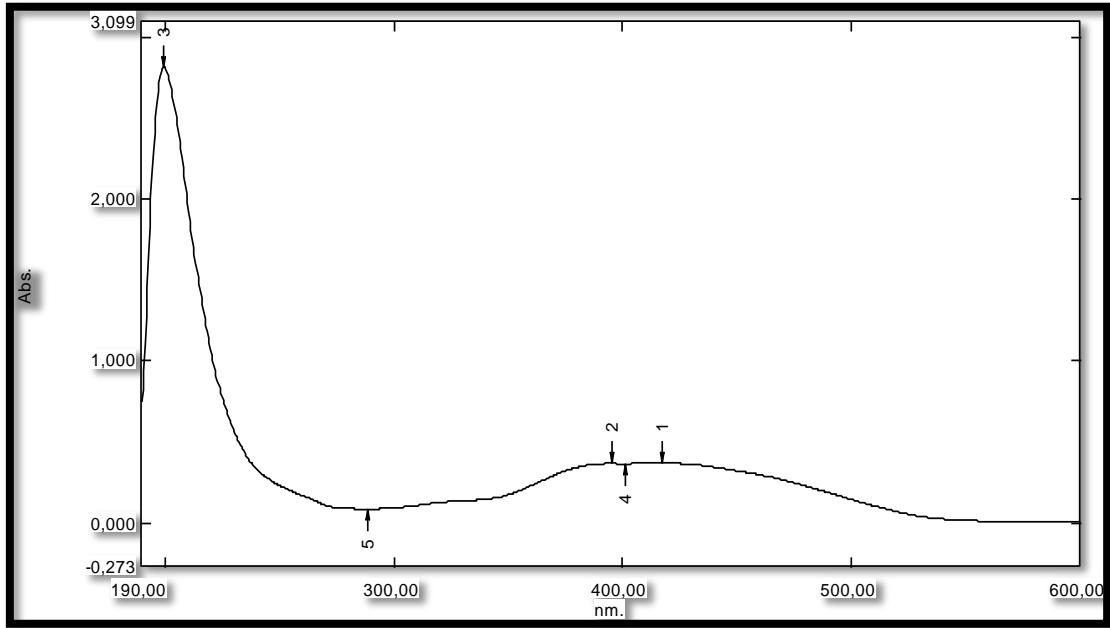
Gradient pompa sistemi kullanılarak, UV-DAD dedektörüyle 200-400 nm arası bölge taratılmış ve AT ile FH'nin 240 nm'de maksimum absorbans gösterdiği tespit edilmiştir. Analiz 5 µm (250 x 4,6 mm) parçacık boyutlu Inertsil ODS-3 ters faz C_{18}

kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. YPSK sistemi ile günlük çalışmanın başlangıcında 20 dk (1 mL dk^{-1} akış hızında) deiyonize su geçirilmiştir. Bunun için gürültünün en aza indiği ve sabit kaldığı zemin değeri elde edilinceye kadar mobil faz geçirilerek kolonun dengelenmesi sağlanmıştır ve analizlere başlanmıştır. Mobil faz için metanol-su, metanol-asetonitril, su-asetonitril, asetonitril-fosfat tamponu, metanol-fosfat tamponu, metanol-formikasit çözeltisi, asetonitril- formikasit çözeltisi gibi yüzdesi farklı kombinasyonlar (40:60, 50:50, 20:80, 5:95 gibi) kullanılarak optimize edilmiştir. Farklı mobil faz denemeleri sonucunda, en uygun gradient mobil faz karışımı olarak tespit edilen 65:35 oranında pH=3 (di potasyum hidrojen fosfat / amonyum di hidrojen fosfat) tamponu-metanol karışımı kullanılmıştır. YPSK sisteminde yapılan denemeler sonucunda, 40°C 'lik kolon fırını sıcaklığı, $10 \mu\text{L}$ 'lik enjeksiyon hacmi ve $1,3 \text{ mL dk}^{-1}$ 'lik akış hızı sistem için en uygun şartlar olarak seçilmiştir. Bu şartlarda alınan kromatogramlardan AT ve FH için alıkonma zamanları (RT, Retention Time) sırasıyla 4,6 ve 10,3 dk olarak tespit edilmiştir. Çalışma sonunda sistem ve kolon, Bölüm 3.2.2.'de anlatıldığı gibi temizlenmiştir.

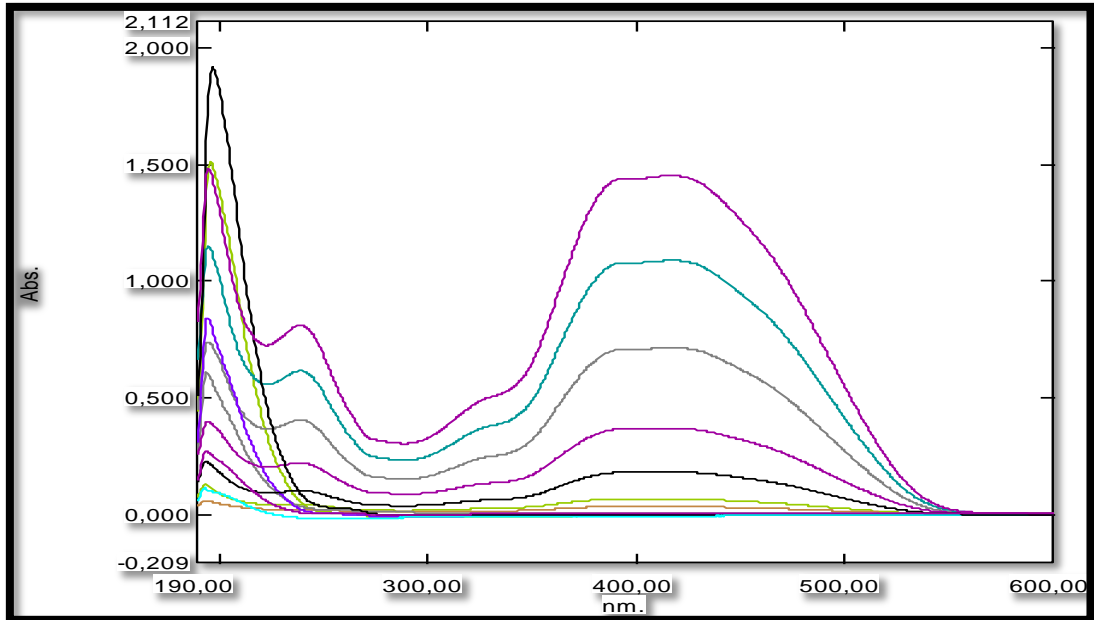
3.3.2. UV-GB spektrofotometresi ile yapılan çalışmalar

3.3.2.1. Ortam şartları ve türev derecesi seçimi için yapılan çalışmalar

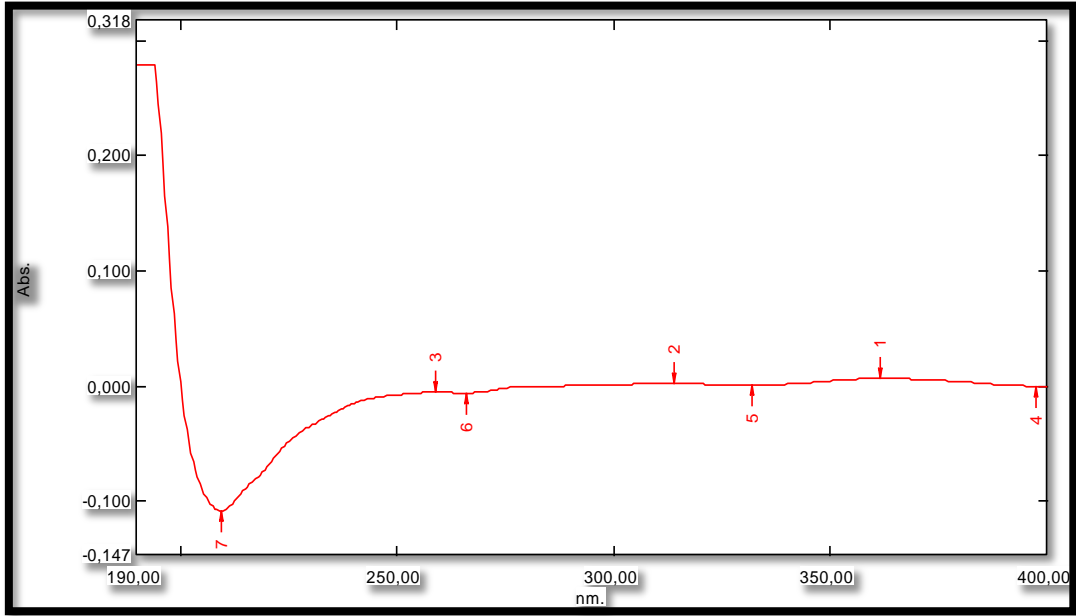
AT ve FH'nin UV spektrofotometresi ile farmasötik preparatlardan birlikte analizi için spektrofotometrik koşullar optimize edilmiştir. Spektrofotometre sıfırlandıktan sonra kör çözelti olarak etkin madde çözücüsüne uygun olarak 0,01 N HCl çözeltisi kullanılmıştır. Öncelikle 190 – 600 nm arası bölge taratılmış, elde edilen spektruma göre 190-400 nm arası bölgede çalışmanın uygun olacağı saptanmıştır. Ana spektrumun (Şekil 3.1. ve 3.2.) 1. 2. 3. ve 4. türev spektrumları (Şekil 3.3.-3.4.-3.5. ve 3.6.) 190 - 400 nm arasında kaydedilerek değerlendirilmiştir.



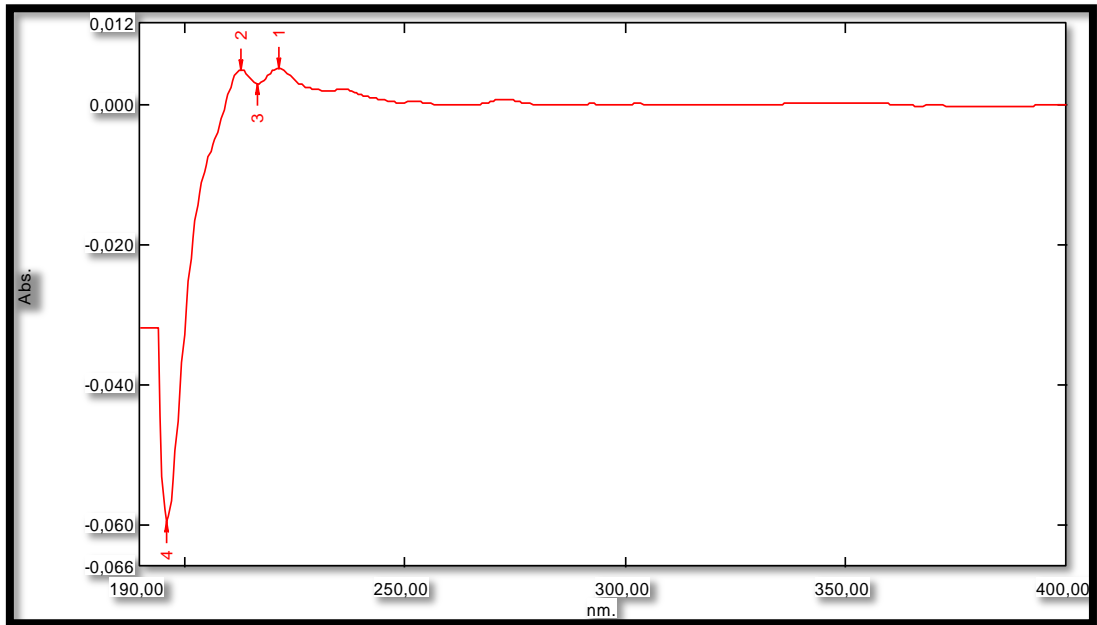
Şekil 3.1. $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik AT ve $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik FH olacak şekilde seyreltilmiş Azosilin tablete ait absorbanans spektrumu



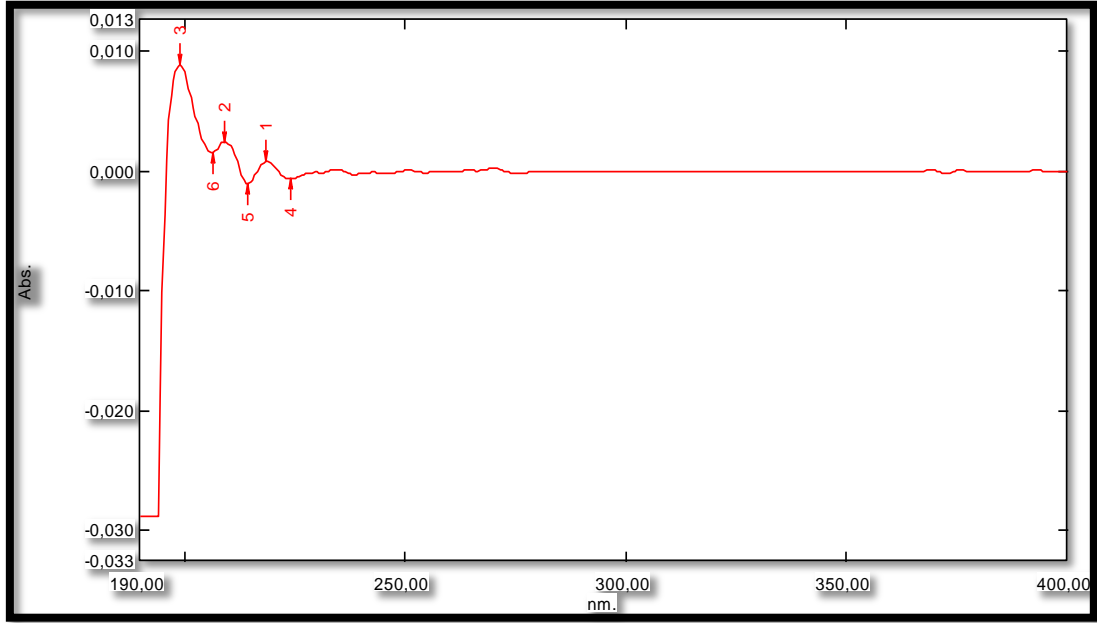
Şekil 3.2. AT ve FH çalışma standart çözeltilerine ait absorbanans spektrumu



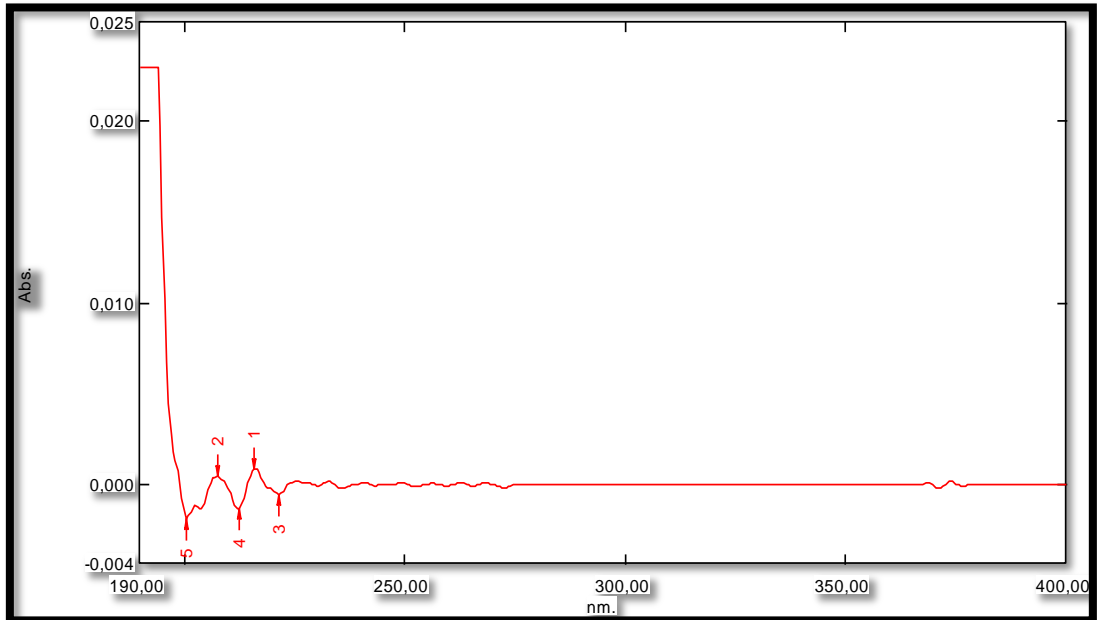
Şekil 3.3. $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik AT ve $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik FH olacak şekilde seyreltilmiş Azosilin tablete ait 1. derece türev spektrumu



Şekil 3.4. $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik AT ve $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik FH olacak şekilde seyreltilmiş Azosilin tablete ait 2. derece türev spektrumu



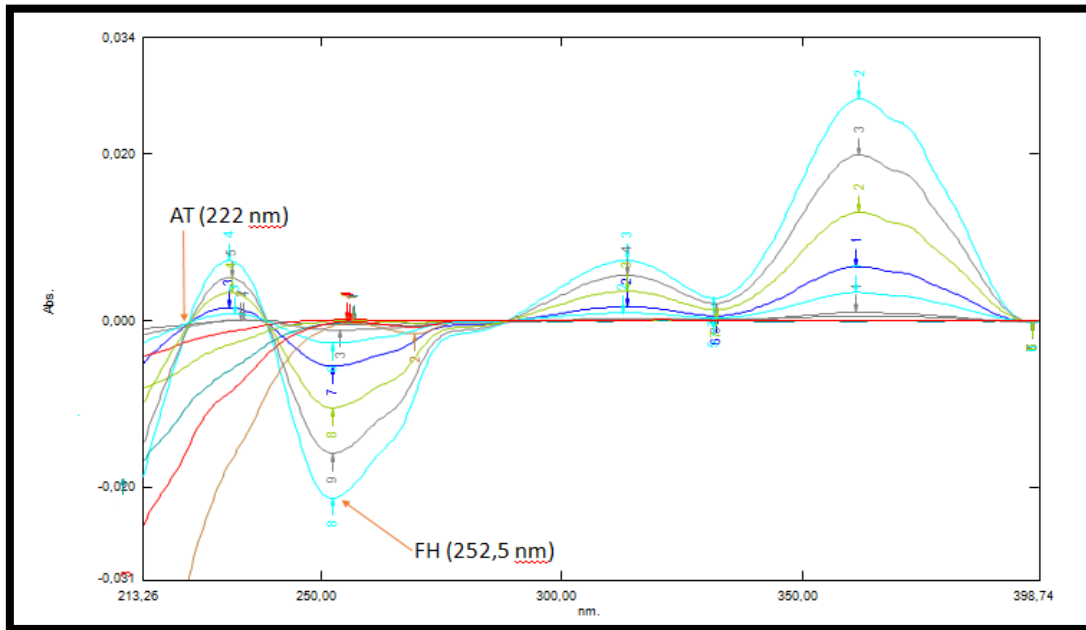
Şekil 3.5. $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik AT ve $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik FH olacak şekilde seyreltilmiş Azosilin tablete ait 3. derece türev spektrumu



Şekil 3.6. $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik AT ve $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik FH olacak şekilde seyreltilmiş Azosilin tablete ait 4. derece türev spektrumu

3.3.2.2. Kalibrasyon eğrilerinin hazırlanması

AT için 1-2,5-5,10-15-30-40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ve FH için 0,5-1-2,5-5-10-15-20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonlarındaki çözeltiler hazırlanmıştır. 0,01 N HCl çözeltisi körüne karşı en iyi sonucun elde edildiği 1. derece türev spektrumları esas alınmıştır (Şekil 3.7.). AT için 222 nm'de bir kesim noktası ve FH için 252,5 nm'de bir minimum nokta baz alınarak bulunan absorbans değerleri konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmiştir.

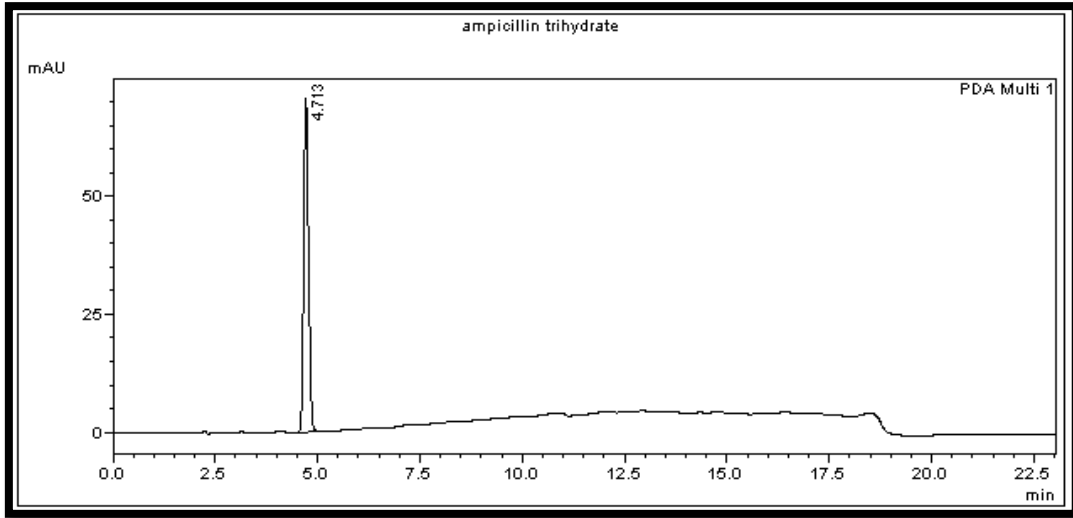


Şekil 3.7. AT ve FH çalışma standart çözeltilerine ait 1. derece türev spektrumu

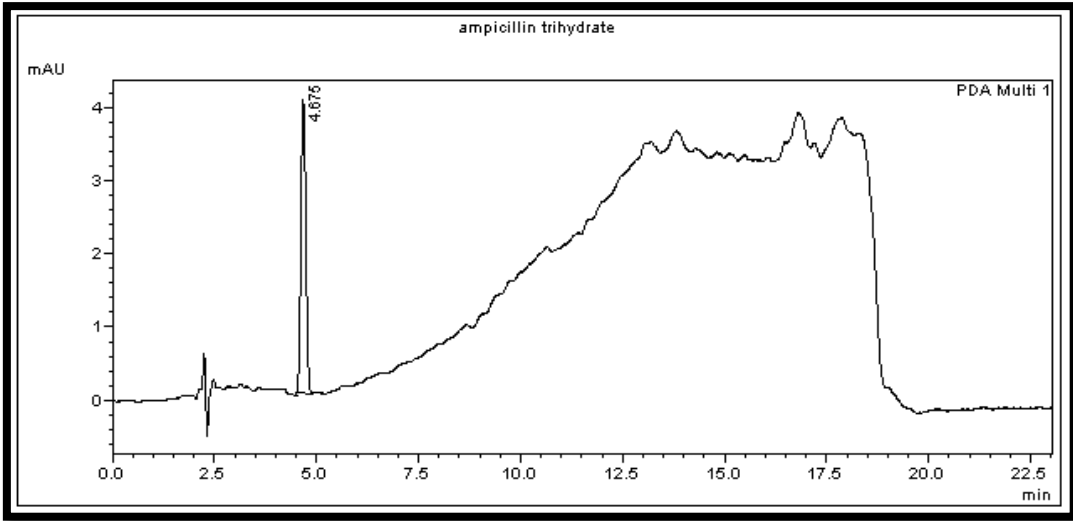
BÖLÜM 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. YPSK Yöntemiyle Çözücü Ortamında Elde Edilen Kromatogramlar

0,01 N HCl çözücü ortamında, $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ve $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik AT standartları için elde edilen sıvı kromatogramlar Şekil 4.1. ve 4.2.'de görülmektedir.

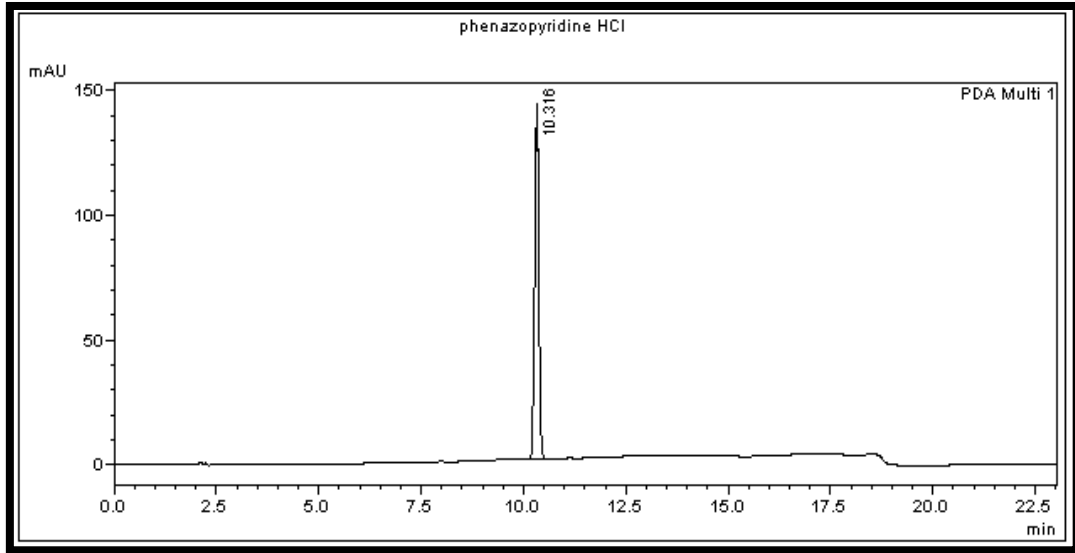


Şekil 4.1. $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik AT'ye ait kromatogram

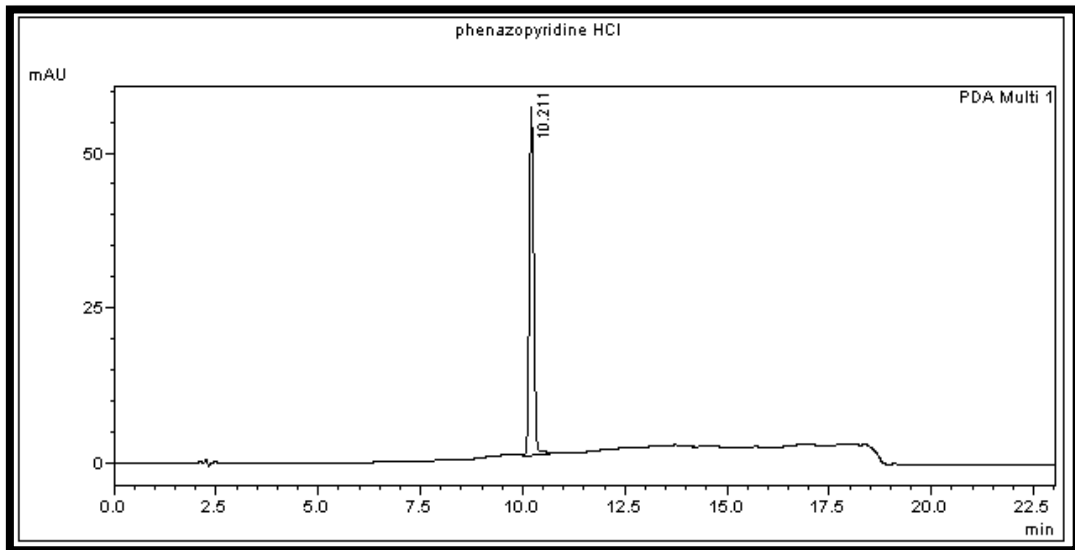


Şekil 4.2. $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik AT'ye ait kromatogram

0,01 N HCl çözücü ortamında, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ve $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik FH standartları için elde edilen sıvı kromatogramlar Şekil 4.3. ve 4.4.'de görülmektedir.

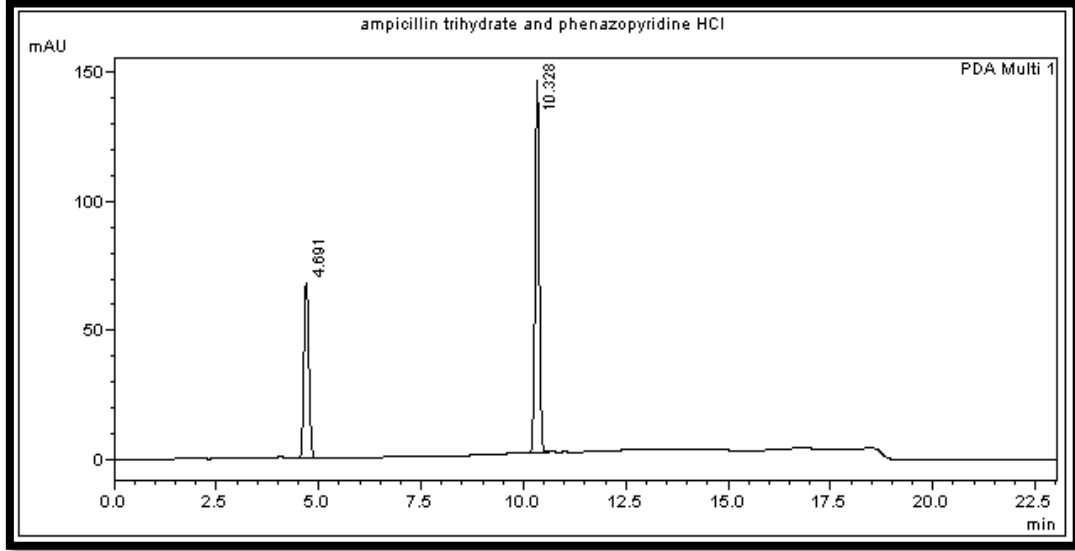


Şekil 4.3. $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik FH'ye ait kromatogram



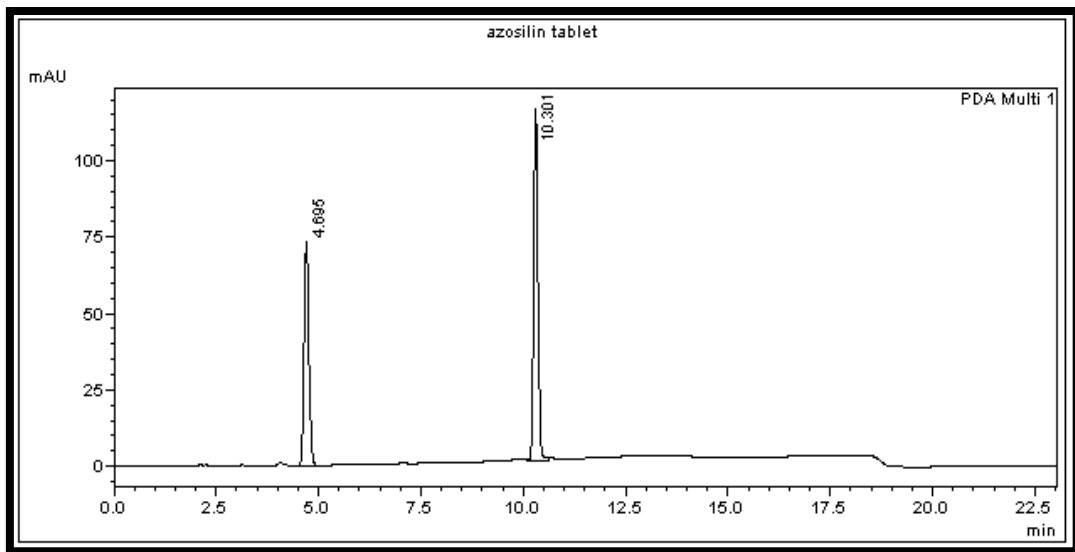
Şekil 4.4. $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik FH'ye ait kromatogram

0,01 N HCl çözücü ortamında, $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ AT ve $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ FH'nin birarada bulunduğu standard için elde edilen sıvı kromatogramı Şekil 4.5.'de görülmektedir.



Şekil 4.5. $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik AT ve $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik FH'ye ait kromatogram

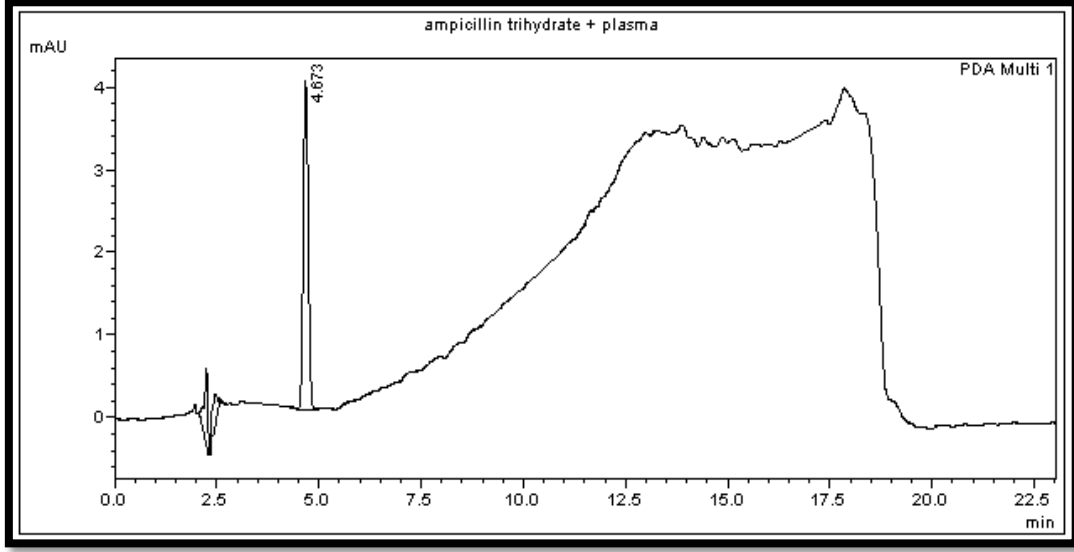
0,01 N HCl çözücü ortamında, $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ AT ve $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ FH'nin birarada bulunduğu Azosilin tablet çözeltisi için elde edilen sıvı kromatogramı ise Şekil 4.6.'da görülmektedir.



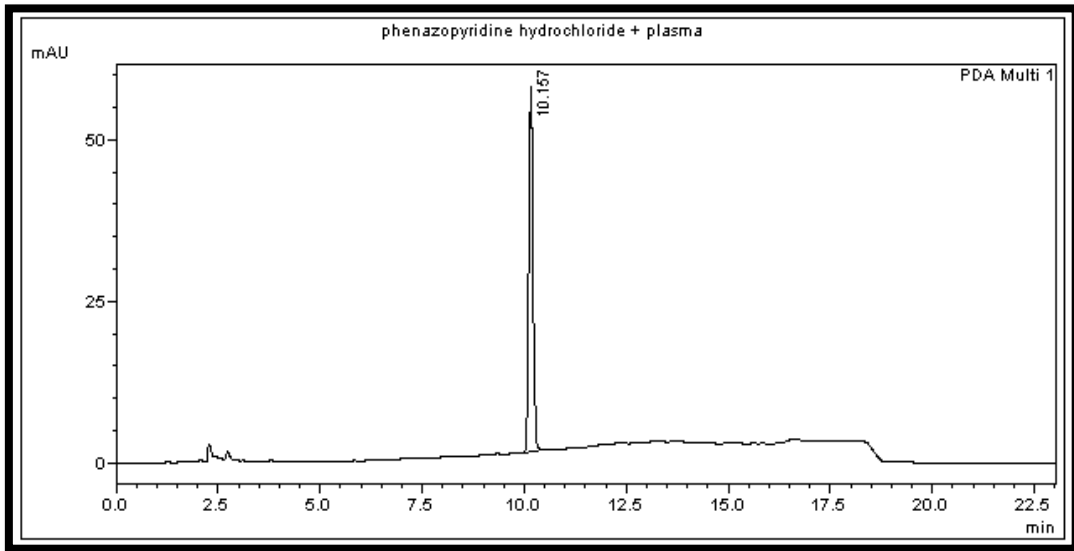
Şekil 4.6. $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik AT ve $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik FH içeren Azosilin tablete ait kromatogram

4.2. YPSK Yöntemiyle Plazma İçerisinde Elde Edilen Kromatogramlar

Plazma içerisinde, $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik AT ve $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik FH standartları için elde edilen sıvı kromatogramları Şekil 4.7. ve 4.8.'de görülmektedir.

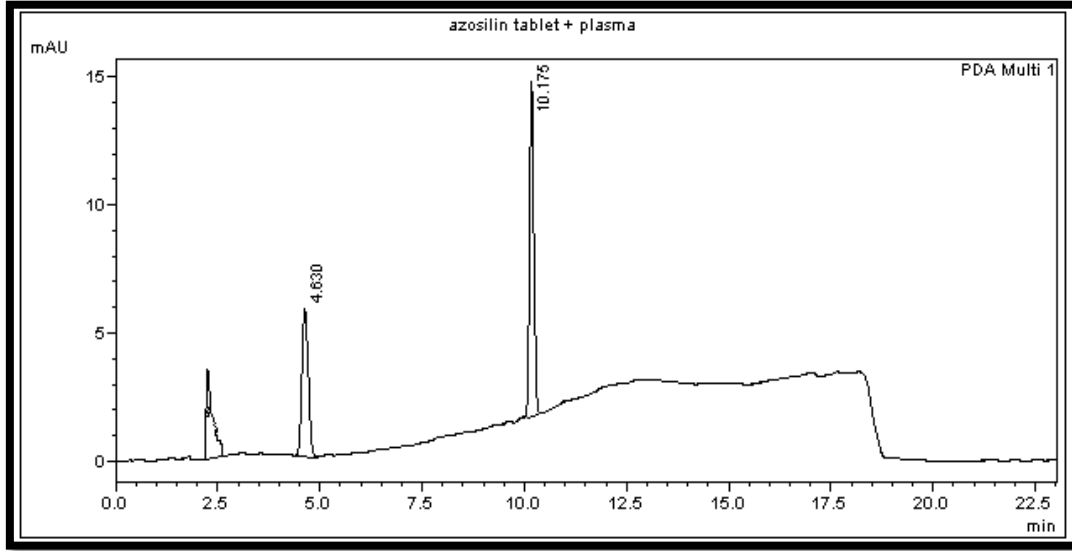


Şekil 4.7. $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik AT standardının plazma içerisindeki kromatogramı



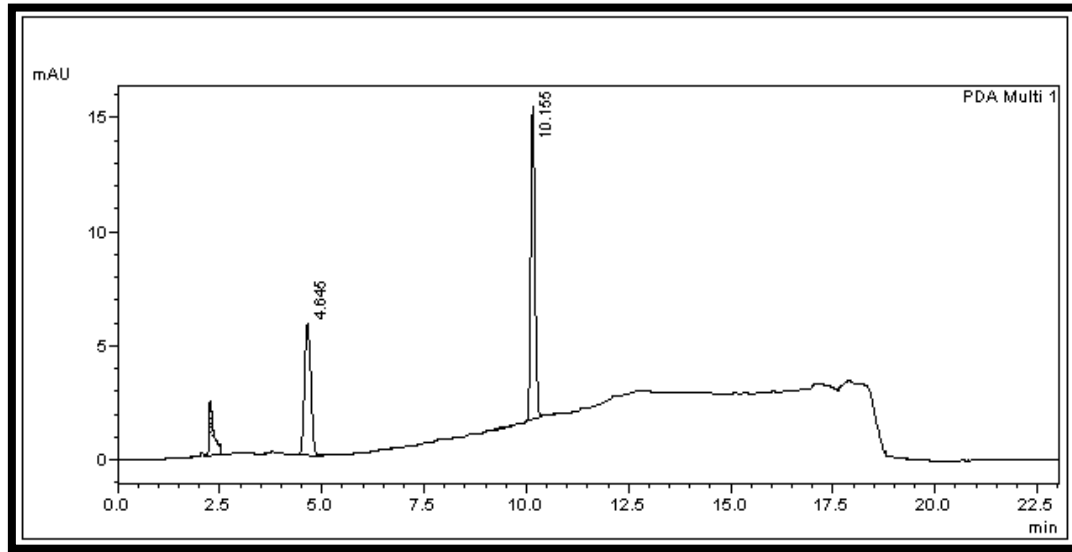
Şekil 4.8. $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik FH standardının plazma içerisindeki kromatogramı

Plazma içerisinde, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik AT ve $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik FH standartlarının birarada bulunduğu Azosilin tablet çözeltisi için elde edilen sıvı kromatogramı Şekil 4.9.'da görülmektedir.



Şekil 4.9. Plazma ortamında $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik AT ve $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik FH içeren Azosilin tablet çözeltisi için alınmış kromatogram

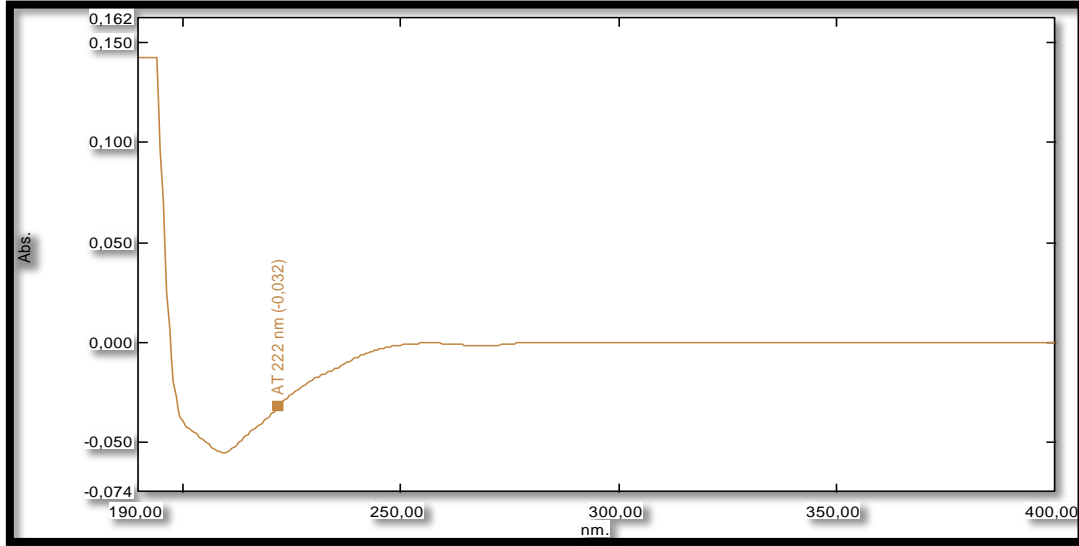
Plazma içerisinde, standart ekleme yöntemi ile $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik AT ve $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik FH içeren tablet çözeltileri üzerine $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik AT ve $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik FH standart çözeltilerinden eklenerek elde edilen sıvı kromatogramı Şekil 4.10.'da görülmektedir.



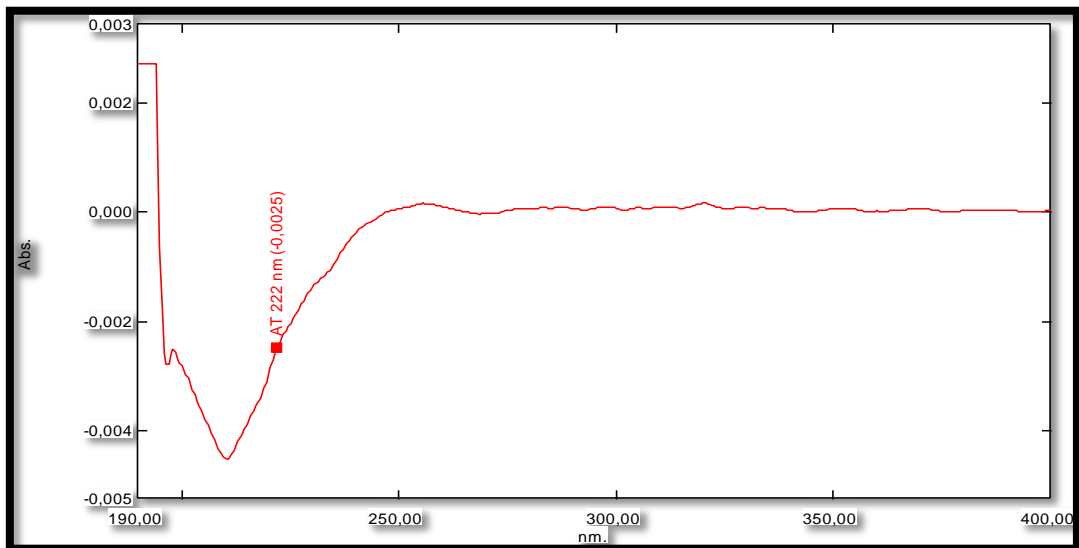
Şekil 4.10. Plazma ortamında standart ekleme yöntemiyle elde edilmiş kromatogram

4.3. UV Spektrofotometri Yöntemiyle Elde Edilen Spektrumlar

0,01 N HCl çözücü ortamında, $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ve $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik AT standartları için Şekil 4.11. ve 4.12.'de elde edilen 1.derece türev spektrumları görülmektedir.

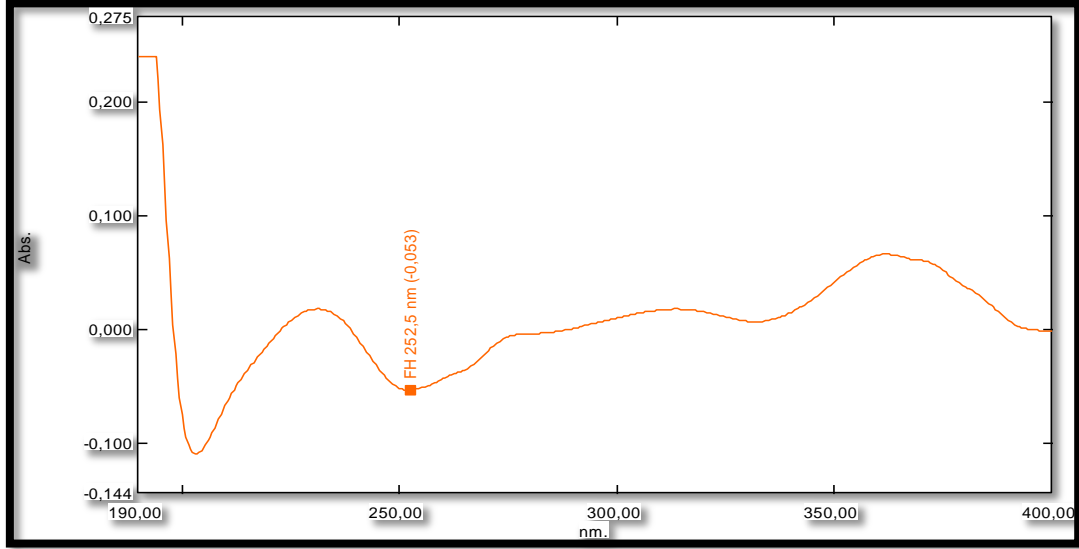


Şekil 4.11. $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik AT'ye ait 1. derece türev spektrumu (222 nm)

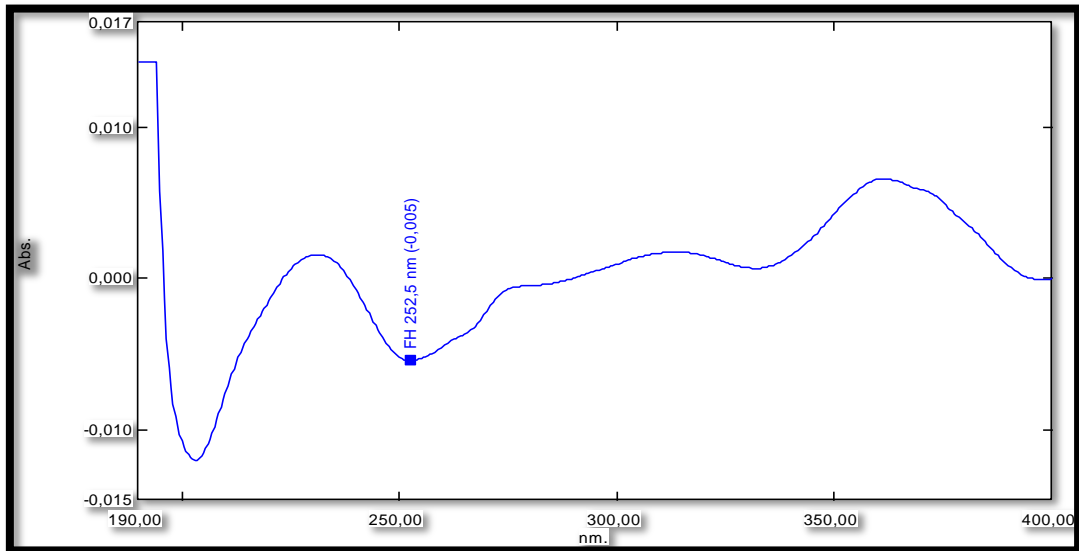


Şekil 4.12. $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik AT'ye ait 1. derece türev spektrumu (222 nm)

0,01 N HCl çözücü ortamında, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ve $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik FH standartları için Şekil 4.13. ve 4.14.'de elde edilen 1.derece türev spektrumları görülmektedir.

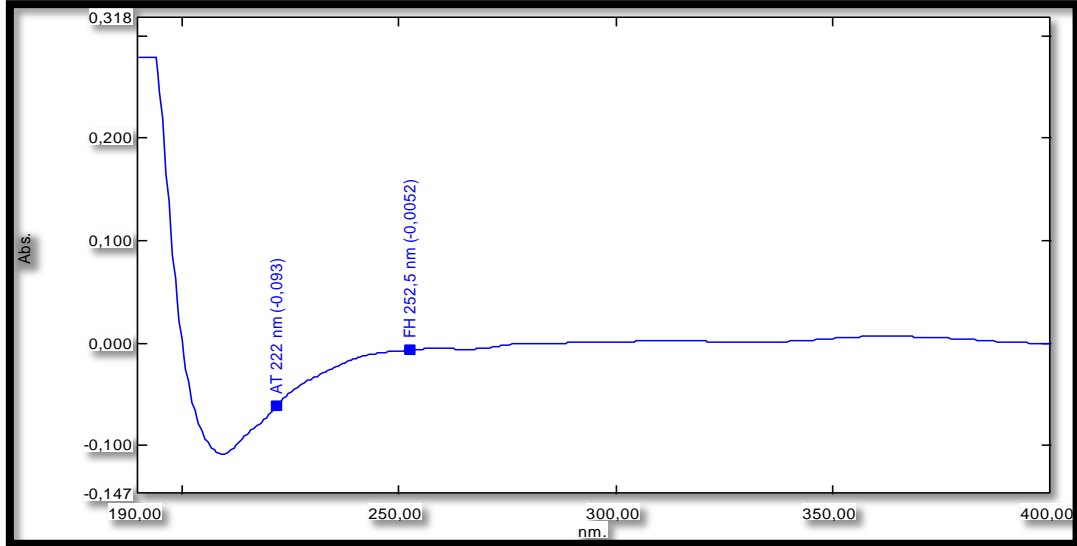


Şekil 4.13. $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik FH'ye ait 1. derece türev spektrumu (252,5 nm)



Şekil 4.14. $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik FH'ye ait 1. derece türev spektrumu (252,5 nm)

0,01 N HCl çözücü ortamında, 50 µg mL⁻¹'lik AT ve 5 µg mL⁻¹'lik FH içeren Azosilin tablet çözeltisine ait Şekil 4.15.'de elde edilen 1.derece türev spektrumu görülmektedir.



Şekil 4.15. 50 µg mL⁻¹'lik AT ve 5 µg mL⁻¹'lik FH içeren Azosilin tablet çözeltisine ait 1. derece türev spektrumu

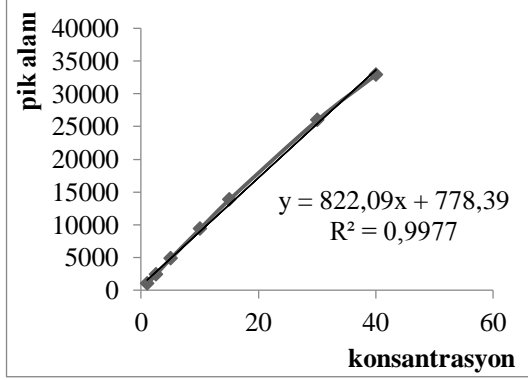
4.4. Yöntemlerin Validasyonu Çalışmaları

Metot geliştirme işlemi tamamlandıktan sonra analitik metot validasyonu ICH kılavuzu Q2 ye göre yapılmıştır [112]. Kararlılık, doğrusallık, duyarlılık, kesinlik, doğruluk, geri kazanım, özgünlük, sağlamlık ve tutarlılık gibi validasyon parametreleri incelenmiş ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Anova, Student t-testi, F-testi kullanılarak karşılaştırmalar yapılmıştır.

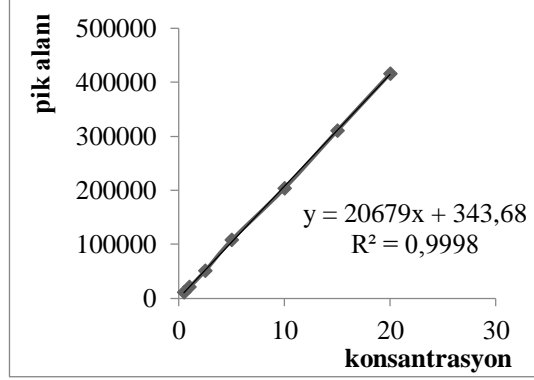
4.4.1. Doğrusallık aralığı ve kalibrasyon eğrileri

Doğrusal aralık, geliştirilen yöntemin kabul edilebilir duyarlılık ve tekrarlanabilirlik ile sonuçlar verdiği konsantrasyon aralığıdır. Kalibrasyon eğrileri, 7 farklı konsantrasyonda AT ve FH içeren standart çözeltilerden elde edilen kromatogramlar ve spektrumlarından elde edilen pik alanları ve absorbanların ilgili konsantrasyonlara karşı grafiğe geçirilmesi ile hazırlanmıştır. Bütün kalibrasyon eğrileri, AT için 1-40 µg mL⁻¹ aralığında ve FH için ise 0,5-20 µg mL⁻¹ aralığında iyi bir doğrusallık

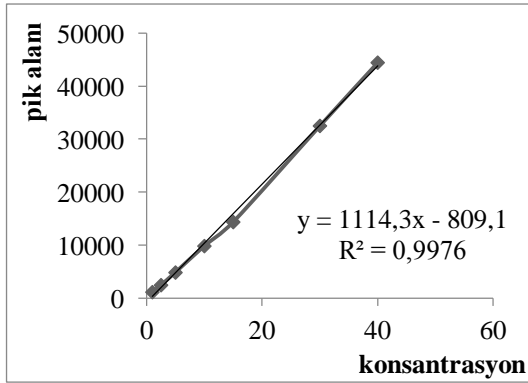
göstermiştir. Kalibrasyon eğrilerine ait regresyon denklemi ve regresyon katsayıları hesaplanmıştır (Şekil 4.16-4.21.).



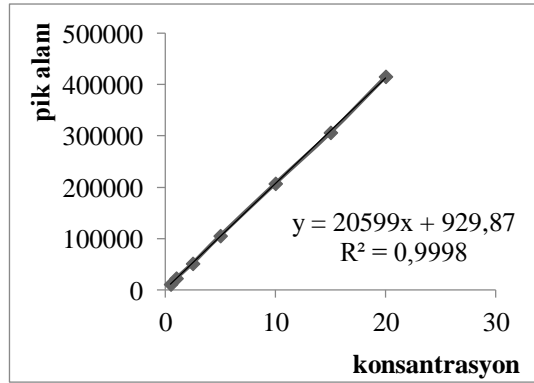
Şekil 4.16. YPSK ile çözücü ortamında, AT'nin standart çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi



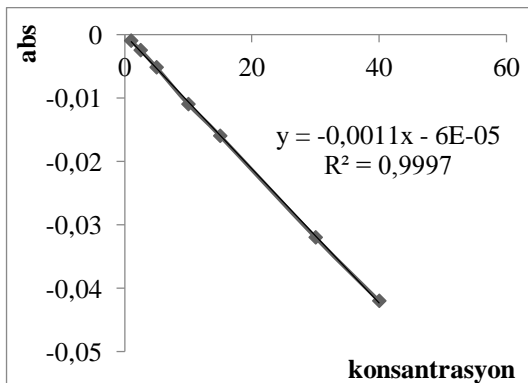
Şekil 4.17. YPSK ile çözücü ortamında, FH'nin standart çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi



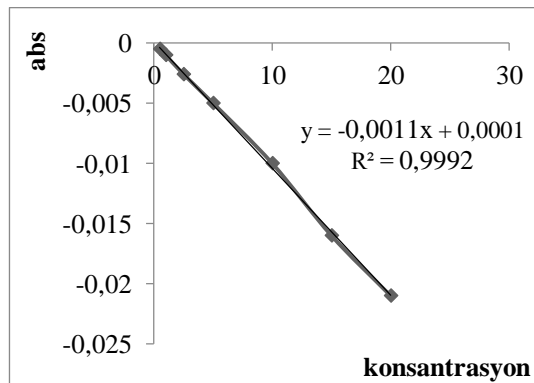
Şekil 4.18. YPSK ile plazma ortamında hazırlanan AT çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.19. YPSK ile plazma ortamında hazırlanan FH çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.20. AT standart çözeltilerinin 1. derece türev kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.21. FH standart çözeltilerinin 1. derece türev kalibrasyon eğrisi

Standart AT ve FH çözeltileri için elde edilen regresyon denklemleri, regresyon katsayıları, eğimleri ve kaymalarının standart sapmaları Tablo 4.1.-4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.1. YPSK sisteminde, çözücü ortamında AT standart çözeltilerinden elde edilmiş istatistiksel analiz sonuçları (240 nm'de) (n=6)

| Doğrusal Aralık, $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Regresyon Doğru Denklemi | S_b | S_m | Regresyon katsayısı, R^2 |
|---|-----------------------------|--------|-------|-------------------------------|
| 1-40 | $y = 822,09x + 778,39$ | 359,46 | 17,79 | 0,9977 |

S_b : Regresyon doğrusundaki kaymanın standart sapması, S_m : Regresyon doğrusu eğiminin standart sapması

Tablo 4.2. YPSK sisteminde, çözücü ortamında FH standart çözeltilerinden elde edilmiş istatistiksel analiz sonuçları (240 nm'de) (n=6)

| Doğrusal Aralık, $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Regresyon Doğru Denklemi | S_b | S_m | Regresyon katsayısı, R^2 |
|---|-----------------------------|---------|--------|-------------------------------|
| 0,5-20 | $y = 20679x + 343,68$ | 1509,34 | 145,09 | 0,9998 |

Tablo 4.3. YPSK sisteminde, plazmalı ortamda AT standart çözeltilerinden elde edilmiş istatistiksel analiz sonuçları (240 nm'de) (n=6)

| Doğrusal Aralık, $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Regresyon Doğru Denklemi | S_b | S_m | Regresyon katsayısı, R^2 |
|---|-----------------------------|--------|-------|-------------------------------|
| 1-40 | $y = 1114,3x + 809,1$ | 498,45 | 24,67 | 0,9976 |

Tablo 4.4. YPSK sisteminde, plazmalı ortamda FH standart çözeltilerinden elde edilmiş istatistiksel analiz sonuçları (240 nm'de) (n=6)

| Doğrusal Aralık, $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Regresyon Doğru Denklemi | S_b | S_m | Regresyon katsayısı, R^2 |
|---|-----------------------------|---------|--------|-------------------------------|
| 0,5-20 | $y = 20599x + 929,87$ | 1213,55 | 116,66 | 0,9998 |

Tablo 4.5. UV sisteminde, çözücü ortamında AT standart çözeltilerinden elde edilmiş istatistiksel analiz sonuçları (222 nm'de) (n=6) 1.türev

| Doğrusal Aralık, $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Regresyon Doğru Denklemi | S_b | S_m | Regresyon katsayısı, R^2 |
|---|-----------------------------|----------|----------|-------------------------------|
| 1-40 | $y = -0,0011x - 6E-05$ | 1,54E-04 | 7,62E-06 | 0,9997 |

Tablo 4.6. UV sisteminde, çözücü ortamında FH standart çözeltilerinden elde edilmiş istatistiksel analiz sonuçları (252,5 nm'de) (n=6) 1.türev

| Doğrusal Aralık, $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Regresyon Doğru Denklemi | S_b | S_m | Regresyon katsayısı, R^2 |
|---|-----------------------------|----------|----------|-------------------------------|
| 0,5-20 | $y = -0,0011x + 0,0001$ | 1,42E-04 | 1,36E-05 | 0,9992 |

4.4.2. Kesinlik ve tekrarlanabilirlik

Çözeltilere ait konsantrasyon eğrileri aralığından seçilen 3 farklı konsantrasyon ile (AT için 2,5-10-30 $\mu\text{g mL}^{-1}$, FH için 1-5-15 $\mu\text{g mL}^{-1}$) tekrarlanabilirlik ve kesinlik parametreleri belirlenmiştir. Tekrarlanabilirlik için gün-içi olarak belli aralıklarda toplam 6 kez, günler-arası kesinlik için ise 3 gün peşpeşe belli aralıklarla ölçümler alınmıştır. Gün-içi ve günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik sonuçları, bulunan değerlerin ortalaması, standart sapması ve bağıl standart sapması şeklinde Tablo 4.7.-4.12.'de verilmiştir.

Tablo 4.7. YPSK sisteminde, çözücü ortamında AT standart çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik analiz sonuçları (n=6)

| Derişim ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | gün-içi | | | günler-arası | | |
|--------------------------------------|---------|--------|-------|--------------|---------|-------|
| | X | SD | % RSD | X | SD | % RSD |
| 2,5 | 2430 | 150,62 | 6,20 | 1987,80 | 145,03 | 7,30 |
| 10 | 9410 | 118,28 | 1,26 | 9054,50 | 746,87 | 8,24 |
| 30 | 25997 | 93,62 | 0,36 | 24698,83 | 2033,80 | 8,23 |

X: Ortalama Değer, SD: Standart Sapma, % RSD: Bağıl Standart Sapma

Tablo 4.8. YPSK sisteminde, çözücü ortamında FH standart çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik analiz sonuçları (n=6)

| Derişim ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | gün-içi | | | günler-arası | | |
|--------------------------------------|-----------|---------|-------|--------------|----------|-------|
| | X | SD | % RSD | X | SD | % RSD |
| 1 | 20844,67 | 1605,08 | 7,70 | 19315,17 | 698,83 | 3,62 |
| 5 | 107857,80 | 6815,51 | 6,31 | 101903,83 | 7739,85 | 7,60 |
| 15 | 310005,20 | 7728,99 | 2,50 | 297427,67 | 10631,15 | 3,57 |

Tablo 4.9. YPSK sisteminde, plazmalı ortamda AT standart çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik analiz sonuçları (n=6)

| Derişim ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | gün-içi | | | günler-arası | | |
|--------------------------------------|----------|--------|-------|--------------|--------|-------|
| | X | SD | % RSD | X | SD | % RSD |
| 2,5 | 2463,00 | 107,53 | 4,36 | 2421,60 | 139,88 | 5,77 |
| 10 | 9842,17 | 42,69 | 0,43 | 9389,50 | 478,34 | 5,09 |
| 30 | 32526,40 | 308,79 | 0,94 | 31763,40 | 482,16 | 1,51 |

Tablo 4.10. YPSK sisteminde, plazmalı ortamda FH standart çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik analiz sonuçları (n=6)

| Derişim ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | gün-içi | | | günler-arası | | |
|--------------------------------------|-----------|---------|-------|--------------|---------|-------|
| | X | SD | % RSD | X | SD | % RSD |
| 1 | 22590,17 | 454,10 | 2,01 | 22536,20 | 1212,79 | 5,30 |
| 5 | 105257,71 | 2548,89 | 2,42 | 104021,17 | 1655,94 | 1,50 |
| 15 | 306272,17 | 2753,50 | 0,89 | 306611,67 | 2325,91 | 0,75 |

Tablo 4.11. UV sisteminde, çözücü ortamında AT standart çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik analiz sonuçları (n=6)

| Derişim ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | gün-içi | | | günler-arası | | |
|--------------------------------------|----------|-----------|-------|--------------|---------|-------|
| | X | SD | % RSD | X | SD | % RSD |
| 2,5 | -0,00250 | 0,00041 | -9,78 | -0,00270 | 0,00055 | -6,39 |
| 10 | -0,01100 | 0,00041 | -2,24 | -0,01100 | 0,00052 | -2,92 |
| 30 | -0,03200 | 0,0006325 | -1,14 | -0,03200 | 0,00117 | -2,17 |

Tablo 4.12. UV sisteminde, çözücü ortamında FH standart çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik analiz sonuçları (n=6)

| Derişim ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | gün-içi | | | günler-arası | | |
|--------------------------------------|----------|---------|-------|--------------|---------|-------|
| | X | SD | % RSD | X | SD | % RSD |
| 1 | -0,00210 | 0,00004 | -1,94 | -0,00101 | 0,00004 | -4,01 |
| 5 | -0,00500 | 0,00019 | -3,80 | -0,00500 | 0,00044 | -8,86 |
| 15 | -0,01600 | 0,00063 | -3,95 | -0,01600 | 0,00063 | -3,95 |

Bu hesaplanan değerlerden elde edilen tayin edilebilen en küçük derişim, yani miktar tayin limiti olan LOQ değerleri ve tespit sınırı olarak tayin edilen LOD değerleri şu şekildedir: YPSK metodu için; çözücü ortamında, AT için LOQ: 0,86 ve LOD: 0,32 $\mu\text{g mL}^{-1}$, FH için LOQ: 0,65 ve LOD: 0,19 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Plazma ortamında, AT için LOQ: 0,79 ve LOD: 0,29 $\mu\text{g mL}^{-1}$, FH için LOQ: 0,37 ve LOD: 0,14 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. UV-GB metodu için; çözücü ortamında, AT için LOQ: 0,49 ve LOD: 0,15 $\mu\text{g mL}^{-1}$, FH için LOQ: 0,4 ve LOD: 0,12 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak belirlenmiştir.

Her iki etken madde için gün-içi ve günler-arası RSD'lerin oldukça iyi kesinlikler verdiği de gözlenmiştir. Kesinlik tayini için gün-içi ve günler-arası ölçümlerdeki RSD'lerin $< \% 10$ ve LOQ'nin de $< \% 20$ olması ve ayrıca doğruluk için günler-arası ortalama değer (X), gerçek değer $\pm \% 15$ içinde ve LOQ'nun da $\pm \% 20$ 'den fazla sapmaması koşulunu sağladığı tespit edilmiştir. Duyarlılık için ise, günler-arası RSD değerleri içinde, LOQ'in $< \% 20$ olduğu ve değerlerin kendi aralarında tekrarlanabilirliği sağladığı da tespit edilmiştir.

4.4.3. Sistem uygunluk parametreleri

1,3 mL dk⁻¹ akış hızında, AT ve FH için kapasite faktörleri; k_{AT}' : 0,88 ve k_{FH}' : 3,13, seçicilik katsayısı; α : 3,97, kolon verimliliğinin göstergesi olan toplam teorik plaka sayısı; N_{AT} : 3912 ve N_{FH} : 6827, kolonun ayırma gücü olan rezolüsyon; R_s : 14,09 ve

plaka yükseklikleri ise; H_{AT} : $6,39 \cdot 10^{-3}$ cm ve H_{FH} : $3,66 \cdot 10^{-3}$ cm olarak tespit edilmiştir (CDER, Centre for Drug Evaluation and Research'e göre) [77].

4.4.4. Geri kazanım ve doğruluk

4.4.4.1. Yöntemin farmasötik preparatlara uygulanması

YPSK ve UV ile 0,01 N HCl çözücü ortamında, Bölüm 3.2.7'de hazırlanan AT ve FH çözeltileri için elde edilen geri kazanım değerleri, Tablo 4.13. ve 4.14.'te verilmiştir.

Tablo 4.13. YPSK sisteminde, çözücü ortamında, AT ve FH standart çözeltilerinin geri kazanım değerleri

| AT ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | | | | FH ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------|-----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------|-----------------|
| Eklenen ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Bulunan ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Geri Kazanım (%) | Doğruluk BH (%) | Eklenen ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Bulunan ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Geri Kazanım (%) | Doğruluk BH (%) |
| 50 | 51,38 | 102,76 | 2,80 | 5 | 4,93 | 98,60 | 1,40 |
| 50 | 51,37 | 102,74 | 2,70 | 5 | 5,15 | 103,00 | 3,00 |
| 50 | 51,13 | 102,26 | 2,30 | 5 | 5,14 | 102,80 | 2,80 |
| 50 | 51,27 | 102,54 | 2,50 | 5 | 4,99 | 99,80 | 0,20 |
| 50 | 50,94 | 101,88 | 1,90 | 5 | 5,08 | 101,60 | 1,60 |
| 50 | 50,53 | 101,06 | 1,10 | 5 | 4,86 | 97,20 | 2,80 |

Geri Kazanım = Bulunan Miktar/Bilinen Miktar x 100, BH = Bulunan Miktar-Bilinen Miktar/Bilinen Miktar x 100

Tablo 4.14. UV sisteminde, çözücü ortamında, AT ve FH standart çözeltilerinin geri kazanım değerleri

| AT ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | | | | FH ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------|-----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------|-----------------|
| Eklenen ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Bulunan ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Geri Kazanım (%) | Doğruluk BH (%) | Eklenen ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Bulunan ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Geri Kazanım (%) | Doğruluk BH (%) |
| 50 | 52,77 | 105,54 | 5,54 | 5 | 5,20 | 104,00 | 4,00 |
| 50 | 51,11 | 102,22 | 2,22 | 5 | 5,40 | 108,00 | 8,00 |
| 50 | 52,22 | 104,44 | 4,44 | 5 | 5,30 | 106,00 | 6,00 |
| 50 | 51,11 | 102,22 | 2,22 | 5 | 5,20 | 104,00 | 4,00 |
| 50 | 52,22 | 104,44 | 4,44 | 5 | 5,10 | 102,00 | 2,00 |
| 50 | 50,55 | 101,10 | 1,10 | 5 | 5,30 | 106,00 | 6,00 |

YPSK ile plazma ortamında, Bölüm 3.2.10'da hazırlanan AT ve FH çözeltileri için elde edilen geri kazanım değerleri, Tablo 4.15'te verilmiştir.

Tablo 4.15. YPSK sisteminde, plazmalı ortamda, AT ve FH standart çözeltilerinin geri kazanım değerleri

| AT ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | | | | FH ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | | | |
|------------------------------|---------------------------|---------|----------|------------------------------|---------------------------|---------|----------|
| Eklene | Bulunan | Geri | Doğruluk | Eklene | Bulunan | Geri | Doğruluk |
| ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Kazanım | BH | ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Kazanım | BH |
| | | (%) | (%) | | | (%) | (%) |
| 50 | 51,38 | 102,76 | 2,80 | 5 | 5,26 | 105,20 | 5,20 |
| 50 | 51,37 | 102,74 | 2,70 | 5 | 5,16 | 103,20 | 3,20 |
| 50 | 51,13 | 102,26 | 2,30 | 5 | 5,12 | 102,40 | 2,40 |
| 50 | 51,27 | 102,54 | 2,50 | 5 | 5,07 | 101,40 | 1,40 |
| 50 | 50,94 | 101,88 | 1,90 | 5 | 5,03 | 100,60 | 0,60 |
| 50 | 50,53 | 101,06 | 1,10 | 5 | 4,99 | 99,80 | -0,20 |

4.4.4.2. Standart ekleme yöntemi ile elde edilen sonuçlar

YPSK ve UV ile 0,01 N HCl çözücü ortamında, Bölüm 3.2.8'de hazırlanan AT ve FH standartları ile birlikte eklenen ticari standartlardan elde edilen geri kazanım, SD, RSD, BH (doğruluk) değerleri Tablo 4.16. ve 4.17.'de görülmektedir.

Tablo 4.16. YPSK sisteminde, çözücü ortamında, standart ekleme yöntemi ile elde edilmiş analiz sonuçları

| AT ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | | | | | FH ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | | | | |
|--|---------------|---------------------------|---------|------|--|---------------|---------------------------|---------|-------|
| Eklenen Miktar ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | | | | | Eklenen Miktar ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | | | | |
| Tablet | Standart | Bulunan | Geri | BH | Tablet | Standart | Bulunan | Geri | BH |
| | Çözelti | Miktar | Kazanım | (%) | | Çözelti | Miktar | Kazanım | (%) |
| | | ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | (%) | (%) | | | ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | (%) | (%) |
| 20 | 30 | 51,10 | 102,20 | 2,20 | 2 | 3 | 4,89 | 97,80 | -2,20 |
| 25 | 25 | 51,30 | 102,60 | 2,60 | 2,5 | 2,5 | 4,76 | 95,20 | -4,80 |
| 30 | 20 | 51,20 | 102,40 | 2,40 | 3 | 2 | 4,85 | 97,00 | -3,00 |
| 35 | 15 | 51,70 | 103,40 | 3,40 | 3,5 | 1,5 | 4,89 | 97,80 | -2,20 |
| 40 | 10 | 51,60 | 103,20 | 3,20 | 4 | 1 | 4,90 | 98,00 | -2,00 |
| | Ort. | | | | | Ort. | | | |
| | Konst. | 51,38 | | | | Konst. | 4,86 | | |
| | SD | 0,25 | | | | SD | 0,058 | | |
| | % RSD | 0,48 | | | | % RSD | 1,19 | | |

Tablo 4.17. UV sisteminde, çözücü ortamında, standart ekleme yöntemi ile elde edilmiş analiz sonuçları

| AT ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | | | | | FH ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | | | | | |
|---|------------------|--|------------------|--------|---|--------------------|--|------------------|--------|--|
| Eklene Miktar ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | | | | | Eklene Miktar ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | | | | | |
| Tablet | Standart Çözelti | Bulunan Miktar ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Geri Kazanım (%) | BH (%) | Tablet | Standart Çözelti | Bulunan Miktar ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Geri Kazanım (%) | BH (%) | |
| 20 | 30 | 50,55 | 101,00 | 1,00 | 2 | 3 | 5,20 | 104,00 | 4,00 | |
| 25 | 25 | 51,11 | 102,20 | 2,20 | 2,5 | 2,5 | 5,10 | 102,00 | 2,00 | |
| 30 | 20 | 50,55 | 101,00 | 1,00 | 3 | 2 | 5,30 | 106,00 | 6,00 | |
| 35 | 15 | 52,22 | 104,40 | 4,40 | 3,5 | 1,5 | 5,10 | 102,00 | 2,00 | |
| 40 | 10 | 51,11 | 102,20 | 2,20 | 4 | 1 | 5,20 | 104,00 | 4,00 | |
| Ort. Konst. | | 51,11 | | | | Ort. Konst. | | 5,18 | | |
| SD | | 0,68 | | | | SD | | 0,08 | | |
| % RSD | | 1,33 | | | | % RSD | | 1,60 | | |

YPSK ile plazma ortamında, Bölüm 3.2.11'da hazırlanan AT ve FH çözeltileri için elde edilen geri kazanım değerleri, Tablo 4.18'de verilmiştir.

Tablo 4.18. YPSK sisteminde, plazmalı ortamda, standart ekleme yöntemi ile elde edilmiş analiz sonuçları

| AT ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | | | | | FH ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | | | | | |
|---|------------------|--|------------------|--------|---|--------------------|--|------------------|--------|--|
| Eklene Miktar ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | | | | | Eklene Miktar ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | | | | | |
| Tablet | Standart Çözelti | Bulunan Miktar ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Geri Kazanım (%) | BH (%) | Tablet | Standart Çözelti | Bulunan Miktar ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Geri Kazanım (%) | BH (%) | |
| 20 | 30 | 52,90 | 105,80 | 5,80 | 2 | 3 | 5,26 | 105,20 | 5,20 | |
| 25 | 25 | 52,10 | 104,20 | 4,20 | 2,5 | 2,5 | 5,00 | 100,00 | 0,00 | |
| 30 | 20 | 53,06 | 106,12 | 6,12 | 3 | 2 | 4,87 | 97,00 | -3,00 | |
| 35 | 15 | 53,30 | 106,60 | 6,60 | 3,5 | 1,5 | 5,20 | 97,80 | -2,20 | |
| 40 | 10 | 51,50 | 103,00 | 3,00 | 4 | 1 | 4,90 | 98,00 | -2,00 | |
| Ort. Konst. | | 52,57 | | | | Ort. Konst. | | 5,04 | | |
| SD | | 0,74 | | | | SD | | 0,17 | | |
| % RSD | | 1,40 | | | | % RSD | | 3,37 | | |

4.5. İstatiksel Değerlendirmeler

Tablo 4.19.'da 0,01 N HCl çözücü ortamında ve plazma ortamında hazırlanmış ticari preparat numuneleri için ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$ AT, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ FH) elde edilen geri kazanım verileri t-testi ile karşılaştırılmıştır. t_{tablo} değerleri, $t_{\text{hesaplanan}}$ değerlerinden büyük olduğu için her iki geri kazanım veri grubu arasında bir fark olmadığı sonucuna varılmıştır. ($\alpha=0,05$, % 95 güvenle) (n=6).

Tablo 4.19. YPSK yönteminde, çözücü içerisinde ve plazma ortamında hazırlanmış ticari preparatlar için ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$ AT, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ FH) elde edilen t-testi verileri ($\alpha=0,05$, % 95 güvenle) (n=6)

| Deneme Sayısı (n=6) | AT | | FH | |
|---|-------------|--------|-------------|--------|
| | Standart | Plazma | Standart | Plazma |
| İstatiksel Değerler | | | | |
| Ortalama Değer | 102,21 | 106,09 | 100,50 | 101,63 |
| Standart Sapma (SD) | 0,65 | 1,58 | 2,35 | 4,52 |
| Bağlı Standart Sapma (RSD,%) | 0,63 | 1,48 | 2,33 | 4,44 |
| Standart Hata | 0,26 | 0,64 | 0,95 | 1,85 |
| t testi $t_{\text{hesaplanan}} (t_{\text{tablo}})$ | 1,96 (2,57) | | 0,18 (2,57) | |

Tablo 4.20.'de de çözücü ortamında ve plazma ortamında hazırlanmış ticari preparat numuneleri için ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$ AT, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ FH) elde edilen geri kazanım verileri, F-testi ile karşılaştırılmıştır. Bu teste göre, F_{tablo} değerleri, $F_{\text{hesaplanan}}$ değerlerinden büyük olduğu için her iki etken maddeyi içeren ticari preparatların çözücü ortamında ve plazma ortamında hazırlanması arasında bir fark olmadığı sonucuna varılmıştır. ($\alpha=0,05$, % 95 güvenle) (n=6).

Tablo 4.20. YPSK yönteminde, çözücü içerisinde ve plazma ortamında hazırlanmış ticari preparatlar için ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$ AT, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ FH) elde edilen F-testi verileri ($\alpha=0,05$, % 95 güvenle) ($n=6$)

| Deneme Sayısı ($n=6$) | AT | | FH | |
|---|---------------|--------|---------------|--------|
| | Standart | Plazma | Standart | Plazma |
| Ortalama Değer | 102,21 | 106,09 | 100,50 | 101,63 |
| Standart Sapma (SD) | 0,65 | 1,58 | 2,35 | 4,52 |
| Bağıl Standart Sapma (RSD,%) | 0,63 | 1,48 | 2,33 | 4,44 |
| Standart Hata | 0,26 | 0,64 | 0,95 | 1,85 |
| F testi $F_{\text{hesaplanan}} (F_{\text{tablo}})$ | 0,077 (0,198) | | 0,112 (0,198) | |

Tablo 4.21.'de, AT için çözücü ortamında hazırlanan ticari preparatlardan elde edilen geri kazanım değerleri ile plazma ortamındakiler, yine FH için çözücü ortamında hazırlanan ticari preparatlardan elde edilen geri kazanım değerleri ile plazma ortamındakiler, ANOVA testi ile karşılaştırılmıştır. F_{tablo} değeri (4,30), $F_{\text{hesaplanan}}$ (1,41) değerinden büyük olduğundan her iki etken maddeyi içeren ticari preparatların çözücü ortamında ve plazma ortamında hazırlanması arasında bir fark olmadığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca P değeri 0,25 olduğundan ($P>0,05$), grup ortalamaları eşittir ve karşılaştırmaya gerek yoktur.

Tablo 4.21. YPSK yönteminde, çözücü içerisinde ve plazma ortamında hazırlanmış ticari preparatlar için ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$ AT, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ FH) elde edilen ANOVA testi verileri ($\alpha=0,05$, % 95 güvenle) ($n=12$)

| ANOVA TEK ETKEN | | | | | | |
|------------------|-------|---------|----------|---------|----------|----------|
| Gruplar | Say | Toplam | Ortalama | Varyans | | |
| Sütun 1 | 12 | 1216,24 | 101,35 | 3,51 | | |
| Sütun 2 | 12 | 1225,84 | 102,15 | 1,92 | | |
| ANOVA | | | | | | |
| Varyans Kaynağı | SS | df | MS | F | P-değeri | F ölçütü |
| Gruplar Arasında | 3,84 | 1 | 3,84 | 1,41 | 0,25 | 4,30 |
| Gruplar İçinde | 59,70 | 22 | 2,71 | | | |
| Toplam | 63,54 | 23 | | | | |

Tablo 4.22. YPSK ve UV yönteminde, çözücü içerisinde hazırlanmış ticari preparatlar için ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$ AT, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ FH) elde edilen t-testi verileri ($\alpha=0,05$, % 95 güvenle) ($n=6$)

| Deneme Sayısı (n=6) | AT | | FH | |
|---|-------------|--------|-------------|--------|
| | YPSK | UV | YPSK | UV |
| İstatiksel Değerler | | | | |
| Ortalama Değer | 102,21 | 103,33 | 100,50 | 105,00 |
| Standart Sapma (SD) | 0,65 | 1,72 | 2,35 | 2,10 |
| Bağıl Standart Sapma (RSD,%) | 0,63 | 1,66 | 2,33 | 2,00 |
| Standart Hata | 0,26 | 0,70 | 0,95 | 0,86 |
| t testi $t_{\text{hesaplanan}} (t_{\text{tablo}})$ | 1,78 (2,57) | | 2,02 (2,57) | |

Tablo 4.22.'de elde edilen verilere göre, YPSK ve UV yönteminde AT ve FH içeren ticari preparatların ayrı ayrı 0,01 N HCl ortamında hazırlanmasıyla elde edilen geri kazanım verileri, t-testi ile karşılaştırılmış ve bu sonuçlara göre, $t_{\text{hesaplanan}}$ değerleri, t_{tablo} değerlerinden küçük olduğu için her iki yöntem arasında fark olmadığı sonucuna varılmıştır.

Tablo 4.23. YPSK ve UV yönteminde, çözücü içerisinde hazırlanmış ticari preparatlar için ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$ AT, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ FH) elde edilen F testi verileri ($\alpha=0,05$, % 95 güvenle) (n=6)

| Deneme Sayısı (n=6) | AT | | FH | |
|---|-------------|--------|--------------|--------|
| | YPSK | UV | YPSK | UV |
| İstatiksel Değerler | | | | |
| Ortalama Değer | 102,21 | 103,33 | 100,50 | 105,00 |
| Standart Sapma (SD) | 0,65 | 1,72 | 2,35 | 2,10 |
| Bağıl Standart Sapma (RSD,%) | 0,63 | 1,66 | 2,33 | 2,00 |
| Standart Hata | 0,26 | 0,70 | 0,95 | 0,86 |
| F testi $F_{\text{hesaplanan}} (F_{\text{tablo}})$ | 0,14 (0,20) | | 0,097 (0,20) | |

Tablo 4.23.'de elde edilen verilere göre YPSK ve UV yönteminde AT ve FH içeren ticari preparatların ayrı ayrı $0,01\text{N HCl}$ ortamında hazırlanmasıyla elde edilen geri kazanım verileri, F testi ile karşılaştırılmış ve bu sonuçlara göre, $F_{\text{hesaplanan}}$ değerleri, F_{tablo} değerlerinden küçük olduğu için her iki yöntem arasında fark olmadığı sonucuna varılmıştır.

Tablo 4.24. YPSK ve UV yönteminde, çözücü içerisinde hazırlanmış ticari preparatlar için ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$ AT, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ FH) elde edilen ANOVA testi verileri ($\alpha=0,05$, % 95 güvenle) (n=12)

| ANOVA TEK ETKEN | | | | | | |
|------------------|-------|---------|----------|---------|----------|----------|
| Gruplar | Say | Toplam | Ortalama | Varyans | | |
| Sütun 1 | 12 | 1233,20 | 102,77 | 1,88 | | |
| Sütun 2 | 12 | 1243,24 | 103,60 | 4,32 | | |
| ANOVA | | | | | | |
| Varyans Kaynağı | SS | df | MS | F | P-değeri | F ölçütü |
| Gruplar Arasında | 4,20 | 1 | 4,20 | 1,35 | 0,26 | 4,30 |
| Gruplar İçinde | 68,21 | 22 | 3,10 | | | |
| Toplam | 72,41 | 23 | | | | |

Tablo 4.24.'de ise, YPSK ve UV yöntemlerinde, ayrı ayrı AT ve FH için çözücü ortamında hazırlanan ticari preparatlardan elde edilen geri kazanım değerleri ANOVA testi ile karşılaştırılmıştır. Tablo'ya göre, F_{tablo} değeri (4,30), $F_{\text{hesaplanan}}$ (1,35) değerinden büyük olduğundan her iki etken maddeyi içeren ticari preparatların YPSK ve UV yöntemiyle elde edilmiş geri kazanım değerleri arasında bir fark olmadığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca P değeri 0,26 olduğundan ($P>0,05$), grup ortalamaları da eşittir ve karşılaştırmaya gerek yoktur.

BÖLÜM 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

İlaçlarda, tıbbi ve biyolojik numunelerde bulunan eser düzeydeki maddelerin tayin edilebilmeleri ve bununla birlikte yeni tayin yöntemlerinin geliştirilmesi, analitik kimyadaki son araştırma konuları arasında yer almaktadır. Günümüzde kombine ilaç formülasyonları giderek daha yaygın kullanım alanı bulmakta ve bu nedenle bu tür formülasyonlarda ve biyolojik materyallerde eş zamanlı analitik ilaç analiz yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu formülasyonlardaki etken maddelerin rutin analizlerinde kullanılacak hızlı, kolay, etkili, kesinliği yüksek, tayin edilebilirlik sınırı düşük analiz yöntemleri geliştirmek bu açıdan önemlidir. Bu amaçla, son zamanlarda karışım içerisindeki etken maddelerin özellikle hiçbir ayırma işlemine gerek duyulmadan kolaylıkla miktar tayinlerinin yapılabilmesi için bu türden yöntemlerin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu yöntemlerin genel amacı, önerilen ilacı alan bir hastanın gerçekten önerilen ilacı, önerilen dozda ve önerilen sınırlar içerisinde aldığından emin olmaktır. İlaçların kendine özgü birtakım özelliklerinden dolayı, emilimi kişiler arasında farklılıklar göstermektedir. Bu sebeplerle hastaların kan seviyelerinin doğru analiz yöntemleri yoluyla belirlenmeleri gerekmektedir. Aktif bileşenlerin vücutta eriştiği gerçek konsantrasyonun ve aktif ilaç bileşenlerinin vücut sıvılarındaki konsantrasyonunu ölçmede kullanılan analitik yöntemin doğruluğunun, uygun kesinliğe sahip olarak deneysel olarak gösterilmesi gerekmektedir.

Rutin ilaç imalatında seriler arasındaki kalite kontrolü çalışmalarında, in-vitro tayin yöntemleri kullanılarak seriler arasında farklılıklar olup olmadığı araştırılmaktadır. Bu kalite kontrol testlerinin özenle ve dikkatli yapılması gerekmektedir. Aksi halde iyi hazırlanmayan formülasyonlar ortaya çıkabilir. in-vitro testler, in-vivo (canlıda) testlere model oluşturmak için yapılmaktadır. İlaç formüllerinde bir değişiklik yapılmadığı sürece, in-vitro bulgular kalite kontrolü çalışmaları için yeterlidir. Formülasyon değişikliklerinde ise, yeni ilacın etkin ve güvenilir olduğunun

ispatlanması gerekmektedir. Bir ticari preparatın içindeki etken maddelerin özelliklerinin tam olarak belirtilmesi, preparatların uniform olmalarını sağlar. Bu ilaçların düzgün yapılması, farklı firmaların aynı ürünleri arasındaki farklılıkları ve bir firmanın ürününde bulunan kutular arasındaki farklılıkları da en aza indirir. İlaç ürünlerindeki küçük değişiklikler istatistikî açıdan önemlidir ve iyileştirici cevapta küçük farklılıklar doğurabilirler. İlacın içindeki bir boya ya da katkı maddesi değiştirilmiş de olabilir. Bunun için de bir in-vitro testi yeterli olacaktır. Bazı ilaçlarda da yeni veriliş yolları geliştirildiğinde, yeni formülasyonun klinik etkinliğinin gösterilmesi gerekmektedir. Aynı zamanda ilaçlarda ruhsatlandırma yapılırken, etkinlik ve güvenilirliğin kanıtlanabilmesi için klinik öncesi ve klinik çalışmaların da tamamlanmış olması istenir. Böylelikle bu klinik çalışmalar ile hastane ve poliklinik gibi topluma sağlık hizmeti veren yerlerde, hizmet kalitesi ve hastaların tedavi şansı artarak, sonuçta yan etkilerin sıklığı da minimuma indirilmiş olur.

Bu sebeplerden dolayı gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada, ampisilin trihidrat (AT) ve fenazopiridin hidroklorür (FH) etken maddelerinin, hem çözücü ortamında farmasötik preparattan hem de in-vitro olarak biyolojik materyalden aynı anda miktar analizlerinin yapılabilmesi için, son zamanlarda büyük gelişme kaydeden yüksek etkinlik, yüksek ayırıcılık, hızlı ve kolay uygulanabilir olma gibi özellikleri nedeniyle ilaç analizlerinde sıklıkla kullanılmakta olan DAD dedektörlü Ters Faz-Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (TF-YPSK) ve 1. türev spektrofotometrisi (¹D) yöntemleri olmak üzere iki farklı yöntem geliştirilmiştir. Aynı zamanda bu karışımdaki maddelerin en uygun ayırımının sağlanabilmesi için de geliştirilen yöntemlerin kromatografik ve spektrofotometrik koşulları optimize edilmiştir.

Yapılan literatür araştırmaları sonucunda [79-111], AT ve FH'nin tek başına ve bazı farklı etken madde karışımları içerisinde, YPSK, LC-MS, UV-GB Spektroskopisi, GC kromatografisi ve Voltametik olarak ilaç dozaj formlarında ve plazma içerisinde miktar analizlerinin gerçekleştirildiği pek çok çalışmaya rastlanılmıştır. Bütün bu çalışmalardan görüldüğü üzere; insan plazması içerisinde tablet preparatındaki AT ve FH'nin birlikte belirlenmesi için herhangi bir eşzamanlı sıvı kromatografisi analiz yöntemi literatürde henüz mevcut değildir.

Bu iki yöntem, Türkiye ilaç piyasasında satılan Azosilin tablet preparatına uygulanmış ve hiçbir ayırma işlemine gerek kalmaksızın preparatın içerisinde bulunan AT ve FH'nin aynı anda miktar tayini başarıyla gerçekleştirilmiştir.

Sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemine gerek kalmaksızın kısa zaman içerisinde oldukça yüksek geri kazanımlar elde edilerek gerçekleştirilen, insan plazmasında AT ve FH'nin in vitro olarak YPSK-DAD yöntemiyle eş zamanlı miktar tayinine yönelik yapılan bu ilk çalışmanın; yüksek geri kazanımı, tekrarlanabilirliği, basit ve ekonomik olması nedeniyle rutin bir laboratuvar için yararlı olacağı düşünülmektedir.

YPSK'de, ters fazlı kolon (GL Sciences, Inertsil ODS-3 kolon C₁₈, 250 x 4,6 mm) üzerinde, di-potasyum hidrojen fosfat ve amonyum dihidrojen fosfat tamponu (pH 3,0) ve metanol (65:35, v / v) kombinasyonundan oluşan bir mobil faz ile ikili etken madde karışımı yürütülerek, 1,3 mL dk⁻¹ akış hızıyla doğrusal gradient elüsyon kullanılmıştır. DAD dedektör ile 240 nm'de elde edilen kromatogramlardaki pik alanlarının, konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmesi ile hazırlanan kalibrasyon eğrileri yardımıyla, karışımdaki AT ve FH'nin aynı anda miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Tüm standart çözeltiler ve plazma çözeltileri 0,01 N HCl çözeltisi içerisinde hazırlanmıştır. AT ve FH'nin plazmadan aynı anda analizinde öncelikle metanolla çöktürme işlemi uygulanmış, herhangi bir ekstraksiyona gerek kalmadan uygun kromatogramlar alınmıştır. Bu koşullarda AT ve FH için alıkonma zamanları sırasıyla 4,60 dk ve 10,30 dk olarak belirlenmiştir. Optimize edilen tüm çalışma koşullarında, doğrusal konsantrasyon aralığı AT için 1,0-40,0 µg mL⁻¹ ve FH için 0,5-20,0 µg mL⁻¹ olarak tespit edilmiştir. Geliştirilen yönteminin validasyon çalışmalarında, tekrarlanabilirliğini (kesinlik) belirlemek için; aynı gün içerisinde tüm standartlar 6 kez ölçülerek ve 3 farklı günde ise düşük, orta ve yüksek olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda yine 6 kez ölçümler alınarak analizler gerçekleştirilmiştir. Yöntemin doğruluğunu belirlemek amacıyla da yapılan çalışmalar sonucunda, çözücü ortamından geri kazanım ortalama değerleri AT için %102,21 ve FH için %100,50 olarak bulunmuştur. Plazma çalışmalarında ise sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemine gerek kalmaksızın kısa zaman içerisinde, oldukça yüksek geri kazanımlar elde edilmiştir. Geri kazanım ortalama değerleri de, AT için % 106,09 ve FH için % 101,63 olarak bulunmuştur.

Karşılaştırma yöntemi olarak, bir UV-GB türev spektrofotometrik yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen bu yöntemde AT için 222 nm ve FH için 252,5 nm dalgaboyunda çalışılmıştır. Bu ¹D yönteminde, AT ve FH'nin 0,01 N HCl çözeltisi içerisindeki karışım standart çözeltilerinin hazırlanmasıyla yine doğrusal konsantrasyon aralığı AT için 1,0-40,0 µg mL⁻¹ ve FH için 0,5-20,0 µg mL⁻¹ olmak üzere, her biri için ayrı ayrı 1. türev spektrumları alınmıştır. Bulunan absorbans değerleriyle hazırlanan kalibrasyon grafikleri yardımıyla, ticari ilaç karışımı içerisindeki AT ve FH'nin aynı anda miktar tayini gerçekleştirilmiştir. UV-GB türev spektrofotometrik yöntem, AT ve FH içeren tabletlere uygulanarak, yine oldukça yüksek ortalama geri kazanımlar (AT için % 103,33 ve FH için %105,00 olarak) elde edilmiştir.

Elde edilen sonuçların istatistiksel açıdan değerlendirilmesi için de üç farklı test tekniği kullanılmıştır. Geliştirilen YPSK ve ¹D yönteminde, AT için çözücü ortamında hazırlanan ticari preparatlardan elde edilen geri kazanım değerleri ile plazma ortamındakiler, yine FH için çözücü ortamında hazırlanan ticari preparatlardan elde edilen geri kazanım değerleri ile plazma ortamındakiler, student-t testi, F testi ve ANOVA testi ile karşılaştırılmıştır. Tüm bu testlerin sonuçlarına göre; her iki etken maddeyi içeren ticari preparatların çözücü ortamında ve plazma ortamında hazırlanması arasında bir fark olmadığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca ANOVA testi sonucuna göre de, grup ortalamaları arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunmamıştır.

Uygulanan analitik yöntemlerle ilaçların, yeterli duyarlılık, özgünlük, doğrusallık, geri kazanım, doğruluk ve kesinlik bakımlarından tam olarak valide edilmiş uygun bir yöntem kullanılarak validasyonunun (geçerliliğinin veya güvenilirliğinin ortaya konulması) yapılması gerekliliğinden yola çıkılarak, geliştirilen YPSK ve ¹D yöntemlerinin tüm validasyon parametreleri değerlendirilmiş ve biyoistatistik yönünden de geçerlilikleri kanıtlanmıştır. Her iki etken maddenin bir aradaki rutin analizlerinde güvenle kullanılabilir olması, bu tarz karışımların analizleri için diğer çalışmalara ışık tutması ve bu konuda yeni yöntemlerin geliştirilmesi açısından da önemlidir.

KAYNAKLAR

- [1] <http://www.wikipedia.org/wiki/İlaç>, Erişim Tarihi: 14.04.2014.
- [2] CİNGİ, M. İ., EROL, K., Farmakoloji, T.C. Anadolu Üniversitesi Yayınları No:494, Açıköğretim Fakültesi Yayınları, No:223, Eskişehir, Şubat, 1993.
- [3] <http://www.ordueczaciiodasi.org.tr.>, Erişim Tarihi: 14.04.2014.
- [4] <http://www.acilveilkuyardim.com/acilbakim/ilacbilgisi.htm>, Erişim Tarihi: 14.04.2014.
- [5] Devlet Planlama Teşkilatı (DPT): 8. Beş Yıllık Kalkınma Planı, İlaç Sanayii Özel İhtisas Komisyonu Raporu, DPT Yayını Yayın No: DPT 2540-ÖİK 556, Ankara, 2001.
- [6] ASLIM, B., SAĞLAM, M., BEYATLI, Y., Determination of some properties of bacillus isolated from soil, Turkish Journal of Biology, 26, 41-48, 2002.
- [7] KAYA, S., Antibiyotikler, Veteriner Farmakoloji, Medisan Yayınevi, Ankara, Cilt 2, 4. Baskı, 329-469, 2007.
- [8] DÖKMECİ, İ., AKÇASU, A., BANOĞLU, N., BERKARDA, Ş., Farmakoloji, İlaç uygulamalarında temel kavramlar, Nobel Tıp Kitapevleri, 705-785, 1992.
- [9] KUNIN, CM., The responsibility of the infectious disease community for the optimal use of antimicrobial agents. Journal of Infect Diseases, 151:388-98, 1985.
- [10] QUINTILIANI, R., NIGHTINGALE, C., Principles of antibiotic usage, Journal of Clinic, 190:31-5, 1984.
- [11] KAYAALP, O., Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. 6. Baskı, Feryal Matbaacılık, Ankara, 826-863, 1991.
- [12] KURT, H., Penisilinlerin farmakolojisi ve klinik farmakolojisi, Turgut Yayıncılık, İstanbul.
- [13] ERTAN, R., DURUKAN, M., Yeni semisentetik penisilinler, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara, 60-63, 1986.
- [14] ŞANLI, Y., KAYA, S., Veteriner farmakoloji ve ilaçla sağıtım seçenekleri, Medisan Yayınevi, Ankara, 571-650, 1994.

- [15] ŞENER, S., Veteriner klinik farmakoloji ve formüller, Pethask Veteriner Hekimliği Yayınları, 81-83, 1990.
- [16] <http://www.akilciilac.gov.tr>, Erişim Tarihi: 14.04.2014.
- [17] ÖNCÜL, O., Akılcı antibiyotik kullanımı, Erişkinde toplumdan edinilmiş enfeksiyonlar sempozyum dizisi, 31, 23-38, 2002.
- [18] GÜR, D., Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 182-93, 2002.
- [19] KFOURY, S., ARAJ, F., Recent development in B-lactamases and extended spectrum Blactamas, British Journal Medicine, 327, 1209-13, 2003.
- [20] KURT, H., TULUNAY,FC., ERGUN, H., Penisilinlerin farmakolojisi ve klinik farmakolojisi, Antibiyotiklerin klinik farmakolojisi, Turgut Yayıncılık, İstanbul, 17-26, 2000.
- [21] IŞIK, B., “ Ampisilin’in erkek sıçan kalp ve karaciğer dokularındaki yağ asitleri, kolesterol ve bazı vitamin değerlerine etkisinin incelenmesi” Yüksek lisans bitirme tezi, Ahi Evran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırşehir, 2011.
- [22] DOYLE, F.P., NAYLER, J.H.C., SMITH, H., STOVE,E.R.,Some novel acid-stable penicillins, Nature 191,1091, 1961.
- [23] MACLEOD, C., RABIN, H., RUEDY, J., CARON, M., ZAROWNY, D., DAVIES, R., Comparative bioavailability of three brands of ampicillin, Can Med Assoc J., 107(3):203-9, Aug 5, 1972.
- [24] <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=6249>, Erişim Tarihi: 15.04.2014.
- [25] DOYLE, F.P., Fosker, G.R., Nayler, J.H.C., Smith, H.: Derivatives of 6 Aminopenicillanic Acid. A-Amino benzylpenicillin and Some Related Compounds; J. Chem. Soc. 1440, 1962.
- [26] LIVERMORE, D.M., Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance, Clinic Microbial Review, 8, 557-84, 1995.
- [27] AUSTIN, K.W.,MARSHALL,A.C.,SMITH, H., Crystalline modifications of ampicillin, Nature 208, 999, 1965.
- [28] YULUĞ, N., Beta-laktamazlar ve klinik açıdan önemi, ANKEM Dergisi, 11, 205-7, 1997.
- [29] GIAMARELLOU, H., Empiric therapy for infections in the febrile, neutropenic, compromised host, Medicine Clinic, North America, 79, 559-80, 1995.

- [30] KUCERS, A., BENNETT, N., Mck.: The use of antibiotics, 3. Baskı, William Heinemann Medical Books Ltd., London, 1979.
- [31] ROLINSON, G.N., MITSUHASHI, S., ampicillin, beta-lactam antibiotics, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1981.
- [32] HOU, J.P., POOLE, J.W., The amino acid nature of ampicillin and related Penicillins, J. Pharm. Sci., 58(12), 1510, 1969.
- [33] JAMES, M.N.G., HALL, D., Crystalline modifications of ampicillin. I: The Trihydrate; Nature 220, 168, 1968.
- [34] PERLMAN, D., FOYE, W.O., Antibiotics, Principles of medicinal chemistry; 2. Baskı, Lea&Febiger, Philadelphia, 1981.
- [35] LIVERMORE, M., Beta-lactamase mediated resistance and opportunities for its control, Journal of Antimicrob Chemother, 24-41, 1998.
- [36] HALL, L.M.C., LIVERMORE, M., GÜR, D., AKOVA, M., AKALIN, E., Extended spectrum variant of OXA-10 (PSE) beta-lactamase from Pseudomonas aeruginosa, Antimicrob Agents Chemother, 37, 1637-44, 1993.
- [37] GÜR, D., Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar ve klinik önemi, Bilimsel Tıp Yayınevi, 70-84, Ankara, 2005.
- [38] <http://apps.who.int/phint/en/p/docf/>, Erişim Tarihi: 14.04.2014.
- [39] <http://www.rxlist.com/principen-side-effects-drug-center.htm>, Erişim Tarihi: 16.04.2014.
- [40] <http://www.dogalrehber.com/web/bitki/fitoterapi.html>, Erişim Tarihi: 14.04.2014.
- [41] yunus.hacettepe.edu.tr/~mutlud/.../328Narkotikanaljezikler_2008.pps, Erişim Tarihi: 17.04.2014.
- [42] JOHNSON, WJ., CHARTRAND, A., Toxicol Appl Pharmacol, 37:371-376, 1976.
- [43] <http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=71419>, Erişim Tarihi: 14.04.2014.
- [44] <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/twelfth/profiles/phenazopyridinehydrochloride.pdf>, Erişim Tarihi: 14.04.2014.
- [45] <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01438>, Erişim Tarihi: 14.04.2014.
- [46] THOMAS, B.H., VEZINA, M., BAILEY, K., ZEITZ, W., SOLOMONRAJ, G., Fate of phenazopyridine (2,6-iamino-3-(phenylazo) pyridine) in the rat. Toxicol Lett, 18: 126, 1983.

- [47] JOHNSON, W.J., CHARTRAND, A., *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 37:371-376, 1976.
- [48] MARTINDALE, E.F., REYNOLDS, *The Extra Pharmacopoeia*, 30th edn., Pharmaceutical Press, London, 29–31, 1993.
- [49] YAMINI, Y., ARAB, J., M., ASQHARI-KHIAVI, J., *Pharm. Biomed. Anal.* 32 181–187, 2003.
- [50] ZIMMERMAN, R., GREEN, E.D., GHURABI, W.H., COLOHAN, D.P., *Ann. Emerg. Med.* 9, 147–149, 1980.
- [51] NOONAN, H.M., KIMBRELL, M., JOHNSON, W.B., REULER, J.B., *Urology*, 21, 623–624, 1983.
- [52] LANDMAN, J., KAVALER, E., WATERHOUSE, R.L., UROL, J., 158, 1520–1521, 1997.
- [53] HALVORSEN, S.M., DULL, W.L., *Am. J. Med.* 91, 315–317, 1991.
- [54] http://en.wikipedia.org/wiki/Phenazopyridine_hydrochloride, Erişim Tarihi: 14.02.2014.
- [55] www.ilacpedia.com/prospektus/azosilin-tablet, Erişim tarihi: 30.06.2014.
- [56] İEİS, “Jenerik İlaç”, *Aylık rapor dergisi*, Sayı: 119, Ekim, 2005.
- [57] GEÇGİL, Ş., *Farmasötik teknolojiye başlangıç*, Cihan Matbaacılık, İstanbul, 1991.
- [58] ABACIOGLU, N., “İlaçta Jenerik isim”, IV. Türkiye Eczacılık Kongresi 10-11-İstanbul, 12 Mayıs, 1991.
- [59] *Biyolarlanım ve biyoşdeğerlik yasal yönü*, II Ulusal Biyoyarlanım ve Biyoşdeğerlik Sempozyumu, Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Şafak Matbaacılık, FATUM, Ankara, 17-18 Nisan, 1995, 1.
- [60] SKOOG, D., HOLLER, F.J., NIEMAN, T.A., *Enstrümental Analiz İlkeleri*, Çeviri Editörleri: KILIÇ, E., KÖSEOĞLU, F., YILMAZ, H., BilimYayıncılık, Ankara, 299-347, 674-766, 1998.
- [61] SEWELL, P.A., CLARKE, B., KEALEY, D., *Chromatographic Separations*, John Wiley & Sons, Great Britain, 1987.
- [62] HAMILTON, R.J., SEWELL, P.A., *Introduction to high performance liquid chromatography*, Second Edition, Chapman and Hall, USA, 1982.
- [63] BIDLINGMEYER, B.A., *Practical HPLC Methodology and Applications*, John Wiley & Sons, USA, 1992.

- [64] SKOOG, D., WEST, D., HOLLER, F.J., Analitik Kimya Temelleri, BilimYayıncılık, 7. Baskı, 2. Cilt, Ankara 299-351, 675-777,1999.
- [65] MEYER, V.R., Practical high performance liquid chromatography, John Wiley & Sons, USA, 1988.
- [66] SNYDER, L.R., GLAJCH, J.L., KIRKLAND J.J., Practical HPLC Method Development, John Wiley & Sons, USA, 1988.
- [67] KRSTULOVIC, A.M., BROWN, P.R., Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography: Theory, Practice and Biomedical Applications, John Wiley & Sons, USA, 1982.
- [68] ADAMOVIĆ, J.A., Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals 2. Edition Revised and Expanded Marcel Dekker. New York, 135-184, 1997.
- [69] CHRISTIAN, G.D., Analytical Chemistry. 6th Edition. John Wiley & Sons Inc., New Jersey, 2004.
- [70] SKOOG, D.A., LEARY, J.J., Principles of Instrumental Analysis, 4th Edition. Harcourt Brace College Publishers, New York, 116, 134-139, 1992.
- [71] GÜNDÜZ, T., İnrümentel Analiz, Gazi Kitapevi, Altıncı Baskı, Ankara, 101-229, 1116-1357, 2002.
- [72] Parasetamol, kafein ve propifenazon içeren tabletlerin HPLC yöntemi ile analizinin faktöriyel tasarım ile optimize edilmesi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programı, 2007.
- [73] SCHAUWECHER, P., FREI, R.W., Chromatography LC Magazine, 14, 1977.
- [74] HUBER, L., Validation of Analytical Methods Review And Strategy, Advanstar Communication for Publication in LC/GC International, 2001.
- [75] SNYDER, L.R., KIRKLAND, J.J., Introduction to Modern LC, 91, 334, 1979.
- [76] HANSEN, H.A., EMBORG, C., Experimental design in the development and characterisation of a HPLC method for aminoacids, Journal of Chromatography A, 2, 171-180, 626, 1992.
- [77] Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods, Centre for Drug Evaluation and Research (CDER), Food and Drug Administration, November, 1994.
- [78] DEMİRKAYA, F., Karbamazepinin UV-Visible spektrofotometri ve HPLC yöntemleriyle miktar analizi., Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans tezi, Erzurum, 2003.

- [79] GARCIA, M.S., SANCHEZ-PEDREFIO, C., ALBERO, M.I., RDENAS, V., Determination of ampicillin or amoxicillin in pharmaceutical samples by flow injection analysis, *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, Vol. 12, No. 12, 1585-1589, 1994.
- [80] GAMBA, V., DUSI, G., Liquid chromatography with fluorescence detection of amoxicillin and ampicillin in feeds using pre-column derivatization, *Analytical Chimica Acta* 483, 69–72, 2003.
- [81] LUO, W., CATHARINA, Y.W.A., HAROLD C. THOMPSON, JR., Rapid method for the determination of ampicillin residues in animal muscle tissues by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Journal of Chromatography B*, 694, 401–407, 1997.
- [82] MOHAMED, G.G., Spectrophotometric determination of ampicillin, dicloxacin, flucloxacillin and amoxicillin antibiotic drugs: ion-pair formation with molybdenum and thiocyanate.
- [83] KHAN, A.A.P., MOHD, A., BANO, S., SIDDIQI, K.S., ASIRI, A.M., Spectrophotometric methods for the determination of ampicillin by potassium permanganate and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in pharmaceutical preparations, *Arabian Journal of Chemistry*.
- [84] FERNA'NDEZ-GONZA'LEZ, A., BADI'A, R., DI'AZ-GARCI'A, M.E., Comparative study of the micellar enhanced spectrophotometric determination of -lactamic antibiotics by batch and flow injection analysis using a multisimplex design, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 29, 669–679, 2002.
- [85] ZHU, Y., MORENO, M.L., PORQUERAS, E., BOURKE, E., BRUZZI, A., ALETRARI, M., KANARI, P., PARTASIDOU, D., NIENHUIS, J., FERIGO, W., ROBERT, J.L., MIUER, J.H.MCB., SPIESER, J.M., ROETS, E., HOOGRNARTENS, J., Interlaboratory study of the analysis of ampicillin by liquid chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 14, 1151-1156, 1996.
- [86] ZHU, Y., ROETS, E., ZHIGANG, NP., M.L. MORENO, PORQUERAS, E., HOOGMARTENS, J., Evaluation of liquid chromatography methods for the separation of ampicillin and its related substances, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 14, 631-639, 1996.
- [87] ISSOPOULOS, P.B., Analytical investigations of β -lactam antibiotics in pharmaceutical preparations, *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, Vol. 6., No. 1., pp. 97-101, 1988.
- [88] BRISCOEA, S.E., MCWHINNEYA, B.C., LIPMANB, J., ROBERTS, J.A., UNGERERA, J.P.J., Method for determining the free (unbound) concentration of ten beta-lactam antibiotics in human plasma using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection, *Journal of Chromatography B*, 907, 178– 184, 2012.

- [89] NASCIMENTO, T.G., ARAGÃO, C.F.S., MEDEIROS, F.D., OLIVEIRA, E.J., MACÊDO, R.O., Validation of a Method for Determination of Ampicillin in Human Plasma using LC–DAD, *Journal of Chromatographic Science*, Vol. 47, October, 2009.
- [90] ROSSEEL, M.T., BOGAERT, M.G., VALCKE, Y.J., High performance liquid chromatographic assay of ampicillin in plasma and broncho-alveolar lavage fluid, using fluorescence detection, *Chromatographia*, Vol. 27., No. 5/6, March, 1989.
- [91] MCWHINNEYA, B.C., WALLISB, S.C., HILLISTER T., ROBERTS J.A., LIPMAN J., UNGERERA J.P.J., Analysis of 12 beta-lactam antibiotics in human plasma by HPLC with ultraviolet detection, *Journal of Chromatography B*, 878, 2039-2043, 2010.
- [92] DEVANI, M.B., PATEL, I.T., PATEL, T.M., Spectrophotometric determination of ampicillin and its dosage forms, *Talanta*, Vol. 39, No. 10, pp. 1391-1394, 1992.
- [93] KURIAN, T., KURIEN, J., Simultaneous Multicomponent Spectrophotometric analysis of Ampicillin and Probenecid in Pharmaceutical formulation by Derivative spectroscopy, *Hygeia., J.D., Med.*, vol.3 (2), pp. 57-61, October, 2011.
- [94] AKHTAR, M.J., KHAN, S., SALAM KHAN, M.A., Determination of ampicillin in human plasma by high-performance liquid chromatography using ultraviolet detection, Volume 11, Issues 4–5, Pages 375–378, April–May, 1993.
- [95] MARGOSIS, M., Quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of ampicillin, *Journal of Chromatography A*, Volume 236, Issue 2, Pages 461–468, 19 February, 1982.
- [96] IMAM PASHA, S., REHMAN, F., MOHAMMED, T., SANJYOTHI, Y., SHRAVAN KUMAR, A., New visible spectrophotometric methods for the determination of ampicillin trihydrate in bulk drug and their formulations, *Int. J. Pharm & Ind. Res*, Vol-02 Issue, 01 Jan-Mar, 2012.
- [97] HUANG, C., GAO, J., MIAO, L., Simultaneous determination of flucloxacillin and ampicillin in human plasma by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and subsequent application to a clinical study in healthy Chinese volunteers, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 59, Pages 157–161, 5 February, 2012.
- [98] BELAL, F., Simultaneous High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Phenazopyridine and Nitrofurantoin in Tablets. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of phenazopyridine and nitrofurantoin in tablets. *Chromatographia*, 25: 61–63, 1988.
- [99] BELAL, F., Amperometric determination of phenazopyridine hydrochloride in a flowing stream at the glassy carbon electrode.

- [100] SABRY, SUZY, M., Adsorptive stripping voltammetric assay of phenazopyridine hydrochloride in biological fluids and pharmaceutical preparations, *Talanta* 50, 133–40, 1999.
- [101] SABRY, SUZY, M., Study of forced-acid/heat degradation and degradant/impurity profile of phenazopyridine hydrochloride through HPLC and spectrofluorimetric analyses, *Journal of food and drug analysis*, Volume:16, Issue: 1, Pages:56-65, February, 2008.
- [102] NAGESWARA RAO, R., PAWAN, K., MAURYA, A., RAJU, N., Isolation and characterization of a potential process related impurity of phenazopyridine HCl by preparative HPLC followed by MS–MS and 2D-NMR spectroscopy.
- [103] ABDEL-HAY, M.H., EL-WALILY, Simultaneous Analysis of a Ternary Mixture of Pharmaceuticals Containing Trimethoprim, Sulphamethoxazole, and Phenazopyridine Hydrochloride Using Third-Derivative and Zero-Order Photodiode Array Spectrophotometry Spectroscopy Letters, *An International Journal for Rapid Communication*, Volume 26, Issue 9, pages 1745-1759, 1993.
- [104] SHANG, E., XIANG, B., LIU, G., XIE, S., WEI, W., LU, J., Determination of phenazopyridine in human plasma via LC–MS and subsequent development of a pharmacokinetic model.
- [105] FARIN, D.G., PIVA, G., KITZES-COHEN, R., Determination of Phenazopyridine in Human Plasma by High Performance Liquid Chromatography, *Chromatographia*, 52:179–180, 2000.
- [106] LI, K., CHEN, Q., ZHANG Z., ZHOU, P., LI, P., LIU, J., ZHU, J., Determination of Phenazopyridine in Human Plasma by GC–MS and its Pharmacokinetics, *Journal of Chromatographic Science*, Vol. 46, September, 2008.
- [107] CHENA, Q., LIA, K., ZHANGB, Z., LIA, P., LIUB, J., LIB, Q., Development and Validation of a Gas Chromatography-Mass Spectrometry Method for the Determination of Phenazopyridine in Rat Plasma, Application to the Pharmacokinetic Study.
- [108] DU PREEZ, J.L., ALTA BOTHA, S., *J Chromatogr*, 333:249–252, 1985.
- [109] SARAJI, M., HAJIALIAKBARI, A.A., BAHMAN FARAJMAND, B., Hollow fiber-based liquid–liquid–liquid microextraction followed by flow injection analysis using column-less HPLC for the determination of phenazopyridine in plasma and urine.
- [110] ERK, N., GÖNÜLLÜ, U.G., Resolution of two-component mixtures in pharmaceutical formulations containing phenazopyridine hydrochloride by ratio spectra derivative spectrophotometry.

- [111] PALABIYIK, İ.M., ONUR, F., Liquid Chromatographic and Spectrophotometric Determination of Phenazopyridine Hydrochloride, Ampicilline Trihydrate, and Nitrofurantoin in Pharmaceutical Preparations, *Analytical Letters* Vol. 37, No. 10, pp. 2125–2150, 2004.
- [112] ICH (International Conference on Harmonisation) Quality Guidelines: Q2A, Text on Validation of Analytical Procedures Methodology, <http://www.ifpma.org/ich5.html>, 1996.

ÖZGEÇMİŞ

Betül Ataoğlu, 28.09.1987'de İstanbul'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Beykoz'da tamamladı. 2012 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü'nden mezun oldu. Aynı yıl Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı. Türkiye Kimya Derneği üyesidir. Yabancı dili İngilizce'dir.